



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

**“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN
EXTRACTO BIOACTIVO OLEOSO DE PROPÓLEOS DE
Melipona beecheii.”**

OPCIÓN

TESIS PROFESIONAL

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

QFB. ROCIO NATALIE HERRERA ORTIZ

ASESOR:

DR. VÍCTOR MANUEL MOO HUCHIN

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2021



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
NO. DE OFICIO: X-196/21
Mérida, Yucatán, 24/junio/2021

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

C. ROCIO NATALIE HERRERA ORTIZ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIA
DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE.

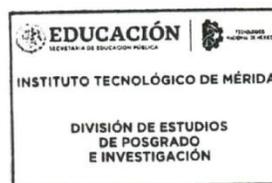
De acuerdo al fallo emitido por su director **Victor Manuel Moo Huchin** y la comisión revisora integrada por su coasesor David Abram Betancur Ancona, Enrique Sauri Duch y Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN EXTRACTO BIOACTIVO OLEOSO DE PROPÓLEOS DE MELIPONA BEECHEII."

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica-
"In Hoc Signo Vinces"

HERMILA ANDREA URDARRI BENÍTEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
HAUB/EOV/zac



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), por el apoyo financiero a través de la beca de manutención 2018-2020 y la beca de estancia internacional y la beca de movilidad al extranjero, convocatoria 2019.

Al laboratorio de Instrumentación analítica del Instituto Tecnológico de Mérida, por brindarme las herramientas y reactivos para la realización del proyecto, y al Instituto Tecnológico Nacional de México por la organización y oferta de los programas educativos.

A la Universitat de Barcelona, al Departamento de Nutrición, Ciencia de Alimentos y Gastronomía de la facultad de Farmacia y Ciencia de los Alimentos, especialmente al grupo Polyphenols research, por el apoyo científico, tecnológico y financiero en la investigación del análisis cualitativo de compuestos fenólicos de extractos de propóleos a través de HPLC-MS.

Al Doctor Víctor Manuel Moo Huchin por transmitir su conocimiento, experiencia y dedicación a la realización del proyecto, así como también por participar en mi desarrollo profesional.

Al comité tutorial, Dr. Enrique Sauri Duch, Dr. David Abram Betancur Ancona y la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez por sus valiosas aportaciones al desarrollo de esta investigación.

A la Doctora Rosa María Lamuela Raventós, científico titular responsable del grupo “Antioxidantes naturales (Polyphenol Research)” en el Departamento de Nutrición, ciencia de los alimentos y gastronomía de la Universitat de Barcelona.

A la estudiante de doctorado Anallely López Yerena, por compartir su tiempo y conocimiento en el campo de la investigación, así como por el apoyo personal para conseguir vivienda en Barcelona.

A todos mis compañeros del laboratorio especialmente a Guadalupe Góngora Chi, por transmutar la energía de nuestro ambiente de trabajo con su presencia, volviéndolo más divertido, productivo y significativo.

A mi familia, porque cada uno participó activamente en mi desarrollo personal y profesional, al brindarme su amor y apoyo incondicional.

A mi suegra, por ser de apoyo, dejarme redactar la tesis en su casa durante la pandemia y por siempre procurarme.

A mi pareja por estar presente a través de la distancia, inspirarme y motivarme a realizar esta meta.

Dedicatoria

A Jesucristo, por estar siempre conmigo en todos mis caminos, por inspirarme, por brindarme todas las herramientas que necesité para la realización de este sueño y abrir puertas de abundancia y prosperidad.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 <i>Melipona beecheii</i> y propóleos	3
2.2 Composición química de propóleos de abejas sin aguijón	6
2.3 Propiedades antioxidantes de propóleos de abejas sin aguijón	11
2.4 Métodos de extracción de propóleos	17
2.5 Uso de disolventes no alcohólicos para obtener extractos de propóleos.....	18
2.5.1 El aceite virgen de calabaza como disolvente alternativo en la extracción de propóleos.....	20
3. Justificación	22
4. Objetivos.....	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. Metodología.....	23
5.1. Estrategia general de trabajo	23
5.2. Químicos y reactivos	25
5.3. Obtención de propóleos crudo	25
5.4. Extracción de aceite de pepita de <i>C. argyrosperma</i>	26
5.5. Obtención de extracto oleoso de propóleos	27
5.5.1. Diseño experimental y análisis estadístico	27
5.5.2. Procedimiento para la extracción de propóleos	29
5.5.2.1. Extracción oleosa de propóleos.....	29
5.5.2.2. Extracción etanólica de propóleos	30
5.5.3. Métodos analíticos	30
5.5.3.1. Rendimiento de extracción.....	30
5.5.3.2. Determinación de los contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT)	30

5.5.3.3. Actividad antioxidante	31
5.5.3.4. Cinética del porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} y DPPH[•]	31
5.5.3.5. Perfil fenólico mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.....	31
6.0. Resultados y discusión	32
6.1. Cinética del porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} y DPPH[•]	32
6.2. Análisis de superficie de respuesta para CFT	35
6.3. Análisis de superficie de respuesta para actividad antioxidante	36
6.4. Determinación y validación de condiciones óptimas	40
6.5. Comparación entre el extracto oleoso y el extracto etanólico de propóleos	41
6.6. Perfil fenólico mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.....	43
7.0. Conclusiones.....	47
8.0. Referencias.....	48

Índice de figuras

Figura 1. <i>Melipona beecheii</i> , Melikerria, conocido como Xunan kab en maya, coloquialmente como jicote manso o abeja chica (Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018)	3
Figura 2. Jobón usado por un meliponicultor maya.....	4
Figura 3. Jobón abierto, se observa el propóleos al extremo izquierdo y tapizando el interior del tronco	4
Figura 4. <i>Melipona beecheii</i> recolectando polen, (Gailhampshire, 2016)	5
Figura 5. Estrategia general de trabajo de investigación.....	24
Figura 6. Propóleos de <i>Melipona beecheii</i> del municipio de Mama, Yucatán, Enero 2019	26
Figura 7. Pepita de calabaza (<i>C. argyrosperma</i> Huber) sin cáscara utilizado en la extracción de aceite.....	27
Figura 8. Cinética para determinar el porcentaje remanente del radical ABTS ^{•+} en un extracto oleoso de propóleos (EOP) y un extracto etanólico de propóleos (EEP) diluido 1:10	34
Figura 9. Cinética para determinar el porcentaje remanente del radical DPPH [•] en un extracto oleoso de propóleos (EOP) y un extracto etanólico de propóleos (EEP) diluido 1:10	34
Figura 10. Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para contenido fenólico total (a); actividad antioxidante ABTS ^{•+} (b); y actividad antioxidante DPPH [•] (c).	40

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química en propóleos de abeja <i>Melipona</i>	7
Tabla 2. Propiedades antioxidantes de propóleos de abejas <i>Melipona</i>	12
Tabla 3. Diseño experimental para el proceso de extracción oleosa de propóleos de abeja <i>Melipona beecheii</i>	28
Tabla 4. Factores y los niveles de variables para el diseño experimental.....	29
Tabla 5. Diseño experimental con respuesta de las variables dependientes bajo diferentes condiciones de extracción	36
Tabla 6. ANOVA para los modelos polinomiales cuadráticos predichos para polifenoles totales y actividad antioxidante	38
Tabla 7. Valores predichos y experimentales de las variables de respuesta en condiciones óptimas de extracción.....	41
Tabla 8. Comparación entre el extracto óptimo oleoso y extracto etanólico de propóleos de <i>Melipona beecheii</i>	42
Tabla 9. Perfil de compuestos fenólicos del extracto oleoso (bajo condiciones óptimas de extracción con aceite de calabaza) y extracto etanólico de propóleos de abeja melipona.	43

Resumen

Aunque el extracto etanólico de propóleos de abeja sin aguijón tiene propiedades bioactivas con alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides; sin embargo, su alto contenido de etanol resulta en un factor limitante para su consumo y aplicación cosmética, alimenticia y farmacéutica. Por lo tanto, existe un interés en la búsqueda de nuevos disolventes más seguros, compatibles y más saludables para la extracción de principios activos de propóleos de abeja *Melipona beecheii*. Por lo tanto, en este estudio fueron extraídos los compuestos fenólicos de propóleos de la abeja *Melipona beecheii* a través de maceración, utilizando como disolvente el aceite de pepita de calabaza chihua (*Cucurbita argyrosperma* Huber); además, se determinaron las condiciones de relación aceite de calabaza-propóleos y tiempo para la extracción máxima de compuestos fenólicos y mayor actividad antioxidante, aplicando la metodología de superficie de respuesta (MSR). El extracto oleoso con mayores propiedades bioactivas fue comparado con un extracto alcohólico obtenido de la misma muestra a través del contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, actividad antioxidante y perfil de compuestos fenólicos. Acorde al análisis estadístico, los modelos de regresión para el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante resultaron altamente significativos con un valor de $R^2 > 0.97$, lo cual indica que la variabilidad de la respuesta es explicada por el modelo. Acorde a MSR, el extracto oleoso obtuvo mayor contenido de CFT y actividad antioxidante ABTS^{•+} y DPPH[•] cuando disminuyó la relación aceite a propóleos. La extracción óptima de compuestos fenólicos de propóleos con mayor actividad antioxidante fue alcanzado a una relación aceite de calabaza a propóleos de 25 mL/g y un tiempo de extracción de 2 días. El extracto oleoso obtuvo mayor contenido de flavonoides totales y mayor actividad antioxidante (ABTS^{•+} y DPPH[•]) en comparación al extracto etanólico. Los compuestos fenólicos identificados por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS fueron similares entre el extracto etanólico y extracto oleoso, excepto que en el último extracto se observó la presencia del éster fenético del ácido cafeico. En base a los hallazgos se propone al aceite de calabaza como nuevo disolvente de extracción de compuestos fenólicos de propóleos de abeja *Melipona beecheii*.

Abstract

Despite the ethanolic extract of stingless bee propolis exhibit bioactive properties with high content of phenolic acids and flavonoids, its high ethanol content results in a limiting factor for its consumption and cosmetic, food and pharmaceutical applications. Therefore, there is a significant interest in the search for new, safer, compatible and healthier solvents to be used for the extraction of active principles from *Melipona beecheii* bee propolis. In this study, the phenolic compounds of propolis were extracted from *Melipona beecheii* bee through maceration, using as a solvent the seed oil of Chihua squash (*Cucurbita argyrosperma* Huber). Furthermore, the conditions of pumpkin oil/propolis relationship and time for the maximum extraction of phenolic compounds as well as the greater antioxidant activity were determined by applying the response surface methodology (MSR). The oily extract with higher bioactive properties was compared with an alcoholic extract obtained from the same sample through the content of total phenolic compounds, total flavonoids, antioxidant activity and profile of phenolic compounds. According to the statistical analysis, the regression models for the total content of phenolic compounds and antioxidant activity, were highly significant exhibiting a value of $R^2 > 0.97$, which indicates that the variability of the response is explained by the model. In agreement to MSR results, the oily extract revealed higher content of Total phenolic content and antioxidant activity (ABTS^{•+} and DPPH[•]) when the oil to propolis ratio decreased. Optimal extraction of phenolic compounds from propolis with higher antioxidant activity was achieved at a squash oil to propolis ratio of 25 mL/g and an extraction time of 2 days. The oily extract exhibited higher content of total flavonoids and higher antioxidant activity (ABTS[•] and DPPH[•]) compared to the ethanolic extract. The phenolic compounds identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS were similar between the ethanolic extract and the oily extract, except that the presence of the phenethyl ester of caffeic acid was observed in the latter extract. Based on the findings, squash oil is proposed as a new solvent for phenolic compounds extraction from *Melipona beecheii* bee propolis.

1. Introducción

Un recurso importante en los trópicos del mundo, son las abejas sin aguijón que se clasifican taxonómicamente dentro de la tribu Meliponini. La meliponicultura es la cría y manejo de abejas sin aguijón, en donde a partir de sus colmenas se pueden obtener diversos productos con propiedades farmacológicas, lo que les brinda mayor valor comercial en comparación con los productos derivados de *Apis mellifera*. El propóleo es un producto de la colmena que se conoce desde la más remota antigüedad y ha sido utilizado con finalidades medicinales. Actualmente, el propóleo es un recurso natural de interés científico cuyas investigaciones se orientan en la caracterización de acuerdo con la zona geográfica de recolección, así como también la evaluación de los compuestos responsables de sus propiedades biológicas (Reis *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019).

De acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN (NOM, 2017), el propóleo son sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario, el cual es de aspecto resinoso, el color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante. En general, los propóleos se componen por resinas y bálsamos (50%), ceras (30%), aceites esenciales o volátiles (10%), polen (5%), impurezas (5%) (Anjum *et al.*, 2019). Las abejas utilizan el propóleo para sellar agujeros en sus colmenas y protegen la entrada de otros insectos. Este material resinoso actúa como antibiótico natural para prevenir infecciones bacterianas, virales o fúngicas dentro de la colmena (Sturm y Ulrich, 2020).

El propóleo se comercializa tradicionalmente en forma de tintura alcohólica, envasado en frascos pequeños con gotero y la tintura se obtiene después de exponer una cierta cantidad de propóleo crudo en etanol al 70 % y dejar macerar por un período de 72 h. La tintura alcohólica que se comercializa se ha recomendado para aliviar infecciones, heridas y quemaduras, se le atribuye acción cicatrizante, anti-inflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiviral, entre otras. Los componentes que se reportan como responsables de estos efectos biológicos son principalmente los flavonoides y los ácidos fenólicos, debido a su abundancia y actividad, es por ello, en México, la evaluación de la

calidad de propóleos se orienta al análisis del contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y de su capacidad antioxidante. Sin embargo, hasta 2018 se han reportado más de 850 compuestos del propóleos, la mayoría pertenecen a los grupos de flavonoides, fenoles y terpenos, mientras que los ácidos grasos, alcoholes, alcaloides y otros compuestos representan una fracción minoritaria (Sturm y Ulrich, 2020).

Aunque, la extracción de propóleos con alcohol y sus derivados es considerado como un método simple y eficaz, existen ciertas limitaciones en su uso en las industrias cosméticas y farmacéuticas debido a su fuerte sabor resinoso (Silici y Baysa, 2020). La forma habitual de consumo de la tintura alcohólica, consiste en adicionar cierta cantidad de gotas de la tintura a un vaso con agua; sin embargo, para algunos consumidores el sabor resulta desagradable, además de estar contraindicado en niños y prohibido por algunas religiones, esto por el contenido de alcohol en la presentación, por ello se pretende encontrar un sistema de extracción no alcohólico que permita obtener un extracto de propóleos atractivo con posibilidades de uso en oftalmología, otorrinolaringología, pediatría, diabetes, pacientes con cáncer y personas intolerantes al alcohol. En la literatura científica se han reportado investigaciones con el propósito de encontrar nuevos disolventes de propóleos distintos al alcohol, en donde se ha evidenciado que el tipo de disolvente de extracción influye sobre el contenido de compuestos fenólicos; sin embargo, hacen falta más estudios sobre la caracterización de compuestos con interés terapéutico obtenidos con disolventes no alcohólicos en propóleos de Yucatán, específicamente de *Melipona beecheii*, donde hipotéticamente, el contenido de compuestos es distinto en comparación con propóleos de otro género de abeja.

