



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

TESIS

**COMPUESTOS BIOACTIVOS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIDIABÉTICA DE EXTRACTOS DE PROPÓLEO OBTENIDOS POR
ULTRASONIDO EN CONDICIONES DE DIGESTIÓN SIMULADA**

Para obtener el grado de maestría

PRESENTA

BQ. Javier Alonso Hernández Martínez

Director

Dr. Rafael German Campos Montiel

Codirector

Dra. Gabriela Medina Pérez

Comité tutorial:

Dra. Abigail Reyes Munguía

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., agosto 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies
Maestría en Ciencia de los Alimentos

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Compuestos bioactivos, actividad antioxidante y antidiabética de extractos de propóleo obtenidos por ultrasonido en condiciones de digestión simulada", que desarrollo el estudiante Javier Alonso Hernández Martínez

Asistentes:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel
Dra. Gabriela Medina Pérez
Dra. Abigail Reyes Munguía
Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Javier Alonso Hernández Martínez, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 28 de agosto de 2023

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dra. Gabriela Medina Pérez

Dra. Abigail Reyes Munguía

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes



Handwritten signatures of the committee members over horizontal lines.



Avenida Universidad Km 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa,
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. C.P. 43600
Teléfono +52 (771) 71 72000 ext. 2425
maestria_alimentos@uaeh.edu.mx

Dedicatoria y agradecimientos

Agradezco y dedico mi trabajo a mi familia, porque sin su apoyo no hubiera sido posible culminar uno de mis mayores anhelos.

Agradezco a mi amor Nimbe por incitarme de manera constante a continuar con los estudios de posgrado, por estar siempre presente, por su paciencia y amor en todo momento.

También, extendo mi agradecimiento a mi suegra y a la familia de mi novia, que siempre estuvo apoyándome en todo momento.

A Merari, Mirna y Carlos por brindarme su amistad sin antes conocernos, siempre estar a mi lado durante mi estancia en la universidad.

Al M.C. Lucio y la Q. Maribel por su paciencia en orientarme en el desarrollo de las técnicas de laboratorio.

Así mismo, agradezco el apoyo del Dr. Campos, siempre con la disposición de aclarar dudas y estar pendiente del material que hacía falta para poder culminar en tiempo y forma la investigación.

*“Nunca consideres el estudio
como una obligación sino
como una oportunidad para
penetrar en el bello y
maravilloso mundo del saber”*

Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por la beca otorgada al alumno Javier Alonso Hernández Martínez (No. De CVU: 1147416) para la realización del proyecto “Compuestos bioactivos, actividad antioxidante y antidiabética de extractos de propóleo obtenidos por ultrasonido en condiciones de digestión simulada”.



CONAHCYT

Índice General

I.	Índice de imágenes	vii
II.	Índice de tablas	viii
III.	Resumen.....	ix
IV.	Abstract.....	x
1	Introducción.....	1
2	Marco teórico.....	3
2.1	Propóleo.....	3
2.1.1	Métodos de extracción	4
2.2	Compuestos bioactivos.....	7
2.2.1	Clasificación de los compuestos bioactivos.....	8
2.2.2	Compuestos bioactivos del propóleo	13
2.3	Propiedades de los compuestos	16
2.3.1	Actividad Antioxidante del propóleo.....	17
2.4	Diabetes mellitus	18
2.4.1	Actividad antidiabética del propóleo	20
3	Definición de problema	22
4	Justificación.....	23
5	Objetivos.....	24
5.1	Objetivo general	24

5.2	Objetivos específicos	24
6	Materiales y Métodos	25
6.1	Obtención de la muestra	25
6.2	Extracción asistida por ultrasonido.....	25
6.3	Determinación de compuestos bioactivos	26
6.3.1	Determinación de fenoles totales	26
6.3.2	Determinación de flavonoides totales.....	27
6.4	Determinación de capacidad antioxidante.....	28
6.4.1	Inhibición de radical DPPH•.....	28
6.4.2	Inhibición de radical ABTS• ⁺	28
6.5	Indicadores de la actividad antidiabética.....	29
6.5.1	Ensayo <i>in vitro</i> de α-amilasa.....	29
6.5.2	Ensayo <i>in vitro</i> α-glucosidasa.....	30
6.6	Digestión simulada	31
6.7	Análisis estadístico	32
7	Resultados y discusión	33
7.1	Porcentaje de rendimiento	33
7.2	Determinación de compuestos bioactivos	34
7.2.1	Determinación de fenoles totales	35
7.2.2	Determinación de flavonoides totales.....	36

7.3	Determinación de capacidad antioxidante	37
7.4	Determinación de capacidad antidiabética	39
7.4.1	Ensayo <i>in vitro</i> de α -amilasa.....	39
7.5	Digestión simulada	41
7.5.1	Evaluación de los compuestos bioactivos durante la digestión	41
7.5.2	Determinación de actividad antioxidante durante la digestión	43
7.5.3	Determinación de actividad antidiabética durante la digestión	44
8	Conclusiones.....	46
9	Aplicaciones a futuro.....	47
10	Referencias.....	48
11	Anexos	67
11.1	Anexo 1. Curva de calibración de fenoles totales	67
11.2	Anexo 2. Curva patrón de flavonoide totales	68
11.3	Anexo 3. Curva patrón de ABTS \bullet^+	69
11.4	Anexo 4. Curva patrón de DPPH \bullet	70

I. Índice de imágenes

Figura 1. Yemas y hojas.....	3
Figura 2. Clasificación de los polifenoles (Gasaly <i>et al.</i> , 2020).	9
Figura 3. Estructuras básicas de flavonoides y ácidos fenólicos con ejemplos (Tatipamula y Kukavica, 2021).....	10
Figura 4. Estructura del isopreno (NIH, 2022).	13
Figura 5. Prevalencia de diabetes mellitus en el 2018 (INEGI, 2021).....	20
Figura 6. Contenido de fenoles totales.	35
Figura 7. Contenido de flavonoides totales.....	36
Figura 8. Contenido de ABTS• ⁺ (A) y DPPH• (B) de los extractos de propóleo.....	38
Figura 9. Inhibición de la α -amilasa (A) y α -glucosidasa (B) de extractos de propóleo ..	39
Figura 10. Inhibición enzimática durante la digestión simulada. (A) inhibición de la α - amilasa, (B) inhibición de la α -glucosidasa.....	44
Figura 11. Curva patrón de fenoles totales.....	67
Figura 12. Curva patrón de flavonoides totales	68
Figura 13. Curva patrón de ABTS• ⁺	69
Figura 14. Curva patrón de DPPH•	70

II. Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades y compuestos químicos del propóleo (Sánchez Elizalde y Marquéz Hernández, 2017).....	15
Tabla 2. Composición química del propóleo iraní (Ahangari <i>et al.</i> , 2018).....	15
Tabla 3. Enfermedades degenerativas causadas por radicales libres (Osorio y Salamanca, 2017).	18
Tabla 3. porcentaje de rendimiento de los propóleos.....	33
Tabla 4. Contenido de fenoles y flavonoides en la digestión simulada.	41
Tabla 5. Capacidad antioxidante durante la digestión simulada.	43