Dado a la necesidad creciente de nuevos disolventes, compatibles y más saludables para la extracción de propóleos, en esta investigación se plantea por primera vez, la extracción de propóleos utilizando aceite de semillas de calabaza (*Cucurbita argyrosperma*) para la obtención de un extracto oleoso de propóleos de *Melipona beecheii* con potencial antioxidante.

2. Antecedentes

2.1 *Melipona beecheii* y propóleos

En los últimos años ha aumentado el interés científico sobre el contenido de metabolitos secundarios y las propiedades farmacológicas de propóleos obtenidos de la tribu Meliponini, conocida como abejas sin aguijón (Bankova y Popova, 2007).

La tribu Meliponini pertenece al grupo más diverso dentro de las abejas corbiculadas (subfamilia Apinae), por el número actual de especies y también por las diferencias contrastantes en morfología, hábitos de anidación y comportamiento entre especies (Roubik, 2006). Las abejas sin aguijón se encuentran exclusivamente en las regiones tropicales y subtropicales de diversas regiones del mundo. Son consideradas como los principales visitantes y polinizadores de plantas nativas en los trópicos, el tamaño oscila entre 2 mm a 15 mm, se trata de abejas más pequeñas que las abejas *Apis mellifera* (Bankova y Popova, 2007).

La Península de Yucatán, México cuenta con la presencia de abejas sin aguijón, particularmente, la abeja *Melipona beecheii* (Figura 1). En la actualidad se conservan las prácticas de manejo tradicional de las abejas meliponas por la cultura maya; por tanto, los productos obtenidos del jobón tienen importancia cultural y económica.



Figura 1. *Melipona beecheii*, Melikerria, conocido como Xunan kab en maya, coloquialmente como jicote manso o abeja chica (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018)

Para la crianza de esta abeja se utiliza tradicionalmente troncos huecos, conocidos localmente como jobónes (Bianco *et al.*, 2017). En la parte media del jobón se ubica un

agujero que sirve como entrada a la colonia, los extremos del jobón se tapan con discos de madera y se sellan con tierra roja (Figura 2); la cámara de cría se ubica en punto medio del jobón y en los extremos, las abejas elaboran potes para miel y polen, al interior del jobón las abejas sellan las tapas con batumen, la cual es una mezcla de propóleos con tierra y/o algunas partes de las plantas (Figura 3).

Típicamente, el propóleos se recolecta mediante una técnica de raspado con espátula en la parte interna del jobón, evitando la contaminación y cuidando la cantidad tomada para no dejar desprotegida a la colonia (Yam *et al.*, 2019).



Figura 2. Jobón usado por un meliponicultor maya



Figura 3. Jobón abierto, se observa el propóleos al extremo izquierdo y tapizando el interior del tronco

Debido a que la composición química de los propóleos se encuentra relacionada con la vegetación visitada por las abejas (Figura 4), es importante mencionar la flora representativa en Yucatán.

El tipo de vegetación que se distribuye sobre la superficie del Estado de Yucatán lo conforman selvas bajas caducifolias y selvas medianas caducifolias (Duno de Stefano *et al*, 2018), durante los meses lluviosos, se cubre con tupido follaje de color verde claro que la hace fresca y vigorosa. En la temporada seca, cae más del 95% de las hojas y adquiere un aspecto seco, con muchos árboles que parecen muertos, sin embargo, en lo más agudo de la sequía, la selva se llena de color con la floración de muchos árboles desprovistos de hojas.

La composición de la flora de Yucatán está representada por especies como Ceiba, Cedro, Caoba, Guarumo, Balché, Chaká, Chiit, Jabín, Kitanché, Kuka, Makulis amarillo y rosa, Mangle rojo, Pich, Ramón, Roble, Tecoma, Zapote, Ciricote, en la mayoría de estas especies, parte de la planta puede ser utilizada en la medicina tradicional, para tratar trastornos respiratorios, diabetes, asma, padecimientos hepáticos y para eliminar verrugas (Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente, Gobierno del Estado de Yucatán, 2020).



Figura 4. *Melipona beecheii* recolectando polen, (Gailhampshire, 2016)

Definiendo propóleos, son una resina cerosa de composición compleja, que las abejas elaboran a partir de la recolección de partículas resinosas de yemas y hojas de plantas, mezcladas con polen y enzimas secretadas por las abejas. Este material resinoso es

utilizado por las abejas para la construcción, reparación y protección de la colmena (Jiang *et al.*, 2019).

La composición general en propóleos crudo consta de resinas y bálsamos (50%), contenidos muy variables de ceras (30%), aceites volátiles (10%); polen (5%) e impurezas (5%) (Anjum *et al.*, 2019).

La composición química de propóleos está conformada por flavonoides, ácidos fenólicos o sus ésteres, terpenos y taninos (Farré *et al.*, 2004), sin embargo, el material resinoso es altamente variable en composición y concentración, se ve afectado por factores como la especie de abeja productora, la estación del año y de la diversidad fitogeográfica (Farré *et al.*, 2004).

La importancia del propóleos como producto natural en la medicina alternativa ha crecido mundialmente, y es tal, que su consumo es de 700 a 800 t anuales, que sirven de base para la preparación de distintos productos.

Una forma típica de la preparación y consumo de propóleos es la tintura alcohólica, utilizando alcohol etílico al 70% (NOM, 2017); sin embargo, algunas investigaciones plantean la necesidad de obtener preparaciones con propóleos libres de alcohol y algunas tiendas de productos naturales han iniciado la comercialización de preparados oleosos de propóleos, tales como Beepothecary en Estados Unidos de América, Medicata en Lituania, Bonajour en Corea. A diferencia de los extractos alcohólicos de propóleos, hasta ahora, no hay muchos estudios que investiguen el perfil de metabolitos secundarios y las actividades biológicas de extractos oleosos, cuya diferencia entre ambas preparaciones, es el disolvente de extracción utilizado.

2.2 Composición química de propóleos de abejas sin aguijón

La popularidad de los propóleos de *Melipona* en América, ha impulsado investigaciones sobre su composición química a través de distintas metodologías de separación e identificación y la mayoría de los trabajos científicos utilizan HPLC o GC-MS como herramientas analíticas para obtener información sobre su caracterización, esto predominantemente en Brasil, aunque también en México existen pocas publicaciones al respecto (Popova *et al.*, 2019). En la tabla 1. se describe el tipo de compuesto

identificado en propóleos de diferentes especies de abeja *Melipona* y la metodología utilizada. Los grupos más importantes de compuestos bioactivos de propoleos de abejas *Melipona* son flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, glucogalinas, cumarinas y esteroides.

Tabla 1. Composición química en propóleos de abeja *Melipona*

Especie	Origen geográfico	Tipo de compuesto identificado	Método analítico	Referencias
<i>M. beecheii</i>	Yucatán, México	Triterpenos pentacíclicos	GC-MS	Yam-Puc <i>et al.</i> (2019)
	Veracruz, México	Monoterpenos, estirenos, benzaldehídos	HS-SPME GCTOFMS	Torres-González <i>et al.</i> (2016)
<i>M. fasciculata</i>	Baixada Maranhense, Brasil	Flavonoides	UV	Dutra <i>et al.</i> (2008)
	Maranhão, Brasil	Triterpenos, compuestos fenólicos, ácidos fenólicos	GC-MS UV	Batista <i>et al.</i> (2016)
	Maranhão, Brasil	Compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, galotaninos	HPLC-DAD-ESI-MS/MS	Dutra <i>et al.</i> (2014)
	Maranhão, Brasil	Triterpenos, alquilresorcinoles, alquilfenoles, compuestos fenólicos	GC-MS	Araújo <i>et al.</i> (2015)
	Maranhão, Brasil	Triterpenos, compuestos fenólicos,	GC-MS	Araújo <i>et al.</i> (2016a)

		alquilresorcinoles, polialcoholes		
	Tocantins, Brasil	Flavonoides, ácidos fenólicos	HPLC-UV- VIS	Araújo <i>et al.</i> (2016b)
<i>M. interrupta</i>	Amazonas, Brasil	Flavonoides	NMR, MS	da Silva <i>et al.</i> (2013)
<i>M. marginata</i>	Parana, Brasil	Flavonoides agliconas, ácidos diterpénicos, ácidos fenólicos, aldehídos fenólicos	UPLC- MS/MS	Cardozo <i>et al.</i> (2015)
<i>M. orbigny</i>	Mato Grosso do Sul, Brasil	Ácidos fenólicos, ácidos diterpenicos, alcoholes triterpenicos	GC-MS	Campos <i>et al.</i> (2014)
	Mato Grosso do Sul, Brasil	Glucogalinas, flavonoides agliconas diterpenos, triterpenos	HPLC-DAD- ESI-QTOF- MS	Santos <i>et al.</i> (2017)
<i>M. quadrifasciata</i>	Santa Catarina, Brasil	Flavonoides, ácidos fenólicos, compuestos fenólicos	HPLC-ESI- MS/MS	Hochheim <i>et al.</i> (2019)
	Santa Catarina, Brasil	Glucogalinas, flavonoides agliconas, ácidos diterpénicos, flavonoides, ácidos fenólicos	UPLC-ESI- QTOF-MS	Cisilotto <i>et al.</i> (2018)
	Santa Catarina, Brasil	Flavonoides, ácidos fenólicos	HPLC-UV	Dos Santos <i>et al.</i> (2017b)

	Santa Catarina, Brasil	Flavonoides, ácidos fenólicos	NMR	Dos Santos <i>et al.</i> (2017b)
	Parana, Brasil	Flavonoides agliconas, ácidos diterpénicos, ácidos fenólicos, aldehídos fenólicos	UPLC-MS/MS	Cardozo <i>et al.</i> (2015)
	São Paulo, Brasil	Compuestos fenólicos	UV	Manrique & Santana (2008)
	Santa Catarina, Brasil	Flavonoides, ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos, estilbenos	HPLC-DAD UPLC-Q/TOF-MS/MS	Torres <i>et al.</i> (2018)
<i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	Mato Grosso do Sul, Brasil	Glucogalinas, flavonoides agliconas diterpenos, triterpenos	HPLC-DAD-MS/MS	Dos Santos <i>et al.</i> (2017a)
	Mato Grosso do Sul, Brasil	Esteroles, triterpenos, flavonoides, ácidos fenólicos	GC-MS	Bonamigo <i>et al.</i> (2017)
	Mato Grosso do Sul, Brasil	Flavonoides agliconas, ácidos fenólicos, ácidos carboxílicos aromáticos, aldehídos fenólicos, ácidos fenólicos	HPLC-DAD	Bonamigo <i>et al.</i> (2017)
<i>M. scutellaris</i>	Tocantis, Brasil	Flavonoides, ácidos fenólicos	HPLC-UV-VIS	Araújo <i>et al.</i> (2016b)

	Bahia, Brasil	Ácidos fenólicos, coumarinas	NMR	Da Cunha <i>et al.</i> (2016a)
	Bahia, Brasil	Coumarinas	NMR	Da Cunha <i>et al.</i> (2016b)
	Bahia, Brasil	Benzofenona	NMR	Da Cunha <i>et al.</i> (2016c)
	Bahia, Brasil	Cumarinas	NMR	Franchin <i>et al.</i> (2016)
	Bahia, Brasil	Cumarinas	NMR	Da Cunha <i>et al.</i> (2017)
	Bahia, Brasil	Compuestos fenólicos	UV	Franchin <i>et al.</i> (2012)
<i>M. subnitida</i>	Paraiba, Brasil	Fenil propanoides, flavonoides agliconas	NMR, MS, UV	De Souza <i>et al.</i> (2013)
	de Pedra Branca, Brasil	Taninos hidrolizables, flavonas, xantonas, triterpenos pentacíclicos libres	Colorimetría, UV	De Sousa <i>et al.</i> (2015)

Fuente: Popova *et al.* (2019). GC-MS: Gas chromatography – mass spectrometry; GC-TOFMS: Gas chromatography – time of flight mass spectrometry; HPLC: High performance liquid chromatography; HPLC-DAD: High performance liquid chromatography with a diode array detector; HPLC-DAD-ESI-MS/MS: High performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry; HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS: High pressure liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry; HPLC-DAD-MS/MS: High performance liquid chromatography coupled with diode array detector and tandem mass spectrometry; HPLC-ESI-MS/MS: High pressure liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectroscopy; HPLC-UV: High performance liquid chromatography ultraviolet; HPLC-UV-VIS: High performance liquid chromatography with ultraviolet visible; HS-SPME: Headspace - solid phase microextraction; MS: Mass spectrometry; NMR: Nuclear

magnetic resonance; UPLC-ESI-QTOF-MS: Ultraperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole time of flight mass spectrometry; UPLC-MS/MS: Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer; UPLC-Q/TOF-MS/MS: Ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry; UV: Ultraviolet.

2.3 Propiedades antioxidantes de propóleos de abejas sin aguijón

Un antioxidante se define como una sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo en una molécula diana, como carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Gulcin, 2020). Dependiendo del origen se puede clasificar como sintético o natural, recientemente, ha ganado popularidad el estudio de los antioxidantes provenientes de fuentes naturales, esto para aplicación en la conservación de alimentos y en preparados medicinales para consumo humano (Shahidi *et al.*, 2015), debido a que se consideran más seguros, sin embargo, la seguridad de los antioxidantes naturales debe ser evaluada, esta se determina mediante estudios de toxicidad, el conocimiento sobre los compuestos químicos, así como la evaluación de posibles efectos acumulativos (Lourenço *et al.*, 2019). Varios autores han evaluado la toxicidad de extractos con el fin de demostrar que son seguros, Peng *et al.* (2016) evaluó el extracto de *Maydis stigma* rico en flavonoides, mediante la administración por vía oral a ratones, así como también empleando ensayos de micronúcleos y de malformación de espermatozoides, examinó la toxicidad subcrónica y la genotoxicidad del extracto, reportando que no se presentaron efectos tóxicos. En otro estudio, Arantes *et al.* (2019) realizó pruebas toxicológicas en ratones suizos, administrando aceites esenciales de hierbas aromáticas, revelando una baja toxicidad.

Aunque los resultados indican que el uso de antioxidantes naturales como alimento funcional, aditivo alimentario y remedio natural es potencialmente seguro, aun hacen falta investigaciones clínicas que permitan establecer la seguridad de distintos extractos con antioxidantes naturales en humanos (Carocho *et al.*, 2018).

Las plantas, son la principal fuente de antioxidantes naturales, producen una gran variedad de metabolitos secundarios capaces de protegerlas de efectos nocivos, como

flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, lignanos, terpenos, terpenoides, ácidos orgánicos, tocoferoles y pueden ser encontrados en semillas, raíz, tallos, flores, frutos, cortezas (Gulcin, 2020).

La finalidad de los antioxidantes es neutralizar radicales libres, los cuales son especies químicas altamente inestables que poseen uno o más electrones desapareados. El principio se basa en la disponibilidad de electrones para ser donados, por otro lado, la actividad antioxidante está relacionada con el número y la naturaleza del patrón de hidroxilación en el anillo aromático, cuanto mayor es el número de grupos hidroxilo en el anillo fenólico mayor es la capacidad para inhibir la oxidación. En humanos, el consumo de antioxidantes puede retardar el proceso de enfermedades crónicas como diabetes mellitus, desordenes neurodegenerativos y ciertos tipos de cáncer, así como también inhibir el proceso de peroxidación lipídica y con ello prevenir la aparición de enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis coronaria (Gulcin, 2020).

Los propóleos de abeja sin agujón se destacan por ser una fuente importante de antioxidantes, debido a esa característica, la actividad antioxidante es la más evaluada, frecuentemente mediante técnicas de actividad antiradicalaria por los métodos ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP, algunos autores han utilizado la técnica de decoloración de β -caroteno, incluso en algunos trabajos de investigación se han empleado técnicas que son más relevantes para la actividad en organismos vivos, como la inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos (Popova *et al.*, 2019).

En la tabla 2 se muestran los compuestos químicos asociados a propiedades antioxidantes en abejas sin agujón del género *Melipona* y resultados de la determinación de actividad antioxidante por distintos autores.

Tabla 2. Propiedades antioxidantes de propóleos de abejas *Melipona*

Especie	Origen geográfico	Compuesto identificado	Tipo de extracto	Actividad antioxidante	Referencia
<i>M. beecheii</i>	Yucatán, México	NI	Hidroalco hólico (etanol/a	DPPH [•] IC ₅₀ 32.47 μ g/mL	Sierra <i>et al.</i> (2019)

			gua 80:20 v,v)		
<i>M. fasciculata</i>	Maranhão, Brasil	Ácido gálico, triterpenos	Hidroalco hólico (etanol/ agua, 70:30 v/v)	DPPH [•] IC ₅₀ 4.24 - 44.44 µg/mL; FRAP IC ₅₀ 18.4 - 1.3 mmol Fe ²⁺ /g	Batista <i>et al.</i> (2016)
	Maranhão, Brasil	Ácido gálico, ácido elágico galotaninos	Hidroalco hólico (etanol/ agua, 70:30 v/v)	DPPH [•] IC ₅₀ 3.75 - 17.86 µg/mL; ABTS ^{•+} IC ₅₀ 1.44 - 16.29 µg/mL; FRAP 2.52 - 17.87 mmol Fe ²⁺ /g	Dutra <i>et al.</i> (2014)
	Tocantins, Brasil	Ácido gálico flavonoides, catequinas	Hidroalco hólico (etanol/a gua 80:20 v,v)	DPPH [•] CE ₅₀ 29.81 µg/mL	Araújo <i>et al.</i> (2016b)
<i>M. interrupta</i>	Amazonas, Brasil	5,7,4'-Trihidroxiflavonona, 3,5,6,7,4'-pentahidroxiflavonol, naringenina-4'-O-β-D-	Hidroalco hólico (etanol/ agua, 70:30 v/v)	FRAP 34.6 - 106.6 mmol Fe ²⁺ /mg extract; DPPH [•] CS ₅₀ 10 - 20.5 µg/mL	da Silva <i>et al.</i> (2013)

		glucopiranos ido, myricetina-3- O-β-D- glucopiranos ido			
<i>M. orbigny</i>	Mato Grosso do Sul, Brasil	Ácidos fenólicos, ácidos diterpénicos, alcoholes triterpénicos	Hidroalco hólico (etanol/a gua 80:20 v,v)	DPPH* IC ₅₀ 40 µg/mL; inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos 50 - 125 µg/mL	Campos <i>et al.</i> (2014)
	Mato Grosso do Sul, Brasil	Glucogalinas, flavonoides agliconas, diterpenos, triterpenos	Hidroalco hólico (etanol/ agua, 70:30 v/v)	DPPH* IC ₅₀ 18.3 µg/ml; ABTS** IC ₅₀ 10.3 µg/ml; actividad hemolítica en eritrocitos humanos 5 - 125 µg/mL	Santos <i>et al.</i> (2017)
<i>M. quadrifasciata</i>	Santa Catarina, Brasil	Aromadendrina, ácido p-cumárico, naringenina, catequina, epicatequina, pinocembrina	Hidroalco hólico (etanol/ agua, 70:30 v/v)	Inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos 32.50% a 8 mg/mL	Hochheim <i>et al.</i> (2019)

	Santa Catarina, Brasil	Rutina, quercetina, catequinas, ácidos fenólicos	Acuoso (agua ultra pura)	DPPH* IC ₅₀ 117.5 µg/mL; inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos 2.78% a 250 µg/mL	Dos Santos <i>et al.</i> (2017b)
	Santa Catarina, Brasil	Ácido gálico, vanillina, ácido p-cumarico, quercetina, diterpenos, estilbenos, triterpenos	Hidroalco hólico (etanol/agua, 70:30 v/v)	DPPH* IC ₅₀ 241.8 µg/mL	Torres <i>et al.</i> (2018)
<i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	Mato Grosso do Sul, Brasil	Glucogalinas, flavonoides agliconas, diterpenos, triterpenos	Hidroalco hólico (etanol/agua, 70:30 v/v)	DPPH* IC ₅₀ 28.9 µg/mL; ABTS*+ IC ₅₀ 9.5 µg/mL, inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos 80.9 % a 75 µg/mL	Dos Santos <i>et al.</i> (2017a)

Mato Grosso do Sul, Brasil	Esteroles, triterpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, flavonoides agliconas, ácido benzoico, vanillina, ácido cinámico	Hidroalco hólico (etanol/a gua 80:20 v,v)	DPPH* IC ₅₀ 60.91 µg/mL; ABTS*+ IC ₅₀ 13.45 µg/mL, inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos 37.7% a 125 µg/mL	Bonamigo <i>et al.</i> (2017)
<i>M. scutellaris</i>	Tocantis, Brasil Flavonoides, catequinas, ácido gálico, ácido elágico	Hidroalco hólico (etanol/a gua 80:20 v,v)	DPPH* EC ₅₀ 50.23 µg/mL	Araújo <i>et al.</i> (2016b)
<i>M. subnitida</i>	Paraiba, Brasil 6- <i>O-p</i> -Cumaroil- <i>D</i> -galactopiranososa, 6- <i>O</i> -cinamoil-1- <i>O-p</i> -cumaroil-β- <i>D</i> -glucopiranososa, flavonoides agliconas	Etanólico	DPPH* EC ₅₀ 10.1 µg/mL, ABTS*+ EC ₅₀ 4.3 µg/mL, blanqueamiento de β-caroteno, inhibición de oxidación 55.1%	De Souza <i>et al.</i> (2013)

Praiba, Brasil	Taninos hidrolizables, flavonas, xantonas, triterpenos pentacíclicos libres	Hidroalco hólico (etanol/ agua, 70:30 v/v)	DPPH* IC ₅₀ MIC 0.084 mg/mL	De Sousa <i>et al.</i> (2015)
-------------------	---	---	---	----------------------------------

Fuente: Lavinás *et al.* (2019) y Popova *et al.* (2019). ABTS^{•+}: ensayo del radical *ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico*; CS₅₀: concentración de un antioxidante capaz de secuestrar 50% de radicales libres; DPPH[•]: ensayo del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; EC₅₀: concentración efectiva media 50%; FRAP: Capacidad antioxidante por el ensayo del poder reductor férrico por sus siglas en inglés; IC₅₀: concentración media inhibitoria; NI: No identificado.

2.4 Métodos de extracción de propóleos

En la literatura científica se han reportado distintas metodologías para obtener extractos de propóleos, como maceración, extracción asistida con microondas, ultrasonido, extracción Soxhlet, y extracción por fluido supercrítico, empleando disolventes dirigidos para la extracción de compuestos fenólicos. En cualquiera de los casos se debe considerar algunos parámetros que influyen en las extracciones, como son el tipo y volumen de disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la proporción disolvente:propóleos, entre otros (Manchón Díez, 2015).

Recientemente, algunos autores han evaluado la eficiencia de extracción de distintas metodologías, como lo reportado por Oroian *et al.* (2020), quien utilizó la doble maceración (24 h a temperatura ambiente, con agitación continua a 250 rpm), doble extracción asistida con microondas (1 min a 140W) y doble extracción asistida por ultrasonido (15 min a 20 kHz) utilizando etanol al 70%; los autores reportaron que la extracción asistida por ultrasonido resultó en un rendimiento de extracción superior a la extracción por maceración y microondas, así como también, mayor concentración en

contenido de compuestos fenólicos totales, contenido de flavonas y flavonoles, contenido de flavanona y dihidroflavonol.

En otro estudio realizado por Devequi-Nunes *et al.* (2018), con tres tipos de muestras de propóleos, se contrastó la maceración (2 g de propóleos en 15 mL de etanol 80%, v,v, 70°C, 30 min, con agitación continua a 710 rpm) contra la extracción por fluido supercrítico (5 g de propóleos con 1% etanol como co-solvente, CO₂ como disolvente, presión de 350 bar, temperatura de 50°C, flujo de CO₂ 6 g por min⁻¹, tiempo de extracción de 60 min), el resultado mostró diferencias significativas entre los extractos (p< 0.05), las cuales están asociadas con su método de extracción, así como con el disolvente y origen botánico de las muestras. La extracción con fluido supercrítico no resultó eficiente para obtener extractos con el mayor contenido de compuestos antioxidantes, en comparación con los extractos obtenidos por maceración, probablemente debido a que la mayoría de los compuestos fenólicos polares son prácticamente insolubles en CO₂ puro (Monroy *et al.*, 2018), y aunque son suficientemente solubles en una mezcla de CO₂ y etanol, como en este caso, bajo las condiciones estudiadas en la investigación, se demuestra que no se logra la separación completa en base a pesos moleculares y polaridad.

A pesar de la existencia de diferentes métodos de extracción de propóleos (incluyendo los métodos convencionales y de química verde), los investigadores y la industria recomiendan métodos simples, seguros para el medio ambiente, y con bajo consumo de energía.

2.5 Uso de disolventes no alcohólicos para obtener extractos de propóleos

Aunque el etanol (naturaleza polar) es el disolvente más utilizado para la extracción de propóleos, en la actualidad se están probando otros disolventes no alcohólicos para extraer compuestos activos de propóleos, con la finalidad de reducir el uso de disolventes poco amigable con el medio ambiente y poco seguro para el consumidor (Pujirahayu *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de disolventes no alcohólicos que han sido evaluados para la extracción de compuestos fenólicos en propóleos son: aceite de oliva, β -CD (ciclodextrina) acuosa 1.5% v/v (Taddeo *et al.*, 2016), polietilenglicol (PEG), PEG mezclado con agua y aceite de oliva (Kubiliene *et al.*, 2015). Estos autores demostraron

que el disolvente influye significativamente en la extracción de compuestos en propóleos y se puede explicar principalmente en base a consideraciones estructurales.

En términos de rendimiento, Taddeo *et al.* (2016) informó que los compuestos ácido ferúlico y umbeliferona tienen mayor solubilidad en compuestos polares (β -ciclodextrina acuosa), los compuestos con una cadena lateral de 3,3-dimetilaliloxi como ácido boropínico y 7-isopenteniloxicumarina tienen un rango de lipofilicidad para el que pueden extraerse mejor indistintamente con un disolvente no polar (aceite de oliva) o el medio acuoso que contiene β -ciclodextrina, ya que en este caso ambos analitos pueden interactuar de manera efectiva con el ambiente lipofílico representado por la cavidad interna de β -ciclodextrina, conduciendo a un buen proceso de extracción.

Por otro lado, Kubiliene *et al.* (2015) concluyó que los disolventes no etanólicos (PEG 400, aceite de oliva y agua destilada) y el efecto de una temperatura más alta permitió una extracción más eficaz de los compuestos fenólicos del propóleos, además reportó que la concentración de compuestos fenólicos totales en estos extractos no difiere significativamente de la concentración encontrada en el extracto etanólico, y demostró la actividad antioxidante en los extractos no alcohólicos de su investigación.

Sin embargo, aún son escasos los datos sobre la actividad biológica y la composición química de los extractos de propóleos bajo estas alternativas (Carvalho *et al.*, 2011), por lo que en este trabajo se plantea obtener un extracto no alcohólico de propóleos y su caracterización química con enfoque en el perfil de compuestos fenólicos, esto empleando aceite virgen extraído de pepita de calabaza como disolvente de extracción, ya que no hay reportes del uso de este aceite para extraer los compuestos fenólicos específicamente de propóleos de *Melipona beecheii*.

Carvalho *et al.* (2011), encontraron que el extracto de propóleos utilizando aceite de canola mostró actividad antitumoral en ratones suizos y el extracto oleoso fue tan eficaz como el extracto etanólico al inhibir el crecimiento tumoral.

Así mismo, Reis *et al.* (2014) demostraron que el extracto oleoso (en aceite de canola) de propóleos ejerció efectos estimulantes, ansiolíticos y antidepresivos sobre el sistema nervioso central y actividad antioxidante en ratas, destacando la importancia del

propóleos como un potencial terapéutico para el deterioro conductual de la ansiedad y la depresión.

El fraccionamiento de un extracto oleoso (aceite de canola) de propóleos resultó en un producto con potencial antifúngico que inhibe *C. albicans*, identificando que los responsables de dicha actividad son los compuestos, isosakuranetina y kaempferide (Finger *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Silici y Baysa (2020), reportaron que el extracto oleoso de propóleos usando aceite de oliva mostró efecto antipirético en ratas Wistar y estos autores sugieren que el extracto oleoso tiene propiedades antioxidantes que puede ser una alternativa más saludable a los extractos alcohólicos.

Acorde a Keskin y Cetin (2020), el aceite de lavanda es un disolvente eficiente como el etanol y podría ser una nueva herramienta de administración de propóleos, especialmente para pacientes con cáncer. En otra investigación, Keskin (2020) concluye que el aceite de cáscara de naranja puede ser una alternativa de disolvente para la obtención de extracto de propóleos y que puede ser utilizado como medicina complementaria para el tratamiento de diabetes tipo 2.

2.5.1 El aceite virgen de calabaza como disolvente alternativo en la extracción de propóleos

Las tinturas alcohólicas de propóleos presentan desventajas, como el fuerte sabor residual y la intolerancia de algunos consumidores al alcohol (Kubiliene *et al.*, 2015), ya sea por motivos religiosos (Kazuma & Kenichi, 2001a), médicos, por ejemplo, en pacientes diabéticos (Carvalho *et al.*, 2011), así como también se prohíbe el uso de alcohol en niños cuando las soluciones y suspensiones de uso oral sobrepasan las dosis establecidas. Acorde a la NOM (2012), una solución o suspensión con un contenido entre 5 y 10% de alcohol, debe expresar una leyenda: "no se administre a menores de cinco años" y cuando el contenido alcohólico de la solución sea del 11% o mayor deberán expresar: "no se administre a menores de doce años"., por lo tanto, el aumento en la demanda de productos libres de alcohol por el consumidor, favorecen que los trabajos científicos se enfoquen en la preparación y caracterización de extractos con

disolventes verdes, amigables con el medio ambiente y con propiedades benéficas a la salud (Keskin *et al.*, 2020), (Huang *et al.*, 2020).