III. Resumen

Habitualmente el propóleo es utilizado en diversas partes del mundo como tratamiento tradicional en algunas enfermedades. Se han identificado más 500 compuestos químicos en el propóleo en distintas partes del mundo. Estudios recientes han relacionado los compuestos fenólicos en la inhibición de enzimas digestivas, Alaribe *et al.* (2021), reportaron resultados positivos en la actividad antioxidante y antidiabética utilizado propóleo nigeriano. Debido a su gran diversidad en compuestos es una excelente fuente natural para su estudio. Esta investigación tiene como objetivo evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos de los propóleos con actividad antioxidante y antidiabética extraídos por ultrasonido después de una digestión *in vitro*. Se utilizaron 4 muestras provenientes de diferentes municipios del estado de Oaxaca: Propóleo de Eloxochistlán (PE), Propóleo de Teotitlán (PT), Propóleo de San Pedro (PSP) y Propóleo de San Jerónimo (PSJ), se realizaron extracciones etanólicas por ultrasonido, donde se observó que el PSP y PE obtuvieron mejores rendimientos, el extracto con mayor contenido de fenoles fue PE con $15,362.4 \pm 225$ mg GAE/100 g de muestra, mientras que en flavonoides fue PT con $8,084.6 \pm 19$ mg QE/100 g de muestra. En la actividad antioxidante se evaluaron los radicales ABTS^{•+} y DPPH• donde el extracto con mejor inhibición fue PE con $33,307.1 \pm 567$ mg ET/100 g de muestra y PT con $3,611.4 \pm 17$ mg ET/100 g de muestra, en la digestión simulada tanto los compuestos químicos y actividad antioxidante tuvieron una disminución de su contenido hasta de 96 %, mientras en la actividad antidiabética cuantificada como la inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa que mostró una disminución promedio del 50 % hasta la fase intestinal. Por lo tanto, se concluye que los extractos propóleo podrían ser una alternativa natural para el tratamiento de la diabetes y es necesario en un futuro proteger sus compuestos químicos e incorporarlos en alimentos.

Palabras claves: α -amilasa; α -glucosidasa; ABTS^{•+}; DPPH•; in-vitro

IV. Abstract

Propolis is commonly used in various parts of the world as a traditional treatment for some diseases. More than 500 chemical compounds have been identified in propolis in different parts of the world. Recent studies have associated phenolic compounds with inhibiting digestive enzymes, Alaribe *et al.* (2021) reported positive results in antioxidant and antidiabetic activity using Nigerian propolis. Due to its great diversity in compounds, it is an excellent natural source for study. This research aims to evaluate the bioaccessibility of propolis bioactive compounds with antioxidant and antidiabetic activity extracted by ultrasound after *in vitro* digestion. Four samples were used from different municipalities of the state of Oaxaca were used: Propolis from Eloxochistlan (PE), Propolis from Teotitlan (PT), Propolis from San Pedro (PSP), and Propolis from San Jeronimo (PSJ), ethanolic extractions were performed by ultrasound, where it was observed that PSP and PE obtained better yields, the extract with higher phenol content was PE with $15,362.4 \pm 225$ mg GAE/100 g of sample, while in flavonoids, it was PT with $8,084.6 \pm 19$ mg QE/100 g of sample. In antioxidant activity, $ABTS^{\bullet+}$ and $DPPH^{\bullet}$ radicals were evaluated, where the extract with the best inhibition was PE with $33,307.1 \pm 567$ mg ET/100 g of sample and PT with $3,611.4 \pm 17$ mg ET/100 g sample, in the simulated digestion of both chemical compounds and antioxidant activity, had a decrease in their content up to 96 %, while in the antidiabetic activity quantified as the inhibition of α -amylase and α -glucosidase which showed an average reduction of 50 % up to the intestinal phase. Therefore, it is concluded that propolis extracts could be a natural alternative for treating diabetes, and it is necessary in the future to protect its chemical compounds and incorporate them into food.

Keywords: α -amylase; α -glucosidase; $ABTS^{\bullet+}$; $DPPH^{\bullet}$; in-vitro

1 Introducción

El propóleo es una sustancia que es procesada por las abejas, se han investigado sus compuestos químicos ya que al ser una concentración de diferentes resinas y exudados de plantas que están alrededor de la colmena, esta adquiere una gran variedad de compuestos que le dan propiedades bioactivas como son antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, antiséptico, antioxidante y antidiabético. La propiedad antioxidante está fuertemente ligada a la proporción de compuestos fenólicos en el propóleo, los cuales ejercen su mecanismo principalmente en la inhibición de radicales libres. Los radicales libres se encuentran fuertemente relacionados con muchas enfermedades degenerativas, provocadas por estrés oxidativo (Sánchez Elizalde y Marquéz Hernández, 2017). Los flavonoides presentan una gran capacidad para neutralizar los radicales libres y además evita la formación de las especies reactivas de oxígeno por que presentan el grupo fenólico en su estructura. Sin embargo, dependiendo la estructura que presenten los flavonoides es su capacidad de antioxidante (Zavaleta *et al.*, 2005).

Una de las enfermedades que actualmente es muy común en México es la diabetes, la cual se caracteriza por un mal metabolismo de los carbohidratos y niveles elevados de glucosa en sangre. La hiperglucemia provoca a largo plazo problemas cardiovasculares, pérdida de la vista, daño renal entre otras. Por qué se han investigado alternativas para su tratamiento o prevención (Sapra y Bhandari, 2021).

Las investigaciones del propóleo se enfocan en su actividad antioxidante ya que brinda muchos Beneficios a la salud, sin embargo, en la actividad antidiabética las investigaciones se centran en la disminución de glucosa en sangre y los mecanismos de mejoramiento de la

insulina, realizando estudios en ratones. Dado que se han reportado que en diferentes plantas la actividad antidiabética se da por la inhibición de enzimas digestivas como son la α -amilasa y α -glucosidasa, encargadas de la degradación de carbohidratos, para que la glucosa esté disponible y sea absorbida por el intestino, se intuye que el propóleo tiene estas propiedades dado que es un concentrado de la flora a su alrededor (Medina *et al.*, 2019; Osorio y Salamanca, 2017).

Tomando en cuenta que el propóleo tiene gran variedad de compuestos fenólicos, en este protocolo se propondrá la metodología que se utilizará para comprobar si los propóleos de tres diferentes municipios de Oaxaca tienen un efecto inhibitorio en las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, así como evaluar su actividad antioxidante. Esto con el fin de contribuir en las alternativas del tratamiento o prevención de la diabetes.

2 Marco teórico

2.1 Propóleo

El propóleo se origina cuando las abejas mezclan con cera las resinas excretadas en yemas (Figura 1), hojas y exudados de plantas cercanas de la colmena (Robleda *et al.*, 2019). La palabra propóleo se deriva del griego pro (en defensa de) y polis (la ciudad); esta sustancia es utilizada por las abejas para recubrir la colmena, sellar grietas, aislante térmico y de fortaleza en la construcción del panal. Además, sus características organolépticas son: sabor amargo, olor dulce y el color puede ser verde oscuro o amarillo verdoso. Estas características dependen del origen geográfico (Sosa *et al.*, 2017; Vilorio *et al.*, 2012).

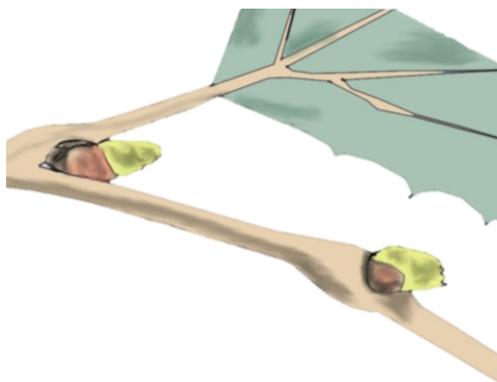


Figura 1. Yemas y hojas.

La composición del propóleo es de ceras 20-30%, resinas y bálsamos 40-50%, aceites etéreos o esenciales 5-10% y polen 4-5% (Sánchez Elizalde y Marquéz Hernández, 2017). Desde la antigüedad se le atribuyen propiedades antibacterianas, sin embargo, actualmente se ha logrado comprobar mediante diversos estudios su actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiprotozoaria, antiinflamatoria, anticariogénica, además acción

inmunoestimulante, así como agente cicatrizante y agente recuperador de tejido (Osorio y Salamanca, 2017).

2.1.1 Métodos de extracción

Los métodos de extracción se pueden clasificar en dos grupos:

- Los métodos convencionales como: maceración, extracción por destilación, hidrodestilación, por arrastre con vapor, extracción soxhlet, lixiviación, infusión y extracción con solvente orgánico (Melo *et al.*, 2020; Stashenko *et al.*, 2014).
- Los métodos no convencionales o emergentes: microondas, extracción por altas presiones, extracción por ultrasonido y sistemas de puntos críticos.

En la extracción con técnicas convencionales, los compuestos bioactivos se degradan y pierden su funcionalidad, por factores como: temperatura elevada y el tiempo de extracción. En estos métodos los solventes más utilizados son compuestos orgánicos volátiles tóxicos, que presentan un impacto en la salud, la seguridad y el medio ambiente. Por lo que se busca que las tecnologías sean verdes y sustentables para la extracción de compuestos bioactivos (Arana, 2021; Yara *et al.*, 2017).

Existen diferentes métodos de extracción, el tradicional es la maceración la cual consiste en dejar en reposo la muestra durante un tiempo que puede abarcar de 24 horas a semanas, para aumentar la interacción entre el solvente y la muestra se aplica agitación constante, sin embargo, con el surgimiento de nuevas tecnologías como la asistida por microondas, ultrasonido y fluidos supercríticos las cuales se han explorado para mejorar el modo de extracción (Yıldırım, 2022).

2.1.1.1 Ultrasonido

El ultrasonido consiste en ondas sónicas, el rango para el procesamiento de alimentos se encuentra entre 20 y 100 Hz. La extracción asistida por ultrasonido utiliza estas ondas sónicas, el fundamento de esta tecnología está basado en la transmisión de dichas ondas en un medio líquido, creando ciclos alternos de compresión y rarefacción, en los cuales, se forma una presión negativa que rompe el líquido para establecer vacío y posteriormente burbujas o cavidades. En las células, las ondas ultrasónicas causan la ruptura de su pared liberando sus componentes (Fernández y Proaño, 2021; Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012).

El estudio de la extracción por ultrasonido ha tomado relevancia en las últimas dos décadas, se ha demostrado que es un método eficaz, limpio, sencillo, rápido y verde. El ultrasonido destaca en comparación de los métodos convencionales por ser de baja inversión, tiempos de extracción más cortos, aumento en rendimiento, capacidad en la extracción compuestos bioactivos, sustancias de bajo peso molecular y otros metabolitos de las plantas (Rojas *et al.*, 2019).

2.1.1.2 Microondas

Los microondas son campos electromagnéticos situados en un rango de 300 MHz a 300 GHz o entre la longitud de onda de 1 cm y 1m del espectro electromagnético. Las ondas están formadas por dos campos: campo eléctrico y campo magnético. La extracción asistida por microondas utiliza estos campos electrostáticos. Este método se fundamenta en aplicar

directamente las ondas en un material que puede absorber parte de la energía electrostática y transformarla en calor. La energía de las microondas interactúa con los componentes polares que están presentes en el solvente para generar calor, por lo que, es importante los parámetros de constante dieléctrica y el factor de disipación. Los instrumentos de microondas usualmente utilizan una frecuencia de 2450 MHz, el cual, produce una energía entre 600 a 700 vatios (Bagade y Patil, 2021; Cahuana, 2020; Pimentel *et al.*, 2018).

La extracción por microondas tiene varias ventajas en comparación con los métodos convencionales como son: tiempos más cortos de extracción, mayor rendimiento, utilización de menor cantidad de reactivos, una mayor selectividad de compuestos y un mayor nivel de automatización (Amarante *et al.*, 2020; Ávila *et al.*, 2019).

2.1.1.3 Fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos se caracteriza por utilizar solventes inertes y son considerados disolventes ecológicos “verdes”, como son el CO₂. El CO₂ es uno de los más utilizados por sus características solvatantes, económicas y ecológicas, sin mencionar su accesibilidad y alta efectividad (Bankova *et al.*, 2021; Barriga *et al.*, 2018).

El dióxido de carbono supercrítico (CO₂) se utiliza para obtener los componentes de una matriz, esto gracias a sus condiciones del cambio de fase a supercrítico (37 °C y baja presión), su afinidad con componentes polares como biomoléculas (proteínas, cadena de polisacáridos), los cuales se protegen de la desnaturalización durante el proceso de extracción. Las moléculas en condiciones CO₂ supercrítico se comportan simultáneamente

con una solubilidad de soluto similar al líquido y capacidad de difusión similar al gas, lo que facilita la penetración en estructuras y solubilidad en moléculas no polares (Kim *et al.*, 2021).

2.2 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son estructuras químicas que aportan un beneficio al ser humano, las cuales se pueden agrupar en compuestos fenólicos, terpénicos, azufrados, nitrogenados y péptidos bioactivos. los compuestos bioactivos pueden se pueden obtener de manera sintética o natural, de forma natural (Espinoza, 2021; Morán *et al.*, 2021).

Los compuestos bioactivos se obtienen principalmente de las plantas ya sea en partes de esta como tallo, hojas, flor y raíces, así como en verduras, cereales, frutos secos y aceites. A estos compuestos también se les llama fitoquímicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas al estar en estrés, el cual puede ser biótico, abiótico, como infecciones, depredadores, radiación ultravioleta, estrés hídrico o sales. Una gran parte de los fitoquímicos corresponde a darle color y sabor tanto a plantas y frutas (Gámez, 2020; García *et al.*, 2022; Gasaly *et al.*, 2020).

Los primarios se utilizan para las funciones de la planta, mientras que los metabolitos secundarios no tienen función directa en las funciones como la fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos. Además, los metabolitos secundarios son sintetizados por la planta a partir de los metabolitos primarios, sin embargo, los metabolitos secundarios no tienen una distribución exacta, por lo que diferentes especies tendrán metabolitos secundarios diferentes. Los metabolitos secundarios son sintetizados por las plantas en pequeñas cantidades y no de forma general ni uniforme,

por lo que varía dependiendo la región de la planta, género o incluso la especie (Martín, 2018).

2.2.1 Clasificación de los compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos se agrupan en cuatro grupos: sustancias fenólicas, sustancias terpénicas, sustancias azufradas y sustancias nitrogenadas (alcaloides).

2.2.1.1 Sustancias fenólicas

Los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles o fenilpropanoides, se encuentran principalmente en la naturaleza, caracterizados por poseer uno o varios anillos fenólicos, químicamente, estos compuestos tienen un anillo de benceno (C6) que grupos hidroxilo (Figura 2). Los compuestos fenólicos están relacionados principalmente con la capacidad antioxidante, sin embargo, esta propiedad no se le atribuye a un solo compuesto sino al conjunto de ello (Ruiz *et al.*, 2018). Los polifenoles se clasifican en (figura 1): ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos.