Desde la antigüedad, en el Estado de Yucatán, el cultivo y consumo de calabazas se considera tradicional y la especie, xká o xtóop' (*Cucurbita argyrosperma* Huber), también conocida como calabaza chihua, es apreciada por sus pepitas, a las cuales se les atribuye la aportación de nutrientes que van desde proteínas, ácidos grasos insaturados, antioxidantes, ácido fólico, vitamina E, zinc etc. México se encuentra entre los países productores de calabaza, estas generalmente se consumen como aperitivo o de manera culinaria (sevillana de comercio exterior, 2015), cabe resaltar que de ellas se puede extraer aceite, del cual los ácidos grasos predominantes son el ácido linoleico y el ácido oleico (Rezig *et al.*, 2012), además puede contener diversos compuestos no triacilglicéridos, que pueden contribuir positivamente a la salud, como compuestos fenólicos (51.0–3560.0 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/kg de aceite), carotenoides (5.0–26.80 µg de β-caroteno/g de aceite), tocoferoles (38.03–418.66 mg/100 g de aceite), esteroides (127.88–843.50 mg/100 g de aceite) y escualeno (559.60–763.30 mg/100 g de aceite) (Andjelkovic *et al.*, 2010; Rabrenović *et al.*, 2014; Rezig *et al.*, 2012; Veronezi *et al.*, 2012).

Por otra parte, Can-Cahuich *et al.* (2019) caracterizaron el aceite de *Cucurbita argyrosperma* extraído por prensado mecánico y disolvente orgánico. Estos autores demostraron que el aceite virgen de *Cucurbita argyrosperma* cultivado en Yucatán contiene niveles importantes de fucosterol, δ-tocoferol, luteína, quercetina y crisina con alto poder reductor.

En estudios previos, se ha demostrado que los ácidos grasos son agentes extractantes efectivos, ya que se puede obtener un contenido de flavonoides similar al extraído con etanol, alternativamente, con ese tipo de extractos oleosos se pueden producir cápsulas, sin necesidad de eliminar ningún disolvente, además, puede ser utilizado de manera tópica (Pujirahayu *et al.*, 2014).

3. Justificación

Nos encontramos en una época moderna en la cual la población se inclina por consumir productos naturales para la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, en el caso del uso de propóleos, la manera tradicional es a través de tintura alcohólica, sin embargo, son muchas las limitantes de esta presentación en cuanto a consumidor, industrialización y medio ambiente. El alto contenido de etanol en tinturas alcohólicas representa un sabor desagradable para los consumidores, además se encuentra restringido en niños y prohibido en algunas religiones; en cuanto a la industrialización, presenta desventajas en aplicaciones cosméticas y farmacéuticas, ya que por su efecto irritante no puede ser administrado en piel, cuero cabelludo, heridas abiertas y membranas mucosas; por otro lado, la utilización de disolventes orgánicos como agentes de extracción es poco amigable con el medio ambiente.

Para la extracción de propóleos, existen una tendencia a sustituir el etanol con nuevos disolventes, sustentables, seguros y más saludables, esto impulsa un mercado de nuevas presentaciones farmacéuticas, con posibilidad de aplicación en odontología, oftalmología, otorrinolaringología, pediatría, diabetes, pacientes con cáncer y personas intolerantes al alcohol. De hecho, al utilizar nuevos disolventes se espera una variabilidad cualitativa o cuantitativa de compuestos bioactivos, ya que la solubilidad del propóleos difiere según el disolvente utilizado y entonces, es conveniente la caracterización de dichos extractos. Además, el uso de nuevos disolventes implica evaluar las condiciones de extracción en propóleos, tales como tamaño de partícula, temperatura, tiempo de extracción, proporción solvente/propóleos, entre otras, con la finalidad de maximizar el contenido de compuestos fenólicos y actividad biológica.

Por lo tanto, en esta investigación, se pretende encontrar un sistema de extracción no alcohólico que permita obtener un extracto de propóleos atractivo para nuevas aplicaciones biológicas, así como también su caracterización química con enfoque en el perfil de compuestos fenólicos, esto empleando aceite virgen extraído de semillas de calabaza como disolvente de extracción, ya que no hay reportes del uso de este aceite para extraer los compuestos fenólicos específicamente de propóleos de *Melipona beecheii*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar parcialmente un extracto oleoso de propóleos de *Melipona beecheii*, para generar un producto de propóleos no alcohólico con propiedades bioactivas.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar las condiciones de extracción de propóleos (relación aceite de calabaza-propóleos y tiempo de extracción) para la preparación de un extracto oleoso con mayores propiedades bioactivas utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR).
- b) Caracterizar el extracto bioactivo oleoso de propóleos obtenido bajo condiciones mejoradas de extracción mediante su contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante (DPPH[•] y ABTS^{•+}).
- c) Identificar la presencia de compuestos fenólicos individuales en el extracto bioactivo oleoso de propóleos mediante HPLC-LTQ-ORBITRAP-MS.

5. Metodología

5.1. Estrategia general de trabajo

En función de los objetivos, la presente investigación consistió en dos etapas de experimentación.

En la primera etapa se realizó la colecta de propóleos en un meliponario mediante el método de raspado y, posteriormente se evaluaron los parámetros de color CIE y actividad de agua. Dentro de esta etapa, se planteó una estrategia para obtener un extracto oleoso con alto potencial bioactivo bajo ciertas condiciones de extracción, a

través de un diseño experimental central compuesto con la metodología de superficie de respuesta (MSR), en donde los factores independientes evaluados fueron la relación aceite de calabaza/propóleos *M. beecheii* y tiempo de extracción. El análisis de los datos se realizó a través de los gráficos de superficie de respuesta y análisis de varianza para evaluar la influencia de las variables independientes e interacción sobre las variables de respuesta. Como estrategia para encontrar las condiciones de la máxima actividad antioxidante, se realizó una optimización de múltiples respuestas. Después de mejorar el proceso de extracción para la obtención de un extracto oleoso bioactivo, se comparó el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante DPPH[•] y ABTS^{•+} entre los valores experimentales y predichos por el modelo.

La segunda etapa del trabajo corresponde a la identificación de compuestos, del extracto mejorado, que estén relacionados con actividad antioxidante mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

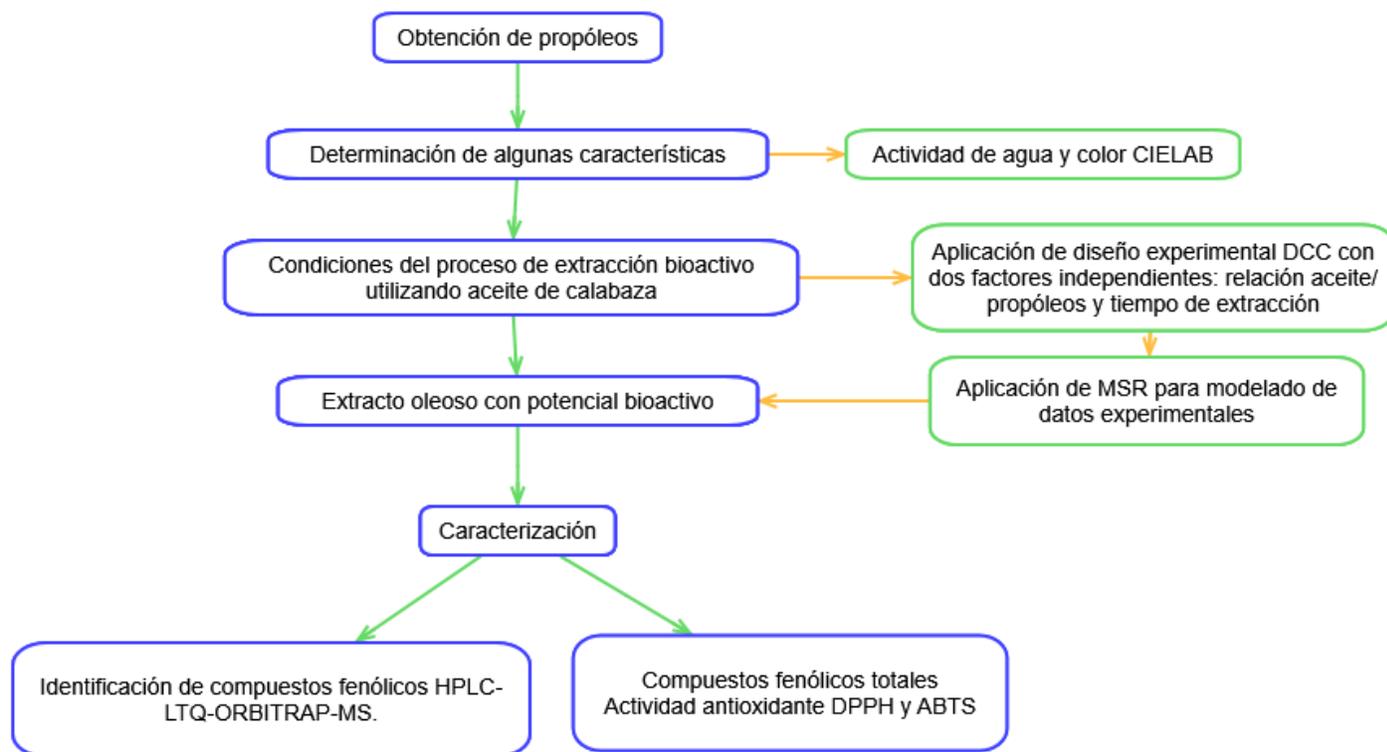


Figura 5. Estrategia general de trabajo de investigación

5.2. Químicos y reactivos

Folin Ciocalteu, cloruro de aluminio, carbonato de sodio. ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}), persulfato de potasio, ensayo del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]), nitrito de sodio, ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), hidróxido de sodio, hexano, metanol, etanol, acetonitrilo grado HPLC, metanol grado HPLC, agua HPLC, estándares de 3,3',4',5,6-pentahidroxi-7-flavona (Quercetina), ácido gálico, ácido vanílico, ácido elágico, ácido siríngico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido p-cumárico, artemisinina, ácido sinápico, drupanina, hidroxitirosol, fenetil ester del ácido caféico (CAPE), ácido cinámico, catequina, epicatequina, kaempferol, quercetina, rutina, fisetina, galangina, pinobanksina, isorhamnetina, miricetina, ciranósido, apigenina, crisina, luteolina, genisteina, ambanol, pinocembrina, hesperetina, naringenina, glabrol, taxifolina fueron compradas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), agua ultra pura fue obtenida utilizando un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos los reactivos fueron de grado analítico excepto las fases móviles, las cuales fueron de grado cromatográfico.

5.3. Obtención de propóleos crudo

El propóleos crudo de *Melipona beecheii* fue recolectado (Enero 2019) con espátulas en un meliponario del municipio de Mama, Yucatán (20° 28' 36" Norte, 89° 21' 53" Oeste). Esta localidad tiene un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, una temperatura media anual de 26.1°C y precipitación pluvial promedio de 73 mm (INAFED, 2020). La flora predominante del municipio de Mama, Yucatán es la selva baja caducifolia, representada por chechén (*Metopium brownei*), bonete (*Jacaratia mexicana*) y amapola (*Pseudobombax ellipticum*), de acuerdo con lo reportado por la secretaría de fomento económico y trabajo, del gobierno del Estado de Yucatán 2018-2024. La fuente botánica propuesta fue la resina del árbol *Bursera simaruba*, también conocido como chaká en maya (Herrera *et al.*, 2019).

El propóleos crudo se caracterizó por su valor promedio de actividad de agua ($a_w=0.422$) y color $L^*=28.22$, $a^*=2.06$, $b^*=8.84$, ángulo de tono=76.49 y cromaticidad $C^*=9.10$ (color marrón, figura 6). Una vez determinadas las características del propóleos, se almacenó a -20°C bajo condiciones de oscuridad, posteriormente, fue pulverizado por acción mecánica, sometido a liofilización en un equipo Labconco Freezone operado a -42°C , y 0.013 mBar durante un periodo de 24 h en oscuridad y finalmente, almacenado en una bolsa de polietileno protegida de la luz a -20°C hasta su utilización.



Figura 6. Propóleos de *Melipona beecheii* del municipio de Mama, Yucatán, Enero 2019

5.4. Extracción de aceite de pepita de *C. argyrosperma*

Se adquirieron 20 kg de pepitas (sin cáscara) de calabaza (*C. argyrosperma* Huber) a un pequeño productor en Mérida, Yucatán, México, figura 7. El producto fue molido (Osterizer) hasta obtener un polvo, posteriormente fue almacenado en una bolsa de polietileno protegida de la luz de 4°C - 8°C hasta su utilización. La extracción de aceite de pepita de calabaza se realizó con un aparato Soxhlet utilizando n-hexano (500 mL) como disolvente orgánico, por ciclos térmicos a 76°C por 4 h, para remover los restos de disolvente se utilizó un rotoevaporador a 40°C (Buchi, Flawil, Switzerland), de acuerdo con el procedimiento descrito por Can-Cauch *et al.* (2019).



Figura 7. Pepita de calabaza (*C. argyrosperma* Huber) sin cáscara utilizado en la extracción de aceite

5.5. Obtención de extracto oleoso de propóleos

5.5.1. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental central compuesto (DCC) se utiliza para definir ciertos experimentos con propósito de optimización de un sistema complejo. Para mejorar un proceso de extracción para la obtención de un extracto de propóleos con mayor contenido de CFT y actividad antioxidante, se utilizó el DCC rotante, 2^2 con 4 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 5 puntos centrales, resultando con un total de 13 corridas experimentales (Tabla 3). Los factores independientes evaluados fueron relación aceite a propóleos (X_1 , mL/g) y el tiempo de extracción (X_2 , d), mientras que las variables de respuesta fueron el contenido de CFT y actividad antioxidante. La tabla 4 muestra los factores con sus respectivos niveles analizados en DCC. Los niveles de cada factor fueron determinados conforme a la información reportado en la literatura y en los ensayos previos. El valor más bajo y alto de cada variable es codificado como $-\alpha$ (-1.41421) y $+\alpha$ ($+1.41421$), respectivamente, el valor codificado como "0" representa valores centrales de las variables y se repite por el error experimental, los puntos factoriales se codifican como ± 1 .