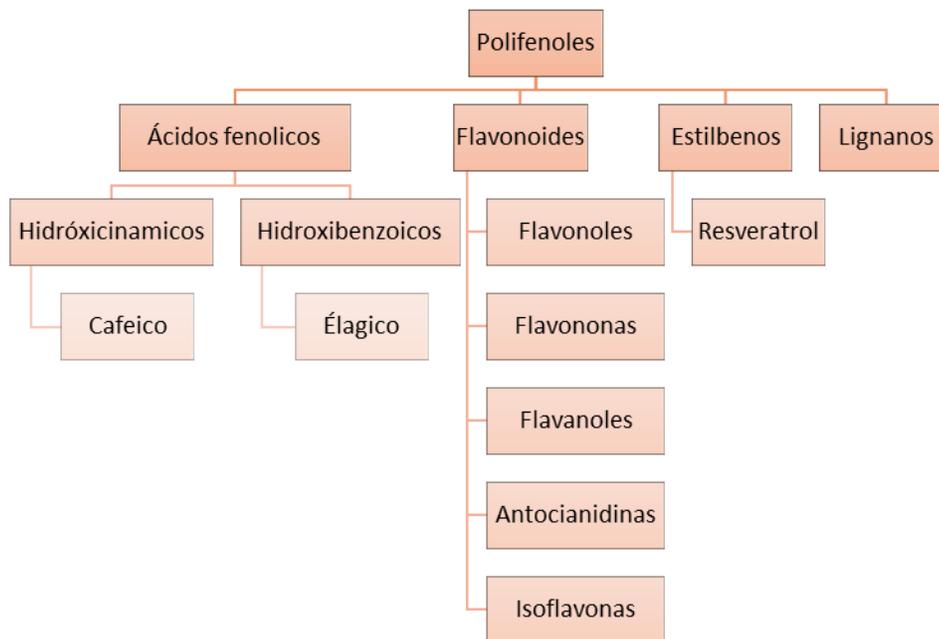


Figura 2. Clasificación de los polifenoles (Gasaly *et al.*, 2020).

Los fenoles además de proporcionar sabor le dan una propiedad saludable a la frutas y verdura, además, está muy bien estudiado que su consumo diario previene enfermedades esto debido a las propiedades que brinda como: actividad antioxidante, actividad antidiabética, anticancerígena y antiinflamatoria. La actividad antioxidante es una de las más estudiada y reportada en la literatura, debido, a que el daño oxidativo puede causar enfermedades degenerativas, como el cáncer, la osteoporosis, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, las enfermedades neurodegenerativas y la inflamación. Debido a su composición química los fenoles tienen la capacidad de inhibir los radicales libre que causan el estrés oxidativo (Gandhi *et al.*, 2018; Tatipamula y Kukavica, 2021). Estos compuestos se pueden dividir en diferentes estructuras como se muestra en la figura 3.

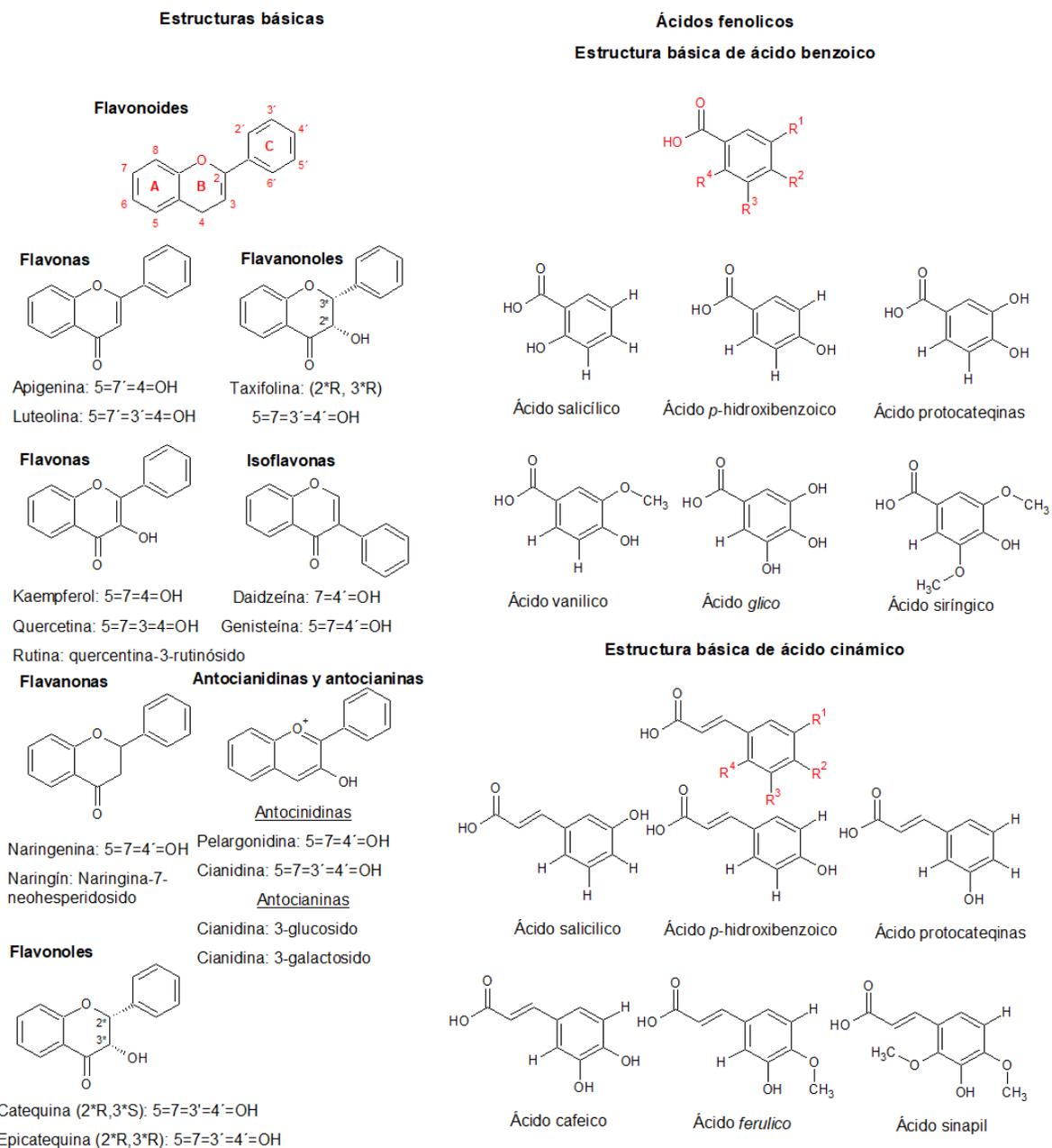


Figura 3. Estructuras básicas de flavonoides y ácidos fenólicos con ejemplos (Tatipamula y Kukavica, 2021).

2.2.1.1.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son uno de los precursores de los polifenoles y tienen en su estructura un grupo funcional de ácido carboxílico (COOH), siendo los precursores de los compuestos bioactivos. Los ácidos fenólicos son los principales componentes de la lignina en la lignocelulosa (Tinikul *et al.*, 2018).

2.2.1.1.2 Flavonoides

Los flavonoides son los fitoquímicos más comunes en la dieta, los cuales son casi dos tercios de los fitonutrientes obtenidos de origen vegetal. Los flavonoides tienen dos anillos de seis carbonos unidos por un heterociclo central de 3 carbonos (C6-C3-C6). En esta clasificación se encuentran los flavonoles, flavononas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas. (Álvarez, 2018; Gandhi *et al.*, 2018). Una gran parte de los flavonoides están asociados a un azúcar en forma conjugada y dentro de cualquier clase (monoglucosídicos, diglucosídicos, etc.). Estos glucosídicos se encuentran usualmente en la posición 3 o 7 y la unidad de carbohidrato puede ser L-ramnosa, D-glucosa, glucoramnosa, galactosa y arabinosa (Tapas *et al.*, 2008).