El análisis estadístico fue realizado utilizando el Statgraphics centurión XVI.I y los datos experimentales fueron ajustados a un modelo de regresión polinomial de segundo orden para obtener los coeficientes de regresión (β), expresada por la ecuación:

$$Y = \beta_{\theta} + \sum_{i=1}^K \beta_i X_i + \sum_{i=1}^K \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^K \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde Y es la variable de respuesta o dependiente, X_i y X_j son las variables independientes, y k es el número de variables analizadas ($k=2$). El coeficiente de regresión se define como β_{θ} para el intercepto, β_i para lineal, β_{ii} para cuadrática y β_{ij} para término de producto cruzado.

El análisis de varianza (ANOVA), la determinación de los coeficientes de regresión y la construcción de gráficos tridimensionales se realizaron utilizando el software Statgraphics centurión XVI.I; la adecuación y calidad de ajuste de la ecuación polinomial para cada respuesta fue estimada utilizando el coeficiente de determinación (R^2). La significancia de los términos de la ecuación polinomial fue analizada estadísticamente por cómputo del valor de F a $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron aleatoriamente (para minimizar el efecto de la variabilidad no explicada) y por triplicado.

El proceso de extracción se optimizó mediante la metodología de superficie de respuesta con el objetivo de obtener un extracto oleoso con mayor contenido de CFT y actividad antioxidante. Se llevó a cabo una optimización simultánea a partir de la función de deseabilidad general y el análisis gráfico de la superficie de respuesta (gráfico de contorno) de modelos ajustados.

Se realizó un experimento por triplicado en las condiciones óptimas y el valor promedio del contenido de CFT y actividad antioxidante obtenido del experimento fue comparado con el valor predicho del modelo.

Tabla 3. Diseño experimental para el proceso de extracción oleosa de propóleos de abeja *Melipona beecheii*

Tratamiento	Código de variables		Relación aceite/propóleos (mL/g)	Tiempo de extracción (d)
	X_1	X_2		

T1	-1	-1	25	2
T2	1	-1	55	2
T3	-1	1	25	6
T4	1	1	55	6
T5	- α	0	18.7868	4
T6	+ α	0	61.2132	4
T7	0	- α	40	1.17157
T8	0	+ α	40	6.82843
T9	0	0	40	4
T10	0	0	40	4
T11	0	0	40	4
T12	0	0	40	4
T13	0	0	40	4

X_1 =Relación aceite/propóleos (mL/g), X_2 =Tiempo de extracción (días), $\alpha=(2^n)^{1/4}$,
 n =Número de variables independientes.

Tabla 4. Factores y los niveles de variables para el diseño experimental

Variables independientes	Variables con sus niveles codificados				
	-1.41421	-1	0	1	+1.41421
Relación aceite/propóleos (mL/g)	18.7868	25	40	55	61.2132
Tiempo de extracción (días)	1.17157	2	4	6	6.82843

5.5.2. Procedimiento para la extracción de propóleos

Se realizó una extracción sólido-líquida de propóleos utilizando aceite crudo de calabaza y otra extracción utilizando etanol como disolvente de extracción.

5.5.2.1. Extracción oleosa de propóleos

Para la extracción con aceite de calabaza, el propóleos crudo (previamente congelado y pulverizado) fue mezclado a una proporción X_1 (mL/g) a diferentes tiempos de extracción

X₂ (d), con agitación constante (Rotatest ping-pong, modelo 51500-10 Cole-Parmer) a 250 rpm bajo condiciones de oscuridad. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 1983 g durante 10 min a 20°C para recuperar el sobrenadante (extracto oleoso). El extracto oleoso fue particionado en metanol (proporción 1:1) (80%, v/v, en agua destilada) de acuerdo con lo descrito por Can-Cauich *et al.* (2019). La fase acuosa se secó en un evaporador rotatorio a presión reducida y el extracto oleoso seco se re-suspendió en 3 mL de metanol grado HPLC.

5.5.2.2. Extracción etanólica de propóleos

Para la extracción etanólica, el propóleos en polvo (6 g) fue expuesto a extracción con 20 mL de etanol (96%, v/v) con agitación constante (250 rpm) por 14 d a 20°C bajo oscuridad. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 1983 g por 10 min a 20°C y el sobrenadante resultante se filtró con papel Whatman™ No. 4.

Los extractos oleosos y etanólicos se almacenaron a –20°C bajo condiciones de oscuridad para evitar posibles cambios en su composición.

5.5.3. Métodos analíticos

5.5.3.1. Rendimiento de extracción

Se determinó el rendimiento de extracción por evaporación del extracto oleoso y etanólico hasta peso constante en una estufa de acuerdo con Oroian *et al.* (2019). El rendimiento de extracción se calculó como:

$$\text{Rendimiento de bálsamo (\%)} = \frac{\text{Peso de extracto seco}}{\text{Peso de propóleos crudo}} * 100$$

5.5.3.2. Determinación de los contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT)

Se determinó el contenido de CFT y FT de los extractos oleoso y etanólico, siguiendo el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (765 nm) y cloruro de aluminio (415 nm),

respectivamente, descrito por Moo-Huchin *et al.* (2015). Los extractos etanólicos y oleosos se diluyeron 3 veces para los análisis de FT. Los resultados se expresaron como mg equivalente al ácido gálico/g de extracto seco (ES) para CFT y como mg equivalentes a quercetina/g ES para FT.

5.5.3.3. Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante DPPH[•] y ABTS^{•+} de los extractos oleoso y etanólico de acuerdo con el procedimiento descrito por Moo-Huchin *et al.* (2015). Los extractos etanólicos se diluyeron 10 veces para los análisis. Para ambos ensayos, la actividad antioxidante se expresó como mM equivalentes a Trolox/g ES).

5.5.3.4. Cinética del porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} y DPPH[•]

Se realizó una cinética para determinar el porcentaje remanente del radical ABTS^{•+} y DPPH[•] en un extracto oleoso y etanólico de propóleos respectivamente, de acuerdo con el procedimiento descrito por Moo-Huchin *et al.* (2015), tomando como criterio para detener las lecturas, variaciones de absorbancia en torno a 0.003/minuto, lo cual indica que la reacción fue completa y estable, de acuerdo con lo descrito por Schlesier *et al.* (2002).

5.5.3.5. Perfil fenólico mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

Para realizar la separación de compuestos fenólicos en las muestras EOP (extracto oleoso de propóleos) y EEP (extracto etanólico de propóleos), se utilizó un cromatógrafo Accela (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) equipado con una bomba cuaternaria, un detector de matriz de fotodiodos (PDA) y un inyector automático termostatzado para el análisis de cromatografía líquida. El volumen de inyección fue de 2 µL y la velocidad de flujo se ajustó a 0.6 mL/min (López-Yerena *et al.*, 2020). La separación cromatográfica se realizó a través de una columna Acquity UPLC® BEH C18 (2.1 x 100 mm, d.i., tamaño de partícula de 1.7 µm), empleando una pre-columna Acquity UPLC® BEH C18 (2.1 x 5 mm, d.i., tamaño de partícula de 1.7 µm) (Waters

Corporation®, Irlanda), y la temperatura de la columna fue de 50 ° C. Las fases móviles fueron H₂O (A) y acetonitrilo (B), ambas con 0.1% de ácido fórmico (Pandey *et al.*, 2015). Se usó un gradiente lineal creciente (v / v) de B (t (min), % B), como sigue: (0, 5); (5, 5); (25, 40); (25.2, 100); (27, 100); (27.2, 5); (30, 5), a un caudal constante de 0.6 mL · min⁻¹. La identificación se realizó mediante un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) equipado con una fuente de ESI en modo negativo para mediciones de masa precisa, la fuente de voltaje fue de 4 Kv, la temperatura capilar de 275° C (FT control de ganancia automática objetivo 5 x 10⁵ para modo MS y 5 x 10⁴ para modo MSn). Las unidades arbitrarias se usaron para gas de revestimiento, gas auxiliar y gas de barrido (20, 10 y 2, respectivamente), en todos los casos empleando nitrógeno de alta pureza (>99.98%). Las muestras se analizaron en modo de exploración completa con un poder de resolución de 30,000 a *m/z* 400, los eventos MS/MS dependientes de los datos se obtuvieron con un poder de resolución de 15,000. Los iones más intensos detectados durante la exploración completan MS activaron la exploración dependiente de los datos. Los iones que no fueron lo suficientemente intensos para una exploración dependiente de datos se analizaron en modo MSn con la misma resolución de orbitrap (15,000 a *m/z* 400). Se usó un ancho de aislamiento de 100 UMA y los precursores se fragmentaron por una trampa C de disociación inducida por colisión (CID) con una energía de colisión normalizada de 35 V y un tiempo de activación de 10 ms. El rango de masa en el modo FTMS fue de 100 a 1500 *m/z*. El análisis de datos se logró utilizando el software XCalibur v2.0.7 (Thermo Fisher Scientific). Se realizó una calibración externa para la precisión de la masa antes del análisis (Quifer-Rada, *et al.*, 2015).

6.0. Resultados y discusión

6.1. Cinética del porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} y DPPH[•]

El porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} y DPPH[•] a través del tiempo, permite obtener el tiempo necesario para que la reacción entre el radical sintético y los antioxidantes del extracto de propóleos alcancen una estabilidad y se pueda definir el tiempo de reacción para cada ensayo de actividad antioxidante.

Los cambios a través del tiempo del porcentaje remanente ABTS^{•+} debido al extracto EOP y EEP se muestra en la figura 8. De forma general, se observa una tendencia a la disminución de radical ABTS^{•+} para ambos extractos; sin embargo, el EOP logró una estabilidad tras 295 min de reacción, mientras que el EEP alcanzó la estabilidad en la reacción a 115 min. Esto sugiere que el EOP tiene una capacidad de secuestro de radicales libres de forma más lenta en comparación al efecto del EEP.

Esta diferencia, probablemente está relacionada con que el EOP puede presentar un mayor contenido de compuestos fenólicos extraídos, lo cual está asociado al tipo de disolvente y su polaridad, ya que este influye en la eficiencia de extracción de compuestos siguiendo la regla de oro “lo similar disuelve a lo similar” Panja, P. (2018), considerando que en cada tipo de propóleos existen una gran variedad de compuestos fenólicos y que se pueden presentarse como agliconas (sin azúcares adheridos) o glucósidos (O - glucósidos, con azúcar unido al grupo hidroxilo de la aglicona, o C - glucósidos, con la porción de azúcar unida al carbono (C) de la aglicona) (Farooqui *et al.*, 2017), se espera que el tipo de compuestos fenólicos extraídos con aceite sea distinto al obtenido con etanol, ya que la mayoría de los glucósidos fenólicos son solubles en agua, pero las agliconas normalmente lo son menos (Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018).

En este sentido, se considera que el EOP puede tener aplicaciones en el área de alimentos como conservador natural de aceites u otros productos, Gulcin (2020) describe que los antioxidantes sintéticos como BHA (Hidroxianisol butilado), BHT (Hidroxitolueno butilado), TBHQ *tert*-butilhidroquinona, PG (Galato de propilo), son comúnmente agregados en aceites y alimentos que contienen grasa, con la finalidad de prevenir o retrasar la aparición de la oxidación de lípidos durante el procesamiento y almacenamiento, sin embargo, Gulcin (2020) reporta que se han planteado crecientes preocupaciones sobre su bioseguridad. Estudios previos han reportado que TBHQ podrían inducir la producción de peróxido y daño al ADN, aumentando la posibilidad de generar efectos cancerígenos (Eskandani *et al.*, 2014). En otro estudio, Yang *et al.* (2018) trabajaron con un modelo animal zebrafish, en donde concluyeron que los antioxidantes fenólicos sintéticos, como BHA, podrían ejercer efectos de alteración endocrina, por otro lado, reportó que las exposiciones a TBHQ provocan retraso en la organogénesis durante las primeras etapas de desarrollo del pez. Es por esta preocupación que los antioxidantes

naturales como los contenidos en propóleos se han vuelto cada vez más atractivos para el consumo humano, aumentando el número de trabajos científicos para evaluar su seguridad.

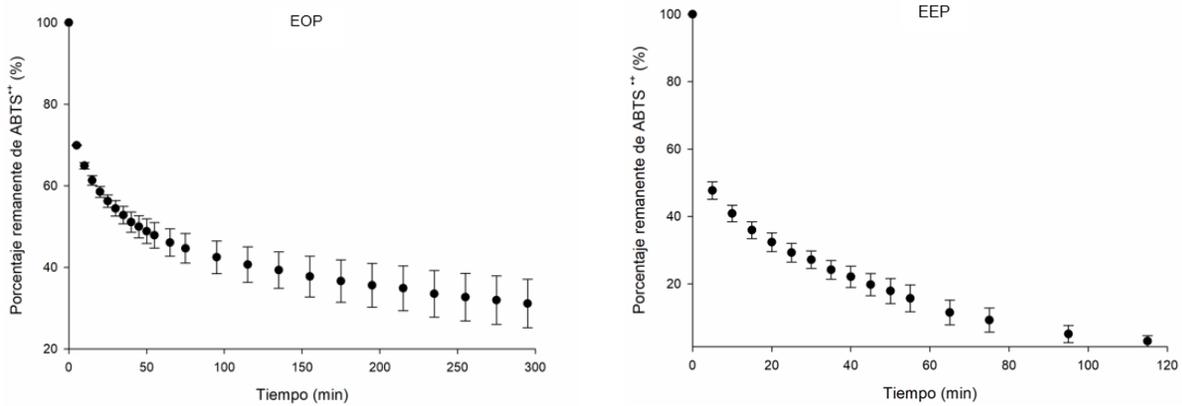


Figura 8. Cinética para determinar el porcentaje remanente del radical ABTS^{•+} en un extracto oleoso de propóleos (EOP) y un extracto etanólico de propóleos (EEP) diluido 1:10

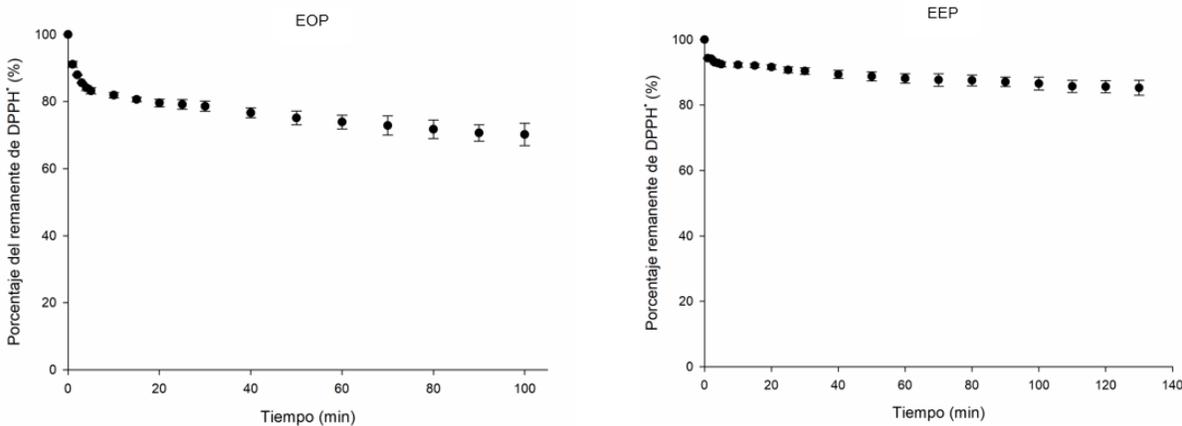


Figura 9. Cinética para determinar el porcentaje remanente del radical DPPH[•] en un extracto oleoso de propóleos (EOP) y un extracto etanólico de propóleos (EEP) diluido 1:10

Al analizar la cinética resultante en el porcentaje remanente del radical DPPH[•] de ambos extractos, se observa que EOP resultó en una disminución mayor del radical DPPH[•] (entre 1 y 10 min) en relación con EEP; lo cual indica que la actividad antioxidante se completó en menos tiempo por efecto de EOP. La actividad antioxidante se completó tras 100 y 130 min para EOP y EEP, respectivamente.