Los flavonoides son una de las clasificaciones más importantes de los polifenoles, por sus efectos benéficos en enfermedades cardiovasculares, metabólicas, cáncer, trastornos autoinmunes, neurológicos. Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, antiapoptótica, inmunomoduladora y antiinflamatoria (Hamsalakshmi *et al.*, 2022).

Otros mecanismos de acción de los flavonoides son: sistemas antioxidantes endógenos, la inhibición de las vías inmunoinflamatorias, los efectos similares a los antidepresivos y la mejora de las funciones mitocondriales y la neurotransmisión (Ali *et al.*, 2021).

2.2.1.1.3 Estilbenos

Existen más de 400 estilbenos naturales y se encuentran en un grupo heterogéneo de plantas, esto debido a que la enzima estilbeno sintetasa no se expresa en todo momento. Los estilbenos proviene del griego “stilbos” que significa “brillante”, Son una clase de polifenoles con un esqueleto común de 1,2-difeniletieno. Se ha demostrado que las estructuras cis y trans de los estilbenos tienen diferente actividad biológica, por lo que en algunos casos el isómero trans tiene mayor actividad y es más termoestable (Andrei *et al.*, 2019; Puerto, 2019).

2.2.1.1.4 Lignanós

Los lignanos son una clase de metabolitos secundarios que se derivan de la dimerización oxidativa de dos o más unidades de fenilpropanoide, obtenidos por la vía biosintética del ácido shikímico. Por lo que en la estructura de los lignanos comúnmente presentan fenilpropanoide, sin embargo, presentan estructuras diversas. Los lignanos se encuentran distribuidos en diferentes plantas, así como en diferentes partes de la planta como son las hojas, raíces, frutos, flores y resinas. Por sus diversas estructuras, se han reportado que los lignanos tienen varias propiedades como son: antitumoral, antioxidante, antibacteriana, inmunosupresora y antiasmática (Barker, 2019; Cui *et al.*, 2020).

2.2.1.2 Sustancias terpénicas

Los terpenos (isoprenoides) (Figura 4) son compuestos que proceden de la condensación del isopreno (2metil-1,3buta-dieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (Figura 3). Los terpenos se encuentran en alimentos de color verde, aceites vegetales productos derivados de la soya y cereales (López *et al.*, 2012).

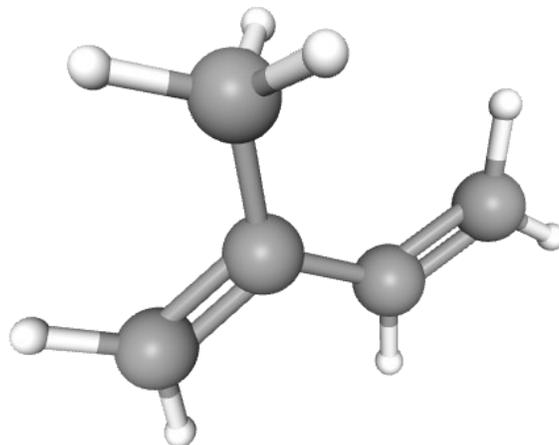


Figura 4. Estructura del isopreno (NIH, 2022).

Los terpenos son los principales responsables del sabor y aroma de las plantas, se encuentran en la mayoría de las formas de vida, especialmente en las plantas, siendo importantes por tener una gran variedad de estos compuestos, por lo cual también tiene una heterogeneidad en cuanto a funciones y estructuras. Estos compuestos tienen diferentes funciones en las plantas como son: de pigmento (carotenoides), acarreadores de electrones (plastoquina), reguladores de crecimiento y desarrollo (Fitohormonas), elementos estructurales (glicoproteínas) y funcionales de la membrana (fitoesteroles) (González *et al.*, 2016).

2.2.2 Compuestos bioactivos del propóleo

Se han identificado más de 500 compuestos químicos bioactivos en el propóleo en distintas zonas del mundo, la mayoría son metabolitos secundarios de plantas, entre estos compuestos químicos se encuentran fenoles, alcaloides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, flavonoides, terpenos, aminoácidos, minerales y vitaminas (E, C, B1, B2 y B6) como se muestra en la tabla 1. El propóleo tiene una estructura compleja por lo que para extraer los

compuestos químicos se utilizan diferentes solventes como: agua, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter y acetona, la composición química del extracto depende de la flora de la región y del método de extracción, el extracto acuoso presenta una capacidad antioxidante con alto contenido en polifenoles y flavonoides, principalmente ácido fenólico, lo que resulta favorable para el uso en la industria alimentaria debido a que no tiene presencia de etanol y agrega características funcionales y biológicas al producto(Coronel, 2019; Golmahi *et al.*, 2021; Irigoiti *et al.*, 2019; Šuran *et al.*, 2021).

Tabla 1. Propiedades y compuestos químicos del propóleo (Sánchez Elizalde y Marquéz Hernández, 2017).

Propiedad	Compuesto químico
Antioxidante	Flavonoides, ácido caféico y fenetil éster
Antimicótico	Pinocembrina, ácido acético y caféico
Antibacterial	Pinocembrina, Kaempferol y ácido caféico
Antiséptico	Ácido benzoico
Antiviral	Ácido caféico, luteolina y quercetina
Antimutagénica	Ácido ferúlico, cinámico y coumárico
Inhibición de tumores	Ácido caféico, fenetil éster, quercetina y crisina
Anestésico local	Pinocembrina
Antihemorrágico	Flavonoides
Curación de heridas	Ácidos fenólicos y flavonoides
Efecto aglutinante	Ácido ferúlico
Aumenta la biosíntesis de proteínas	Arginina
Curación de úlceras gastroduodenales	Luteolina, apigenina, pinocembrina y galangina
Histaminopéptica	Quercetina
Antiinflamatorio	Flavonoides y ácido caféico
Espasmolítico	Quercetina y Kaempferide
Promueve desarrollo de colágeno	Ácido ferúlico

En la tabla 2 se muestra específicamente algunos de los compuestos químicos identificados el propóleo iraní

Tabla 2. Composición química del propóleo iraní (Ahangari *et al.*, 2018)

Grupos de compuestos	Compuestos químicos
Alcaloides	12-Azabicyclo [9.2.2] pentadeca-1 (14), 11 (15) -dien-13-ona Oreofilina 3',4'-Dihidro-2'-(morfolin-4-y1)-5',7'- dinitrospiro[ciclopentano-1,3'-quinazolina]
Ácido aromático y sus ésteres	Ácido benzoico Ácido hidroxibenzoico Ácido vainílico PAG-Ácido cumaricácido Ftalato de dibutilo Ácido ferúlico Ácido isoferúlico Ácido cafeico
Ácidos grasos y sus ésteres	Ácido 2- (2', 4'-dicloro-fenoxi) fenilacético Ácido palmítico Ácido margárico

	<p>Ácido oleico Ácido esteárico Ácido 3-hidroxi esteárico Ácido eicosanoico Ácido behénico Ácido nefrosteránico 2-metoxycarbonil-2- (cis-2'pentenil) -3-metoxycarbonilo Cetilciclopentano</p>
Flavonoides	<p>Osthole Pinostrobinalcona 2', 4', 6'-trihidroxi chalcona 2- (1- (2-metilcortonoiloxi) -1-metiletil) -8-oxo-1, 2-dihidrofurano [2,3-H]2H-cromen Ácido 3-metil-but-2-enoico, 2,2-dimetil-8-oxo-3, 4-dihidro-2H8H- éster de pirano [3,2- g] cromen-3-ilo</p>
Terpenos	<p>2H-Ciclopentacicloocteno, 4,5,6,7,8,9-hexahidro-1,2,2, 3-tetrametilo Germanicol Bicicleta de dimetil-1,3,5,6-tetrametil- [1,3- (13C2)] [5.5.0] Dodeca-1,3,5,6,8,10-hexano-9,10-dicarboxilato Espiro [benzo [a] ciclopenta [3,4] ciclobuta [1,2-c] ciclohepteno- 8 (5H),2'- [1,3] dioxano], 6,7,7b, 10a-tetrahidro-1 14- Metil-colest-7-en-3-ol-15-ona (3α, 4α) - 4- Metil- estigmast-22-en-3- ol</p>

2.3 Propiedades de los compuestos

Los compuestos bioactivos se caracterizan por poseer propiedades funcionales, los cuales aportan un beneficio a la salud. Por lo que los compuestos bioactivos incorporados en alimentos juegan un papel importante en la nutrición dando lugar a la creación de un alimento funcional. Los alimentos funcionales contienen compuestos bioactivos y favorecen las funciones del organismo, además, de disminuir el riesgo de enfermedades (Choroco y Cusquisiban, 2021).