Esto probablemente se deba al rendimiento del EOP, ya que cuanto mayor sea la concentración de compuestos fenólicos, como flavonoides y ácidos fenólicos, mayor es el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH[•], realizándose a través del mecanismo de donación de átomos de hidrógeno de los antioxidantes presentes en la muestra (Darmajana *et al.*, 2017).

En otro resultado, se encontró que ambos extractos reducen más el radical ABTS^{•+} que el radical DPPH[•]. Esto puede ser explicado por la alta selectividad del radical DPPH[•], ya que no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B (por mencionar: galangina, pinobanksina, pinocembrina, crisina), ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (como el ácido *p*-cumárico), mientras que el radical ABTS^{•+} reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado (Roginsky y Lissi, 2005).

6.2. Análisis de superficie de respuesta para CFT

El contenido de CFT de los extractos oleosos de propóleos se muestra en la tabla 5 y el análisis de varianza (ANOVA) se muestra en la tabla 6. La significancia de cada término fue evaluada de acuerdo con los valores de *p*. El modelo fue estimado por MSR, considerando únicamente los términos significativos, la ecuación polinomial para CFT fue:

$$Y_{\text{CFT}} = 7.48 - 2.26X_1 + 0.28X_2 - 0.49X_{11} + 0.31X_{22} + 0.31X_1X_2$$

Con base en el análisis estadístico, el modelo ajustado resultó significativo a un valor *F* de 169.52 y el valor de *p* fue más pequeño que 0.05, lo cual indica que las variables del

modelo de regresión afectan significativamente al CFT. En lo general, los valores R^2 superiores de 0.90 se consideran que tienen una correlación muy alta (Prakash et al., 2013) y en este trabajo se obtuvieron coeficientes de determinación satisfactoria, R^2 (0.9918) y R^2 ajustada (0.9860), lo cual indica que el modelo de superficie de respuesta podría explicar el 99% de la variación de la variable CFT, lo que sugiere que la variabilidad de la respuesta resultó explicada por el modelo. El valor p de 4.29 corresponde a la falta de ajuste no significativo, lo que demuestra que los modelos son precisos para predecir CFT. El contenido de CFT fue principalmente influenciado por los términos X_1 , X_{11} y X_{22} , seguido de X_2 y X_{12} . Los términos X_1 y X_{11} demuestran un efecto negativo sobre CFT. Los resultados del efecto de la relación disolvente a propóleos y el tiempo de extracción, muestran que a medida que disminuye la relación aceite a propóleos a diferentes tiempos de extracción, el contenido CFT gradualmente aumenta (Figura 10a).

6.3. Análisis de superficie de respuesta para actividad antioxidante

La actividad antioxidante DPPH[•] y ABTS^{•+} de los extractos oleosos y los resultados de ANOVA se muestran en tabla 5 y 6, respectivamente. Tras el análisis de regresión múltiple sobre los datos experimentales, el modelo fue estimado por MSR, sin considerar los términos no significativos, lo cual fue expresado de la siguiente manera:

$$Y_{ABTS^{•+}} = 13.63 - 5.61X_1 - 2.26X_2 - 0.98X_{11} - 1.92X_{22}$$

$$Y_{DPPH^{•}} = 911.65 - 379.68X_1 - 82.75X_2 - 42.70X_{22}$$

Tabla 5. Diseño experimental con respuesta de las variables dependientes bajo diferentes condiciones de extracción

Tratamiento	X_1	X_2	CFT	ABTS ^{•+}	DPPH [•]
-------------	-------	-------	-----	--------------------	-------------------

	(mL/g)	(días)	(mg EAG/g ES)	(mM Equivalentes a Trolox/g ES)	(μ M Equivalentes a Trolox/g ES)
1	25	2	9.84 \pm 0.80	20.14 \pm 1.79	1356.3 \pm 9.99
2	55	2	4.33 \pm 0.25	5.99 \pm 0.53	535.02 \pm 28.83
3	25	6	9.70 \pm 0.00	14.14 \pm 1.51	1169.63 \pm 24.27
4	55	6	5.45 \pm 0.00	3.78 \pm 0.17	372.61 \pm 3.45
5	18.7868	4	9.39 \pm 0.39	18.59 \pm 0.92	1386.57 \pm 102.48
6	61.2132	4	3.50 \pm 0.01	4.18 \pm 0.39	383.07 \pm 1.66
7	40	1.17157	7.61 \pm 0.01	13.00 \pm 0.78	934.98 \pm 46.04
8	40	6.82843	8.48 \pm 0.39	6.00 \pm 0.43	713.68 \pm 39.95
9	40	4	7.55 \pm 0.35	12.76 \pm 0.39	931.78 \pm 49.79
10	40	4	7.39 \pm 0.08	13.43 \pm 0.30	937.79 \pm 5.07
11	40	4	7.68 \pm 0.09	14.47 \pm 0.85	905.00 \pm 9.23
12	40	4	7.29 \pm 0.10	13.57 \pm 0.87	886.00 \pm 12.11
13	40	4	7.45 \pm 0.33	13.88 \pm 0.27	897.65 \pm 37.86

X_1 =Relación aceite/propóleos, X_2 =Tiempo de extracción, ES= extracto seco. Valores promedios \pm desviación estándar (n=6).

Tabla 6. ANOVA para los modelos polinomiales cuadráticos predichos para polifenoles totales y actividad antioxidante

Fuente	CFT		ABTS ^{•+}		DPPH [•]	
	Coefficiente	Valor p	Coefficiente	Valor p	Coefficiente	Valor p
Intercepto						
X ₀	7.48		13.63		911.65	
X ₁	-2.26	<0.0001	-5.61	<0.0001	-379.68	<0.0001
X ₂	0.28	0.0115	-2.26	0.0001	-82.75	0.0002
X ₁₁	-0.49	0.0008	-0.98	0.0164	-12.46	0.3376
X ₂₂	0.31	0.0095	-1.92	0.0005	-42.70	0.0096
X ₁₂	0.31	0.0290	0.95	0.0542	6.07	0.7152
Valor F (modelo)	169.52	<0.0001	96.65	<0.0001	239.60	<0.0001
Valor F (falta de ajuste)	4.29	0.097	2.68	0.1822	3.45	0.1311
R ²	0.9918		0.9857		0.9942	
R ² ajustado	0.9860		0.9755		0.9900	

X₁= Relación aceite a propóleos; X₂=Tiempo de extracción. $p < 0.05$ es considerado como significativo.

El análisis de varianza indica que los modelos de regresión para la actividad antioxidante resultaron altamente significativos debido a los valores de F 96.65 y 239.60, para ABTS^{•+} y DPPH[•], respectivamente a un nivel de probabilidad $p < 0.0001$ para ambas respuestas, lo que sugiere que la razón de varianza de Fisher's calculada a este nivel fue lo suficientemente grande como para justificar un alto grado de adecuación del modelo cuadrático (Prakash et al., 2013). La falta de ajuste asociado con el valor p de 0.18822 y 0.1311 para ABTS^{•+} y DPPH[•], respectivamente, se demuestra que no es significativo, lo cual indica que el modelo se ajusta a los datos. Adicionalmente, los modelos obtuvieron un valor de R² (0.9857 y 0.9942, para ABTS^{•+} y DPPH[•], respectivamente) y R² ajustado (0.9755 y 0.9900, respectivamente) muy satisfactorio. ABTS^{•+} fue principalmente influenciado por X₁, X₂ y X₂₂, seguido de X₁₁. El DPPH[•] se vio afectado principalmente por X₁, X₂, seguido de X₂₂. Como se muestra en la figura 10b y 10c, a nivel bajo de

relación aceite a propóleos y a tiempos cortos de extracción, la actividad antioxidante ABTS^{•+} y DPPH[•] se incrementa.

En el presente trabajo, también se investigó la correlación de Pearson entre CFT y actividad antioxidante (DPPH[•] y ABTS^{•+}). Acorde a Taylor (1990), el coeficiente de correlación de Pearson con un valor menor a 0.35 muestra una correlación débil, entre 0.35 y 0.68 indica una correlación moderada, mientras que entre 0.68 y 1.0 indica una correlación fuerte. Por tanto, se encontró una fuerte correlación entre CFT y actividad antioxidante en ABTS^{•+} ($r= 0.79, p<0.05$) y DPPH[•] ($r=0.89, p<0.05$), lo que significa que a mayor CFT conduce a una mayor actividad antioxidante de los extractos. Los compuestos fenólicos pueden donar sus electrones a partir de los restos hidroxilo a las especies reactivas de oxígeno, lo que les permite neutralizar los radicales libres (Li *et al.*, 2019). Por tanto, la alta correlación entre CFT y la actividad antioxidante de los extractos oleosos de propóleos probablemente presenten la capacidad de los compuestos para eliminar radicales libres; cuanto mayor sea esta correlación, mayor será la capacidad de esta actividad. En este estudio la correlación entre CFT y la actividad antioxidante en los extractos fue mayor, y estos a su vez, exhibieron la mejor actividad biológica.

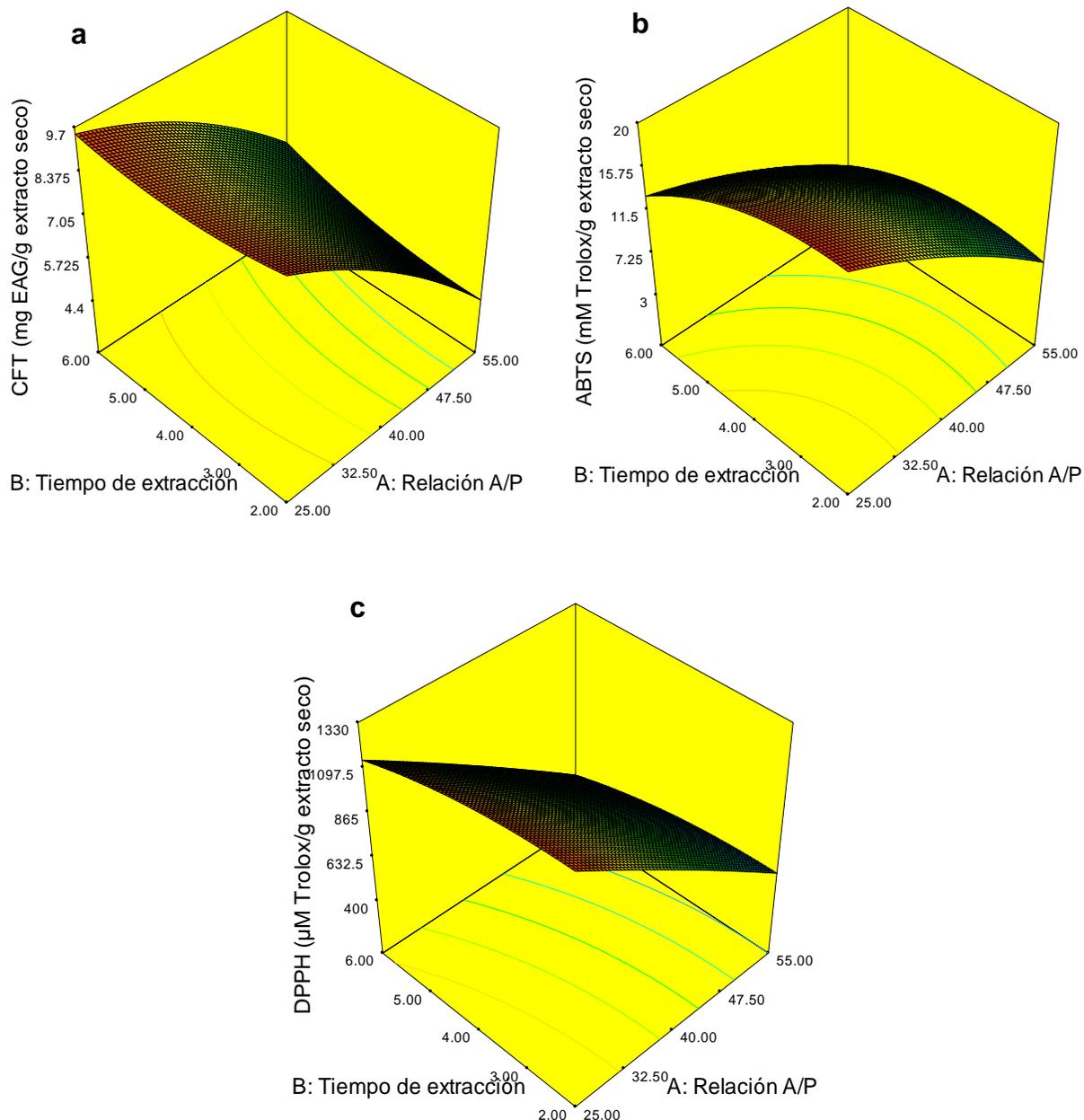


Figura 10. Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para contenido fenólico total (a); actividad antioxidante ABTS^{•+} (b); y actividad antioxidante DPPH[•] (c).

6.4. Determinación y validación de condiciones óptimas

Aplicando la metodología de la función deseable de Derringer's para la optimización simultánea de varias respuestas para encontrar los puntos óptimos de las variables independientes para conducir a un alto contenido de CFT con alta actividad antioxidante

de los extractos. Las condiciones de extracción óptima resultaron en una relación aceite de calabaza a propóleos de 25 mL/g y un tiempo de extracción de 2.0 d con un valor de deseabilidad de 0.954.

Para validar la idoneidad de las ecuaciones del modelo, se llevó a cabo un experimento con las nuevas condiciones de extracción que se sometieron a los mismos procedimientos experimentales que se aplicaron desde el inicio de este estudio. Los valores de error relativo entre valores predichos y experimentales CFT, DPPH^{*} y ABTS⁺⁺ fueron: 3.03, 1.84 y 0.63, respectivamente (Tabla 7). Este resultado demostró un buen ajuste de los modelos a los datos experimentales para la extracción oleosa de polifenoles de propóleos de abeja melipona y el modelo diseñado resultó bueno para predecir la condición extracción óptima.

Tabla 7. Valores predichos y experimentales de las variables de respuesta en condiciones óptimas de extracción

X ₁ (mL/g)	X ₂ (d)	Valor de deseabilidad	Respuesta	Valor experimental	Valor predicho	% error
25.0	2.0	0.954	CFT (mg EAG/g ES)	9.87 ± 0.50	9.58	-3.03
			ABTS ⁺⁺ (mM Trolox/g ES)	19.91 ± 1.00	19.55	-1.84
			DPPH [*] (µM Trolox/g ES)	1333.26 ± 117.07	1324.99	-0.63

X₁= Relación aceite a propóleos; X₂=Tiempo de extracción. % error= [(valor predicho-valor experimental/valor predicho) X 100].

6.5. Comparación entre el extracto oleoso y el extracto etanólico de propóleos

El extracto oleoso obtenido bajo condiciones óptimas de extracción con aceite de calabaza se comparó con el extracto obtenido con etanol absoluto a partir de la misma muestra de propóleos de abeja melipona (Tabla 8). El valor de CFT resultó similar entre ambos extractos de propóleos. El extracto oleoso exhibió un mayor contenido de flavonoides totales y mayor actividad antioxidante con ambos ensayos analizados. Es

probable que el alto contenido FT en el extracto oleoso explique parcialmente su mayor actividad antioxidante en comparación al extracto etanólico.

Esto implica que la viscosidad y polaridad del aceite empleado como disolvente fue eficiente para la extracción de flavonoides apolares, siguiendo el concepto “lo similar disuelve a lo similar” (Ali *et al.*, 2019), demostrando que el propóleo en estudio tiene un elevado contenido de flavonoides menos polares (por ejemplo, agliconas de flavanonas, flavonoles, etc), los cuales no son extraíbles empleando disolventes polares como etanol.

Los resultados de CFT y FT fueron similares a los obtenidos por otros investigadores en propóleos de abeja sin aguijón *Geniotrigona thoracica*, *Tetragonula biroi*, *Heterotrigona itama* y *Tetragonula laevicep* (Badiazaman *et al.*, 2019; Sulaeman *et al.*, 2019). La actividad antioxidante de ambos extractos resultó superior a lo reportado por Osés *et al.* (2020) para propóleos recolectados de diferentes áreas geográficas.

Aunque en la literatura científica se describe diferentes rangos de CFT, FT y actividad antioxidante de propóleos de diferentes orígenes geográficos, resulta difícil realizar una comparación de datos, debido en principio a que no existe un estándar de consenso para las curvas de calibración con concomitante diferentes formas de expresión de los resultados y, por otra parte, falta una regulación en cuanto a procedimientos estandarizados para propóleos de abejas sin aguijón (Osés *et al.*, 2020).

Tabla 8. Comparación entre el extracto óptimo oleoso y extracto etanólico de propóleos de *Melipona beecheii*

Variable	Extracto oleoso	Extracto etanólico
CFT (mg EAG/g ES)	9.87 ± 0.50 ^a	10.72 ± 0.76 ^a
FT (mg EQ/g ES)	35.37 ± 0.03 ^a	13.56 ± 1.29 ^b
ABTS ⁺ (mM Trolox/g ES)	19.91 ± 1.00 ^a	15.60±0.14 ^b
DPPH [•] (µM Trolox/g ES)	1333.26 ± 117.07 ^a	1005.65±54.62 ^b

*Letras distintas en cada fila denotan diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0.05$). Los valores son promedios \pm desviación estándar.

6.6. Perfil fenólico mediante LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

La separación e identificación de compuestos fenólicos de ambos extractos, se realizó utilizando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-MS en modo negativo, seguido de una exploración dependiente de datos para seleccionar los iones de interés (López-Yerena et al., 2020). La presencia de los compuestos fue identificada mediante comparación con estándares disponibles comerciales y base de datos bibliográficos.

Los modos MS (como barrido completo) y los modos MS/MS (como barrido de iones de producto) verificaron la información estructural de los compuestos fenólicos presentes en el extracto oleoso y etanólico de propóleos de abeja *Melipona beecheii*, se identificaron 35 y 34 compuestos fenólicos respectivamente, incluidos ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas y flavanonoles, se reportó tiempo de retención (min), masa exacta $[M - H]^-$, fragmento de iones principales (m/z), error (ppm) y fórmula molecular, tal como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Perfil de compuestos fenólicos del extracto oleoso (bajo condiciones óptimas de extracción con aceite de calabaza) y extracto etanólico de propóleos de abeja melipona.

Clasificación	Compuesto	Formula molecular	Masa exacta [M – H] ⁻	Fragmento de iones <i>m/z</i>	EOP		EEP	
					TR (min)	Error (ppm)	TR (min)	Error (ppm)
	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169.0139	125	1.2	0.75	1.2	0.750
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	167.0346	152	4.98	0.715	4.98	0.815
	Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9983	257/200/ 283/185/ 173/151	12.07	0.406	12.07	0.506

	Ácido siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0451	182/123	1.46	0.65	1.43	0.65
Ácidos hidroxici- námicos	Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087	191	5.12	0.291	5.12	0.191
	Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0504	134	11.54	0.865	11.24	0.665
	Ácido caféico	C ₉ H ₈ O ₄	179.0347	135	5.52	0.815	5.16	0.915
	Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	163.0398	119	9.39	0.829	9.23	0.829
	Artepillin C	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	299.1646	211/201/ 183	25.3	0.429	24.33	0.629
	Ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0607	99	12.07	0.6	11.78	0.400
	Drupanina	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	231.1024	187	17.76	0.829	17.76	0.529
	Hidroxitirosol	C ₈ H ₁₀ O ₃	153.0551	123	10.48	0.479	17.73	0.379
	CAPE	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	283.0952	229/213/ 185/169	27.19	-1.285	ND	ND
Ácido cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	147.0444	83/66	1.8	0.344	10.43	0.500	
Flavanoles	Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0687	245	1.58	-1.965	1.01	-1.765
	Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0687	245	1.58	-1.965	1.01	-1.765
Flavonoles	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0401	151/241/ 217/175/ 133	17.3	0.736	17.51	0.636
	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0345	283/215/ 201/151	15.3	0.621	15.18	0.021
	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1453	301/315	12.59	0.289	12.71	0.289
	Fisetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0398	241/217/ 175/151/ 133	17.27	0.436	17.51	0.636
	Galangina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0449	100	19.42	0.55	19.53	0.350
	Pinobanksina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0605	253	19.07	0.4	19.16	0.300
	Isorhamnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.0507	300/287	19.87	0.771	19.93	0.571
	Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317.0298	165/151	15.26	0.606	15.34	0.006
Flavonas	Ciranósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0926	285	14.36	0.412	14.36	0.212
	Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045	117	19.42	0.55	19.53	0.350
	Crisina	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0499	153	24.76	0.365	24.76	0.465
	Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0404	175/151/ 133	17.42	1.036	17.51	0.636
Isoflavonas	Genisteina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045	159/132/ 66	19.42	0.55	19.55	0.350
	Ambanol	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	339.087	183	19.24	0.685	19.08	0.585

	Pinocebrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0656	213/145/ 101	25.15	0.415	25.37	0.715
Flavanonas	Hesperetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	301.0711	164	17.71	0.435	17.57	0.035
	Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0603	151	19.18	0.2	19.16	0.300
	Glabrol	C ₂₅ H ₂₇ O ₄	391.1884	373	21.16	-1.986	21.26	-1.986
Flavanonoles	Taxifolina	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0506	285	19.79	0.671	19.86	0.471

EOP: Extracto oleoso de propóleos; EEP: Extracto etanólico de propóleos; ND: No detectado.

Cada tipo de propóleos posee perfiles químicos característicos, principalmente dependiendo del origen geográfico, la flora circundante, el tipo de abeja productora y el disolvente empleado en la extracción, es importante determinar el perfil químico de interés para poder sugerir indicaciones terapéuticas específicas, como acción antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticancerígena, entre otras (Hochheim *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos encontrados en el propóleos de este estudio coincidieron con lo informado en la literatura para propóleos de *Apis mellifera* de varias partes del mundo, (Escriche *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2020), así como con lo descrito para especies de abejas sin aguijón (Santos *et al.*, 2017; Rubinho *et al.*, 2020).

Para ilustrarlo, en propóleos de *Apis mellifera*, los componentes pinocebrina, CAPE, kaempferol, crisina, ácido cafeico, quercetina y apigenina, han sido encontrados en propóleos españoles (Escriche *et al.*, 2018), destacando el interés farmacológico de pinocebrina, por sus efectos antimicrobianos, antitumorales y neuroprotectores (Rasul *et al.*, 2013). Mientras que, en propóleos originarios de Rumania, se han reportado compuesto como el ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, rutina y genisteína (Escriche *et al.*, 2018). Por otro lado, en propóleos verdes brasileños de *Apis mellifera*, se han encontrado compuestos fenólicos como drupanina (Costa *et al.*, 2018) y artepillin C, este último, caracterizado por ser el compuesto mayoritario, se relaciona con efectos

anticancerígenos, principalmente contra líneas celulares de cáncer de mama y próstata (Rodrigues *et al.*, 2020).

Por otro lado, en propóleos de abeja sin aguijón, se han identificado compuestos fenólicos como el ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido elágico y naringenina, siendo destacados por sus efectos antioxidantes (Rubinho *et al.*, 2020) y en el caso de naringenina por su efecto antibacteriano al promover la inhibición de la función de la membrana citoplásmica bacteriana, reduciendo así su motilidad (Santos *et al.*, 2017). En otro estudio, Hochheim *et al.* (2019), identificó 6 compuestos en propóleos brasileños de *Melipona quadrifasciata* (aromadendrina, ácido *p*-cumárico, naringenina, catequina, epicatequina, y pinocembrina), de los cuales 5 coinciden con los hallazgos en nuestro estudio, siendo aromadendrina el único que no fue encontrado en propóleos de *Melipona beecheii*, demostrando que el origen de la abeja aporta variabilidad al contenido químico del propóleos.

Se puede inferir que el propóleos de *Melipona beecheii* extraído bajo las condiciones de este estudio, posee un perfil fenólico similar al obtenido en distintos tipos de propóleos alrededor del mundo por distintos tipos de abejas, además, el uso del aceite de pepita *C. argyrosperma* Huber como disolvente alternativo para la obtención de compuestos fenólicos de propóleos, logró extraer los mismos compuestos fenólicos obtenidos con etanol de manera tradicional, alcanzando un compuesto adicional: CAPE. Nuestros resultados apoyan la idea de que el empleo de disolventes no polares permite obtener un extracto oleoso de propóleos con alto potencial bioactivo.

Por primera vez, en EOP y EEP de *M. beecheii*, se reporta la obtención de dos compuestos fenólicos: ambanol, un isoflavonol natural, encontrado en la familia Leguminosae (Reynaud *et al.*, 2005) y glabrol, flavanona encontrado en el extracto etanólico de raíces de regaliz, es un inhibidor de la acil-coenzima A: colesterol aciltransferasa (ACAT) potente y no competitivo (Choi *et al.*, 2007). Demostrando que los

propóleos de *M. beecheii* en el Estado de Yucatán, presentan una interesante y distinta composición fenólica, relacionada al origen botánico de la zona, así como también un probable potencial terapéutico.

7.0. Conclusiones

Acorde a los resultados, se encontró que los factores estudiados (relación aceite de calabaza a propóleos y el tiempo de extracción), influyeron significativamente en el contenido de CFT y actividad antioxidante de extractos oleosos. Utilizando MSR y análisis estadístico se determinaron las siguientes condiciones para la extracción máxima de compuestos bioactivos: relación aceite a propóleos de 25 mL/g y tiempo de extracción de 2 días.

El extracto oleoso de propóleos exhibió un mayor contenido de flavonoides totales y mayor actividad antioxidante con respecto al extracto etanólico, esto probablemente sea explicado por que los ácidos grasos del aceite de calabaza son capaces de extraer compuestos de polaridad media a baja (por ejemplo, agliconas de flavanonas, flavonoles, etc), los cuales no son extraíbles empleando disolventes polares como etanol.

Los valores reportados de CFT y FT en el presente estudio concuerdan a los obtenidos en la literatura para propóleos de abeja sin aguijón *Geniotrigona thoracica*, *Tetragonula biroi*, *Heterotrigona itama* y *Tetragonula laevicep* (Badiazaman *et al.*, 2019; Sulaeman *et al.*, 2019). Sin embargo, la actividad antioxidante tanto del extracto alcohólico como el extracto oleoso resultó superior a lo reportado por Osés *et al.* (2020) para propóleos recolectados de diferentes áreas geográficas, destacando la importancia de los propóleos de *Melipona beecheii* en cuanto a su composición fenólica y su potencial uso en el área de la salud.

En el extracto oleoso y etanólico de propóleos, fueron identificados 35 y 34 compuestos fenólicos respectivamente, ambos extractos presentaron ácidos hidroxibenzóicos dentro de los que destacan el ácido gálico y elálgico, ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico, cinámico, y caféico, además del componente característico de propóleos brasileños artepillin C, flavanoles como el isómero catequina, flavonoles como

kaempferol, pinobanksina, quercetina y galangina, flavonas como apigenina, isoflavonas como genisteina, flavanonas como pinocembrina y flavanoles como taxifolina, el compuesto que no se encontró presente en el extracto etanólico de propóleos fue el fenetil ester del ácido caféico (CAPE), el cual es uno de los principales compuestos bioactivos hidrófobos reportados en propóleos y su importancia deriva de la capacidad de inhibir células cancerosas sin provocar citotoxicidad para las células normales (Guan *et al.*, 2019).

Estos hallazgos permiten proponer al aceite de calabaza chihua como un agente de extracción de compuestos fenólicos para la obtención de un extracto bioactivo oleoso con amplias posibilidades de aplicación en distintas áreas.

Con la información obtenida en este trabajo se puede contribuir en la caracterización de propóleos de abeja *Melipona beecheii* de la península de Yucatán, en cuanto al proceso de extracción, su composición fenólica con propiedades bioactivas y actividad antioxidante.

8.0. Referencias

- Agencia EFE, producción de miel sagrada de los mayas migra de los bosques a zonas urbanas, edición América, 2018.
- Ali, M. C., Chen, J., Zhang, H., Li, Z., Zhao, L., & Qiu, H. (2019). Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. *Talanta*, 203, 16-22.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., ... & Adgaba, N. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695-1703.
- Arantes, S. M., Piçarra, A., Guerreiro, M., Salvador, C., Candeias, F., Caldeira, A. T., & Martins, M. R. (2019). Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal). *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110747.