Los compuestos bioactivos al tener estas características han llamado la atención de las industrias alimentarias, cosmética, farmacéutica, entre otras. Aunque se ha demostrado las

propiedades de los fitoquímicos no se ha estudiado del todo, tanto en la diversidad y la cantidad. Sin embargo, hay mucha evidencia de sus beneficios a la salud en diferentes enfermedades (Hernandez *et al.*, 2021; Taype *et al.*, 2021). Entre las cuales se encuentra la actividad antioxidante y la actividad antidiabética.

2.3.1 Actividad Antioxidante del propóleo

Aunque los fitoquímicos pueden tener muchas propiedades las más estudiadas son la captura de radicales libres, mejor conocido como la actividad antioxidante. La respiración es un proceso esencial para la vida que realiza nuestro organismo, pero también contribuye a la producción de radicales libres, los cuales pueden producir alteraciones genéticas que aumentan el riesgo de producir diferentes enfermedades como el cáncer. Para bloquear los radicales libres son importantes estas sustancias denominadas antioxidantes (Martínez *et al.*, 2008).

Se han realizado investigaciones de la capacidad antioxidante donde se le atribuye principalmente a los compuestos fenólicos y especialmente a los flavonoides esta capacidad. Esto gracias a que los fenoles son donadores de hidrógeno de lo cual su potencial antioxidante va a depender del número y posición de sus grupos hidroxilos, así como también la presencia de donadores de electrones en sus grupos aromáticos (Kuskoski *et al.*, 2004).

La capacidad antioxidante es una propiedad importante y predominante en el propóleo, esta se encuentra correlacionada con los ácidos fenólicos y flavonoides, su importancia radica en la capacidad de neutralizar y secuestrar radicales libres, por lo cual se utiliza para el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Tabla 3),

además es utilizada en la biología, medicina, alimentos y evitar el deterioro oxidativo de los mismos (Carrasco y Cepeda, 2020; Osorio y Salamanca, 2017).

Tabla 3. Enfermedades degenerativas causadas por radicales libres (Osorio y Salamanca, 2017).

Enfermedades degenerativas causadas por radicales libres
Aterogénesis
Bronquitis enfisémica
Enfermedades de Parkinson
Distrofia muscular de Duchenne
Cáncer cervical
Enfermedades alcohólicas del hígado
Diabetes
Fallo renal agudo
Síndrome de Down
Fibroplasia retrolental (conversión de retina en masa fibrosa en recién nacidos prematuros)
Alteraciones cerebrovasculares
Enfermedades del sistema inmunitario
Isquemia: daños de reperfusión hepática
Enfermedad de Alzheimer

(Rodríguez *et al.*, 2020) reportan que, en el análisis de ocho propóleos de diferentes estados de la República Mexicana, provenientes del Estado de México y Michoacán, contenían elevados niveles de flavonoides, mientras que los de Puebla, Guanajuato y Veracruz contenían menor cantidad de flavonoides y fenoles.

2.4 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus se caracteriza por elevar los niveles de glucosa en sangre, existen 2 tipos de acuerdo con la secreción defectuosa de la insulina (Sapra y Bhandari, 2021). La hiperglicemia altera el metabolismo de los carbohidratos, lípidos, proteínas y el sistema antioxidante. Este último se relaciona porque hay una sobreproducción de especies reactivas

de oxígeno, causando estrés oxidativo, que a su vez causa daño a diferentes órganos (corazón, riñones, ojos, nervios, hígado y vasos sanguíneos). En la actualidad, se han realizado diversas investigaciones comprobando la disminución del estrés oxidativo, los niveles de glucosa en sangre, la HbA1c, las lipoproteínas de muy baja densidad, triglicéridos y además mejora el índice de acción de la insulina estas propiedades varían su eficiencia dependiendo de la región donde se obtenga el propóleo (Kitamura, 2019; Menyiy *et al.*, 2019).

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, sus consecuencias a largo plazo son ceguera, insuficiencia renal, ataques cardíacos, derrames cerebrales y amputación de miembros inferiores, además, es un factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares, tuberculosis y COVID-19 (OPS, 2021).

El panorama nacional sobre la morbilidad y mortalidad por diabetes menciona que 62 millones de personas tienen esta enfermedad y 244 084 mueren cada año. En el 2018 se presentaron las entidades federativas de Campeche (14.01%), Hidalgo (12.83%) y Tamaulipas (12.77%) como los estados con las prevalencias más altas de personas diagnosticadas con esta enfermedad (INEGI, 2021).

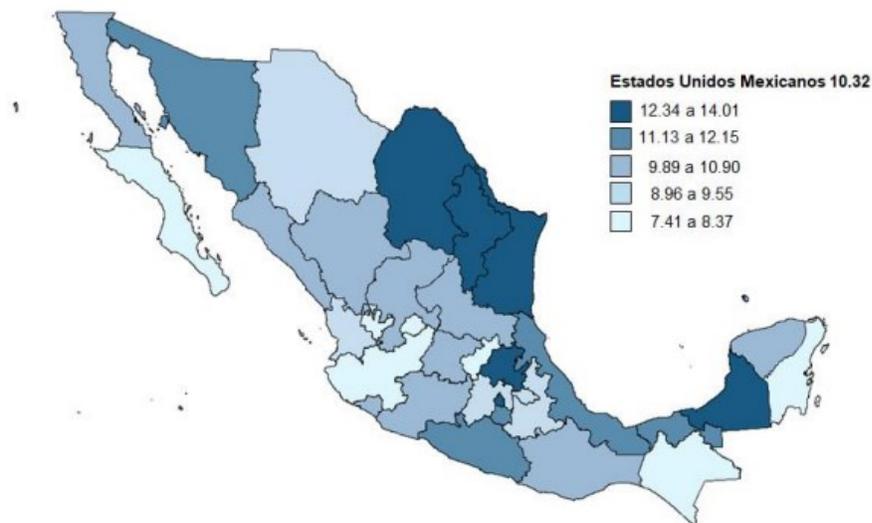


Figura 5. Prevalencia de diabetes mellitus en el 2018 (INEGI, 2021).

2.4.1 Actividad antidiabética del propóleo

El desarrollo de fármacos sintéticos para el tratamiento de la diabetes, aún no se ha logrado el paradigma de tratamiento seguro y eficaz. Por lo que la OMS ha recomendado la investigación y la evaluación de tratamientos con plantas para la diabetes, ya que estos suelen ser efectivos y tener menos o ningún efecto tóxico y son considerados excelentes candidatos. Los fitoquímicos son compuestos que han sido estudiados para el tratamiento y el retraso de complicaciones de esta enfermedad entre los cuales se les atribuye a los alcaloides, glucósidos, Flavonoides, terpenos y esteroides entre otros. Estos compuestos utilizan diferentes mecanismos como son la inhibición de diferentes enzimas, la producción de insulina, reducción de glucosa en suero o plasma y compuestos que se comportan como insulina (Gaikwad *et al.*, 2014; Ortiz, 2018).