- Badiazaman, A. A. M., Zin, N. B., Annisava, A. R., Elani, N., Nafi, M., & Mohd, K. S. (2019). Phytochemical screening and antioxidant properties of stingless bee *Geniotrigona thoracica* propolis. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(2-1), 330-335.
- Bankova, V., & Popova, M. (2007). PHCOG REV.: Review Article Propolis of Stingless Bees: a Promising Source of Biologically Active Compounds. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1).
- Beephotecary, (2021). Propolis products. <https://beepothecary.square.site/shop/8> (consultado el 10 Agosto de 2021).
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties, recovery, and applications* (pp. 3-44). Woodhead Publishing.
- Bianco, B., Alexander, R. T., & Rayson, G. (2017). beekeeping practices in Modern And Ancient Yucatán. *The Value of Things: Prehistoric to Contemporary Commodities in the Maya Region*, 87-103.
- Bogdanov, S. (2012). Propolis: composition, health, medicine: a review. *Bee Product Science*.
- Bonajour (2021). Propolis Serum. <https://en.bonajour.com/product/propolis-serum-100ml/106/category/12/display/1/> (consultado el 07 Julio de 2021).
- Can-Cauich, C. A., Sauri-Duch, E., Moo-Huchin, V. M., Betancur-Ancona, D., & Cuevas-Glory, L. F. (2019). Effect of extraction method and specie on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of pumpkin oil from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 285, 186-193.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation, and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107-120.

- Carvalho, A. A., Finger, D., Machado, C. S., Schmidt, E. M., da Costa, P. M., Alves, A. P. N. N., ... & dos Santos, J. M. T. (2011). In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 126(3), 1239-1245.
- Cela, R., CASAIS, M. D. C., & Lorenzo, R. A. (2002). Técnicas de separación en química analítica. Síntesis.
- Choi, J. H., Rho, M. C., Lee, S. W., Kwon, O. E., Park, H. R., Kang, J. Y., ... & Kim, Y. K. (2007). Glabrol, an acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor from licorice roots. *Journal of ethnopharmacology*, 110(3), 563-566.
- Costa, P., Almeida, M. O., Lemos, M., Arruda, C., Casoti, R., Somensi, L. B., ... & de Andrade, S. F. (2018). Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. *Journal of ethnopharmacology*, 226, 82-89.
- Darmajana, D. A., Hadiansyah, F., & Desnilasari, D. (2017, November). The antioxidant activity test by using DPPH method from the white tea using different solvents. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1904, No. 1, p. 020009). AIP Publishing LLC.
- de Francisco, L., Pinto, D., Rosseto, H., Toledo, L., Santos, R., Tobaldini-Valerio, F., ... & Rodrigues, F. (2018). Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. *Food Research International*, 105, 537-547.
- de Sousa-Fontoura, D. M., Olinda, R. G., Viana, G. A., de FM Costa, K. M., Batista, J. S., Serrano, R. M., ... & Silva, T. M. (2020). Wound healing activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona subnitida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30, 367-373.
- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Rebouças Silva, J., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C., ... & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*, 13(12), e0207676.

- Diario de Yucatán, joven rescata la producción de la abeja Melipona, 3 de julio, 2018, Mérida.
- Duno de Stefano, R., Ramírez Morillo, I., Tapia-Muñoz, J. L., Hernández-Aguilar, S., Can, L. L., Cetzal-Ix, W., ... & Carnevali Fernández-Concha, G. (2018). Aspectos generales de la flora vascular de la Península de Yucatán Mexicana. *Botanical Sciences*, 96(3), 515-532.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., ... & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.
- Escriche, I., & Juan-Borrás, M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.
- Eskandani, M., Hamishehkar, H., & Dolatabadi, J. E. N. (2014). Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food chemistry*, 153, 315-320.
- Farooqui, T., & Farooqui, A. A. (2017). *Therapeutic effects of propolis on neurological disorders*. USA: John Wiley and Sons Publisher, 335.
- Farré, R., Frasset, I., & Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45(1), 21-43.
- Gabriel, M. B., Carneiro, M. J., de Camargo, R. C., & Sawaya, A. C. (2021). The chemical composition and antioxidant activity of mandacaia (melipona quadrifasciata) geopropolis varies more due to region than month of collection. *Natural Product Research*, 1-5.
- González, J., & Quezada, J. (2009). Producción tradicional de miel: abejas nativas sin aguijón (Trigonas y Meliponas). *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*, 382-384.
- González, M., Gómez, M. I., Tereschuk, M. L., & Molina, A. (2009). Thermal stability of propolis from Tucumán, Argentina. *Journal of apicultural research*, 48(4), 270-278.

- Guan, Y., Chen, H., & Zhong, Q. (2019). Nanoencapsulation of caffeic acid phenethyl ester in sucrose fatty acid esters to improve activities against cancer cells. *Journal of Food Engineering*, 246, 125-133.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gunawardena, D., Govindaraghavan, S., & Münch, G. (2014). Anti-inflammatory properties of cinnamon polyphenols and their monomeric precursors. In *polyphenols in human health and disease* (pp. 409-425). Academic Press.
- Herrera-López, M. G., Rubio-Hernández, E. I., Leyte-Lugo, M. A., Schinkovitz, A., Richomme, P., Calvo-Irabién, L. M., & Peña-Rodríguez, L. M. (2019). Botanical origin of triterpenoids from Yucatecan propolis. *Phytochemistry Letters*, 29, 25-29.
- Hochheim, S., Guedes, A., Faccin-Galhardi, L., Rechenchoski, D. Z., Nozawa, C., Linhares, R. E., ... & de Cordova, C. M. M. (2019). Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 339-350.
- 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.
- Huang, W. C., Li, B., Qi, X., & Mao, X. (2020). New type of green extractant for oil production: Citric acid/citric acid sodium extraction system. *Food chemistry*, 310, 125815.
- Informe final del estudio técnico: situación actual y perspectivas de la meliponicultura en comunidades aledañas a la rb, los petenes. Responsable Técnico: Dr. Lucio A. Pat Fernández Colaboradores: Ing. Pablo Hernández Bahena Dr. Juan M. Pat Fernández Dr. Francisco Guizar Vázquez. 2016.
- Jiang, X., Tian, J., Zheng, Y., Zhang, Y., Wu, Y., Zhang, C., ... & Hu, F. (2019). A New Propolis Type from Changbai Mountains in North-east China: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Molecules*, 24(7), 1369.

- Jun, X. (2006). Comparison of antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis obtained by different extraction methods. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 84(4), 447-451.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., & Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food chemistry*, 116(2), 452-461.
- Keskin, Ş. (2020). Orange peel volatile oil: A green solvent for propolis extraction, enhanced α -amylase inhibition activity. *Flavour and Fragrance Journal*.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barcauskaite, K., ... & Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 156.
- Lavinas, F. C., Macedo, E. H. B., Sá, G. B., Amaral, A. C. F., Silva, J. R., Azevedo, M., ... & Rodrigues, I. A. (2019). Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 389-399.
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., & Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916-4922.
- Li, J., Zhang, S., Zhang, M., & Sun, B. (2019). Novel approach for extraction of grape skin antioxidants by accelerated solvent extraction: Box–Behnken design optimization. *Journal of food science and technology*, 56(11), 4879-4890.
- López-Yerena, A., Vallverdú-Queralt, A., Mols, R., Augustijns, P., Lamuela-Raventós, R. M., & Escribano-Ferrer, E. (2020). Absorption and Intestinal Metabolic Profile of Oleocanthal in Rats. *Pharmaceutics*, 12(2), 134.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132.

- Manchón Díez, N. (2015). Métodos avanzados para el análisis, conservación y extracción de compuestos fenólicos en alimentos.
- Maran, J. P., Manikandan, S., & Mekala, V. (2013). Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box–Behnken design with desirability function. *Industrial crops and products*, 49, 304-311.
- Medicata, (2021). Propolis serum. <https://medicata.eu/en/product/procalendd3-oily-extract-of-propolis-with-marigold-and-vitamin-d3-2/> (consultado el 10 Agosto de 2021).
- Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A., Rodrigues, M. V., & Cabral, F. A. (2018). Fractionation of ethanolic and hydroalcoholic extracts of green propolis using supercritical carbon dioxide as an anti-solvent to obtain artemillin rich extract. *The Journal of Supercritical Fluids*, 138, 167-173.
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., ... & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 166, 17-22.
- Moo-Huchin, V., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L. F., & Sauri-Duch, E. (2013). Chemical composition of crude oil from the seeds of pumpkin (*Cucurbita* spp.) and mamey sapota (*Pouteria sapota* Jacq.) grown in Yucatan, Mexico. *CYTA-Journal of Food*, 11(4), 324-327.
- Namiki, Hideo, WO/2005/094853. Propolis extract and method for extracting the same. Word intellectual property organization.
- NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.
- NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios.
- Oroian, M., Dranca, F., & Ursachi, F. (2020). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 70-78.

- Osés, S. M., Marcos, P., Azofra, P., de Pablo, A., Fernández-Muñoz, M. Á., & Sancho, M. T. (2020). Phenolic profile, antioxidant capacities and enzymatic inhibitory activities of propolis from different geographical areas: Needs for analytical harmonization. *Antioxidants*, 9(1), 75.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- Pandey, R., Chandra, P., Srivastava, M., Mishra, D. K., & Kumar, B. (2015). Simultaneous quantitative determination of multiple bioactive markers in *Ocimum sanctum* obtained from different locations and its marketed herbal formulations using UPLC-ESI-MS/MS combined with principal component analysis. *Phytochemical analysis*, 26(6), 383-394.
- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173-182.
- PENG, Ke-Zheng; ZHANG, Song-Yan; ZHOU, Hong-Li. Toxicological evaluation of the flavonoid-rich extract from *Maydis stigma*: Subchronic toxicity and genotoxicity studies in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, vol. 192, p. 161-169.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista boliviana de química*, 31(2), 68-81.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2018). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- Popova, M., Trusheva, B., & Bankova, V. (2019). Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. *Phytomedicine*, 153098.

- Pujirahayu, N. I. K. E. N., Ritonga, H. A. L. I. M. A. H. T. U. S. S. A. D. I. Y. A. H., & Uslinawaty, Z. A. K. I. A. H. (2014). Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6, 338-340.
- Quezada-Euán, J. J. G. (2018). *Stingless bees of Mexico: the biology, management, and conservation of an ancient heritage*. Springer.
- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food chemistry*, 169, 336-343.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramón-Sierra, J., Peraza-López, E., Rodríguez-Borges, R., Yam-Puc, A., Madera-Santana, T., & Ortiz-Vázquez, E. (2019). Partial characterization of ethanolic extract of *Melipona beecheii* propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 319-324.
- Rashidi, M. K., Mirazi, N., & Hosseini, A. (2016). Effect of topical mixture of honey, royal jelly and olive oil-propolis extract on skin wound healing in diabetic rats. *Wound Medicine*, 12, 6-9.
- Rasul, A., Millimouno, F. M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J., & Li, X. (2013). Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed research international*, 2013.
- Reis, J. H. D. O., Barreto, G. D. A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. D., Andrade, L. N., Padilha, F. F., ... & Machado, B. A. S. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS one*, 14(7), e0219063.

- Reis, J. S., Oliveira, G. B., Monteiro, M. C., Machado, C. S., Torres, Y. R., Prediger, R. D., & Maia, C. S. (2014). Antidepressant and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. *Phytomedicine*, 21(11), 1466-1472.
- Reynaud, J., Guilet, D., Terreux, R., Lussignol, M., & Walchshofer, N. (2005). Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Natural Product Reports*, 22(4), 504-515.
- Rodrigues, D. M., De Souza, M. C., Arruda, C., Pereira, R. A. S., & Bastos, J. K. (2020). The role of *Baccharis dracunculifolia* and its chemical profile on green propolis production by *Apis mellifera*. *Journal of chemical ecology*, 46(2), 150-162.
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2), 235-254.
- Rosso, J. M., & Nates, G. (2005). *Meliponicultura: Una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales. Asociación Ecología Tecnología y Cultura en los Andes, Lima (Perú).*
- Rubinho, M. P., de Carvalho, P. L. N., Reis, A. L. L. E., Ern, Reis, E., de Alencar, S. M., ... & Ikegaki, M. (2020). A comprehensive characterization of polyphenols by LC-ESI-QTOF-MS from *Melipona quadrifasciata* anthidioides geopropolis and their antibacterial, antioxidant and antiproliferative effects. *Natural product research*, 34(21), 3139-3144.
- Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (2018). Brazilian red propolis: legitimate name of the plant resin source. *MOJ Food Process Technol*, 6(1), 21-2.
- Santos, H. F. D., Campos, J. F., Santos, C. M. D., Balestieri, J. B. P., Silva, D. B., Carollo, C. A., ... & Dos Santos, E. L. (2017). Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 953.
- Santos, L. M., da Fonseca, M. S., Sokolonski, A. R., Deegan, K. R., Araújo, R. P., Umsza-Guez, M. A., ... & Machado, B. A. (2019). Propolis: Types, composition, biological

- activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Saxena, M., Saxena, J., & Pradhan, A. (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 16(2), 130-134.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- Silici, S., & Baysa, M. (2020). Antioxidant, antiradical and antipyretic effects of olive oil extract of propolis. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 883-889.
- Singh, P., Anand, A., & Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *European journal of medicinal chemistry*, 85, 758-777.
- Šturm, L., & Ulrih, N. P. (2019). Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review. *eFood*, 1(1), 24-37.
- 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.
- Taddeo, V. A., Epifano, F., Fiorito, S., & Genovese, S. (2016). Comparison of different extraction methods and HPLC quantification of prenylated and unprenylated phenylpropanoids in raw Italian propolis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 129, 219-223.
- Taylor, R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of diagnostic medical sonography*, 6(1), 35-39.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

- Vallverdú-Queralt, A., Jauregui, O., Medina-Remón, A., Andrés-Lacueva, C., & Lamuela-Raventós, R. M. (2010). Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(20), 2986-2992.
- Vargas Sánchez, R. D., Torrescano Urrutia, G. R., & Sánchez Escalante, A. (2013). El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38(10).
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008). Families of phenolic compounds and means of classification. In *Phenolic compound biochemistry* (pp. 1-34). Springer, Dordrecht.
- Villanueva-G, R., Roubik, D. W., & Colli-Ucán, W. (2005). Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatán peninsula. *Bee World*, 86(2), 35-41.
- Xix, M., Javier, F., Pat, J., Fanny, N., & Huchin Chan, J. (2018). La calabaza chihua (*Cucurbita argyrosperma* Huber) del estado de quintana roo, como producto potencial para la comercialización.
- Xu, X., Pu, R., Li, Y., Wu, Z., Li, C., Miao, X., & Yang, W. (2019). Chemical compositions of propolis from China and the United States and their antimicrobial activities against *Penicillium notatum*. *Molecules*, 24(19), 3576.
- Yam-Puc, A., Santana-Hernández, A. A., Yah-Nahuat, P. N., Ramón-Sierra, J. M., Cáceres-Farfán, M. R., Borges-Argáez, R. L., & Ortiz-Vázquez, E. (2019). Pentacyclic triterpenes and other constituents in propolis extract from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, México. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 358-363.
- Yang, X., Sun, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shi, G., Wei, F., & Jiang, G. (2018). Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. *Science of the Total Environment*, 643, 559-568.

Yara-Varón, E., Li, Y., Balcells, M., Canela-Garayoa, R., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2017). Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules*, 22(9), 1474.