Entre los mecanismos de la actividad antidiabética está la inhibición de la α -amilasa y α -glucosidasa. Dado que la α -amilasa es una enzima que se encuentra en el proceso digestivo,

la cual se encarga de descomponer el rompimiento de los enlaces en las moléculas de almidón. Y la α -glucosidasa es una enzima que cataliza la ruptura de enlaces glucosídicos de carbohidratos para liberar la glucosa. Para posteriormente la glucosa ser liberada, absorbida en el intestino y transportada al torrente sanguíneo. Al inhibir la α -amilasa y α -glucosidasa reduce la glucosa postprandial, por lo es un enfoque prospectivo para el tratamiento de la diabetes (Gondi y Prasada, 2015).

Rivera *et al.* (Rivera *et al.*, 2018) mencionan que el extracto etanólico de propóleo del estado de Chihuahua, utilizado como tratamiento en ratones diabéticos, se redujo de aproximadamente el 40% en los niveles de glucosa en sangre, evitando a su vez disminución en el peso corporal de los ratones, en el mismo experimento se detectó insulina en los ratones con el tratamiento, mientras que los que no recibieron el tratamiento se deduce que sin el efecto de propóleo hubo deterioro de los islotes pancreáticos.

En el 2019 Xue *et al.* realizaron un tratamiento con propóleo en ratas diabéticas concluyendo que hubo una reducción de glucosa en plasma y mejoramiento de la insulina, y proponen un mecanismo de mejora en la hiperglicemia en el cual el propóleo podría reparar el daño de la mucosa intestinal.

Medina *et al.* (2019) realizaron extractos ácidos de frutos de cactus donde evaluó el efecto sobre α -amilasa y α -glucosidasa, concluyendo que el fruto contiene compuestos bioactivos, fenoles y flavonoides con actividades inhibitoras efectivas contra enzimas clave vinculadas a la diabetes mellitus.

3 Definición de problema

La diabetes, es una enfermedad crónico-degenerativa en la cual los niveles de glucosa se ven afectados al estar elevados, por lo tanto, es considerada uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Entre las consecuencias causadas por la hiperglicemia, se encuentran la ceguera, insuficiencia renal, ataques cardiacos, derrames cerebrales y amputación de miembros, además, las personas diabéticas tienen mayor riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares, tuberculosis y COVID-19 en comparación con la población que no padece enfermedad.

En la región de América, se estima que 62 millones de personas tienen diabetes, de los cuales, un 43% presenta mortalidad prematura. En el 2018, el panorama nacional sobre la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad, se observó un incremento de diagnósticos, conforme aumenta la edad y se dieron a conocer cuáles son las entidades federativas con prevalencias a partir 20 años las cuales son: Campeche (14.01%), Hidalgo (12.83%) y Tamaulipas (12.77%).

4 Justificación

La diabetes es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial por lo que se buscan alternativas naturales para su tratamiento (OPS, 2021). Debido a que existe evidencia de la actividad antioxidante que tiene el propóleo, y está relacionada como alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas, es necesaria la realización de investigaciones para determinar las propiedades que contiene propóleo mexicano.

En México, existen estudios de caracterización del propóleo, sin embargo, hay escasa cantidad de información respecto de su actividad antidiabética. Uno de los mecanismos es la inhibición de enzimas digestivas el cual se basa en los inhibidores de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, para el control de la glucemia postprandial, los cuales están relacionados con la actividad antidiabética, por lo que se sugiere hacer uso del extracto de propóleo por su riqueza en compuestos bioactivos. Por otro lado, es importante saber si estos compuestos se conservan durante la digestión donde se lleva a cabo la inhibición de las enzimas para ello se evaluará mediante una digestión *in vitro*. Además, los resultados de esta investigación contribuirán según sea el caso a buscar alternativas para conservar de manera eficiente los compuestos bioactivos durante la digestión, considerar el propóleo como una alternativa al tratamiento de la diabetes o incorporarlo en algún alimento.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos de los propóleos con actividad antioxidante y antidiabética extraídos por ultrasonido después de una digestión *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

- Elaborar extractos etanólicos de propóleo por ultrasonido para conocer su porcentaje de rendimiento y evaluar si tiene relación con el contenido de compuestos químicos.
- Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides en los extractos, así como de la fase gástrica e intestinal con el fin de conocer la estabilidad de los compuestos fenólicos en la digestión simulada.
- Evaluar la capacidad antioxidante y el potencial inhibidor de la α -amilasa y α -glucosidasa para conocer la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos de los extractos de propóleo durante la digestión simulada

6 Materiales y Métodos

6.1 Obtención de la muestra

El propóleo se obtuvo de 4 diferentes municipios del estado de Oaxaca los cuales son: Eloxochitlán de Flores Magón (Longitud: 18°10'34"N 96°52'33"O y altitud de 1345 metros sobre el nivel del mar); Teotitlán de Flores Magón (Longitud: 18°07'57"N 97°04'20"O y altitud de 1015 metros sobre el nivel del mar); San Jerónimo Tecóatl (Longitud: 18°10'00"N 96°55'00"O y altitud promedio de 1400 msnm); San Pedro Ixcatlán (Longitud: 18°09'N 96°30'O y altura de 76 msnm)., fueron proporcionados por la asociación de apicultores, miel y néctar mazateco, ubicada en San Jerónimo y transportados al Laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario Integral ubicado en Tulancingo Hidalgo en condiciones de oscuridad y a temperatura de 15 °C

Las muestras se molieron finalmente en la licuadora (BLENDER WARING COMMERCIAL, Estados Unidos), posteriormente se guardaron en congelación a -4 °C y en bolsas negras hasta su procesamiento.

6.2 Extracción asistida por ultrasonido

Para la extracción etanólica del propóleo se utilizó el método descrito por Oroian *et al.* (2019) con algunas modificaciones.

Se pesaron 10 g de cada uno de los propóleos molidos, para posteriormente agregarlos en frascos de 1000 mL con 300 mL de etanol al 80 % (1:30) por separado, se colocaron en el baño ultrasónico (Branson, 3510R-DTH, Estado Unidos) durante 30 min a 25 °C (40 kHz). Una vez sonicadas las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min a 4°C en la

centrífuga (HERMLE, Z36 HK, Alemania), del cual se recuperó el sobrenadante y se desechó el precipitado. Después se filtró el sobrenadante con papel filtro (No. 102, 80g/m²) para a continuación colocarlos en refractarios y se dejaron en la estufa de aire forzado a 40°C durante 24 hrs. para la eliminación del solvente.

El rendimiento se calculó de acuerdo con Popova *et al.* (2007) utilizando la ecuación 1. Considerando el peso del propóleo crudo al inicio y el peso del extracto.

$$\text{Porcentaje Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto etanolico}}{\text{Peso de propóleo crudo}} \times 100$$

(Ecuación 1)

6.3 Determinación de compuestos bioactivos

6.3.1 Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999) con algunas modificaciones.

Se preparó el fenol Folin-Ciocalteu (F9252 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.2 N y Carbonato de sodio (Na₂CO₃, 17903 Fermont, Monterrey, NL, MEX) a 0.7 N.

Se realizaron diluciones 1:100 de los extractos con etanol al 80 %, de los cuales se tomaron 0.3 mL y se mezclaron con 1.5 mL de fenol Folin-Ciocalteu, por triplicado, se dejó reposar en oscuridad durante 8 min. Posteriormente se agregó 1.2 mL de carbonato de sodio, se dejó reposar durante 2 horas en oscuridad. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 765 nm usando como blanco agua destilada.

Se realizó una curva de calibración de 0 - 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando ácido Gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, 03251 Fermont, Monterrey, NL, MEX) como estándar de referencia (Anexo 1). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra (mg GAE/100 g de muestra).

6.3.2 Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó de acuerdo con el método descrito por Arvouet-Grand *et al.* (1994) con algunas modificaciones.

Se preparó tricloruro de aluminio (AlCl_3 , 0455 Meyer, Tláhuac, CDMX, MEX) al 2 % en metanol puro.

Para la lectura de los extractos se utilizaron diluciones de 1:100 con metanol puro de la cual se tomaron 2 mL, se mezcló con 2 mL de la solución de AlCl_3 , se realizó por triplicado y se dejó reposar durante 20 min en oscuridad. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 415 nm usando como blanco metanol puro.

Se realizó una curva de calibración de 0 - 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando quercetina (Q4951 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como estándar de referencia (Anexo 2). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina/100 g de muestra (mg QE/100 g de muestra).

6.4 Determinación de capacidad antioxidante

6.4.1 Inhibición de radical DPPH•

Para la inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•, D9132 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se siguió la metodología descrita por Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones.

El DPPH se preparó con metanol 80 %, posteriormente se dejó en agitación durante 2 horas en oscuridad. Después se estandarizó ajustando la absorbancia a 0.7 ± 0.01 a 515 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) utilizando como blanco metanol al 80 %.

Para las lecturas de los extractos se realizaron una dilución de 1:100 con metanol al 80 % de la cual se tomaron 0.5 mL, se mezclaron con 2.5 mL de solución de DPPH estandarizado, se realizó por triplicado y se dejaron en reposo durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. La lectura se realizó en el espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis.) a 515 nm usando como blanco metanol al 80 %. Se realizó una curva de calibración de 0 - 30 $\mu\text{g/mL}$ utilizando ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox, 238813 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como estándar de referencia (Anexo 3) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de trolox/100 g de muestra (mg ET/100 g de muestra).

6.4.2 Inhibición de radical ABTS•⁺

Para la inhibición de radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS•⁺, A1888 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones.

Se prepararon 10 mL de ABTS^{•+} 7 mM con agua destilada, se agregó 10 mL de persulfato de potasio (K₂S₂O₈, 55842 FERMONT, Monterrey, NL, MEX) 2.45 mM, se dejó en agitación durante 16 horas en oscuridad. Después se estandarizó ajustando la absorbancia a 0.7 ± 0.01 a 734 nm utilizando como blanco etanol al 20 %.

Los extractos se diluyeron 1:100 con etanol al 20 % del cual se tomó 0.2 mL, se mezclaron con 2 mL de solución de ABTS^{•+} estandarizado, se realizó por triplicado y se dejó reposar 6 min en oscuridad a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 734 nm usando como blanco etanol al 20 %. Se realizó una curva de calibración de 0 - 60 µg/mL utilizando Trolox (238813 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como estándar de referencia (Anexo 4) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de trolox/100 g de muestra (mg ET/100 g de muestra).

6.5 Indicadores de la actividad antidiabética

6.5.1 Ensayo *in vitro* de α-amilasa

El ensayo *in vitro* de α-amilasa se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Abirami *et al.* (2014).

Se preparó la solución stock de ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS, 128848 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), disolviendo 0.1 g de DNS más 30 g de tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆, T1070 APM, CDMX, MEX) en 20 mL de hidróxido de sodio 2 mol/L (NaOH, 36911 Fermont, Monterrey, NL, MEX) y finalmente se aforó hasta 100 mL con agua destilada.

Los extractos se diluyeron 1:50 con etanol al 80 %, posteriormente en un tubo de ensayo se tomaron 100 µL del extracto, se le agregó 100 µL de buffer de fosfato (pH 6.9) y se

adicionaron 100 µL de solución de α-amilasa (α-Amylase from *Bacillus licheniformis*, A3306 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (8 - 10 U/mL/min), se incubó a 37 °C durante 10 min, seguidamente se le agregó 100 µL de solución de almidón (4006-01 J.T.Baker, Xalostoc, Edomex, MEX) al 1 %, se dejó incubar (37 °C) 30 min, para detener la reacción se adiciona 1 mL de solución stock de DNS, se metió a baño de agua hirviendo durante 5 min, después se sumergió en baño de hielo durante 8 min. Se realizó una dilución 1:2 y finalmente se leyó en el espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 540 nm.

Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación 2 descrita por Nyambe *et al.* (2015), utilizando buffer de fosfato como control, donde la $Abs_{muestra}$ es la absorbancia obtenida de las muestras y $Abs_{control}$ es la absorbancia utilizando el buffer de fosfato. Se utilizó acarbosa (Glucobay® Comp. 50 mg) como estándar.

$$\% \text{ inhibición de } \alpha - \text{amilasa} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{Abs_{control}} \times 100$$

(Ecuación 2)

6.5.2 Ensayo *in vitro* α-glucosidasa

El ensayo *in vitro* de α-glucosidasa se realizó de acuerdo con la metodología realizada por Gondi y Prasada (2015) con algunas modificaciones.

Se mezcló 200 µL de extracto de propóleo con 100 µL de p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (10 mg en 2 mL buffer de fosfato) y se incubaron a 37 °C por 10 min. Posteriormente se adiciono 40 µL de enzima α-glucosidasa (se preparó adicionando 2 mg en 1 mL de buffer de fosfato; 5.7 U/g) y se dejó reaccionar durante 20 minutos. Para detener la actividad enzimática, se agregaron 4 mL de Na₂CO₃ al 1 M y 5 mL de agua destilada,

finalmente se leyó en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo, 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 405 nm usando como agua destilada.

Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación 3, utilizando buffer de fosfato como control, donde la $Abs_{muestra}$ es la absorbancia obtenida de las muestras y $Abs_{control}$ es la absorbancia utilizando el buffer de fosfato. La acarbosa (Glucobay® Comp. 50 mg) se usó como inhibidor de referencia.

$$\% \text{ inhibición de } \alpha - \text{ glucosidasa} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{Abs_{control}} \times 100$$

(Ecuación 3)

6.6 Digestión simulada

Para la digestión simulada se llevó a cabo con metodología descrita por Minekus *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Se utilizó la fase gástrica y la fase intestinal.

Se preparó para una solución gástrica de 20 mL con 40 000 U/pepsina (Pepsina de mucosa gástrica porcina, P7000 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cloruro de calcio (Ca_2Cl_2 , 930-500 Meyer, Tláhuac, CDMX, MEX) 0.3 M y se aforó con ácido clorhídrico (HCl, 9535-05 J.T.Baker, Xalostoc, Edomex, MEX) 0.1 M Además, se preparó una solución intestinal de 100 mL con 0.4 g de pancreatina (608 Hycel, CDMX, MEX), 42.5 g de sales biliares (7230 Neogen, Lansing, MI, USA) y aforando bicarbonato de sodio con 0.1 M ($NaHCO_3$, S6014 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Se partió de una concentración de 50 mg/mL de propóleo, posteriormente se diluyó 2 mL de extracto en 3 mL metanol 80%, después, se ajustó a pH 2 con HCl 5 M, se agregó 20 mL de solución gástrica y se dejó 2 horas en incubación en baño maría con agitación horizontal

(Scorpion Scientific, Modelo A 50651, México) a 37 °C. Del volumen total se tomaron 12.5 mL, se ajustó a 7 pH con NaHCO₃ 0.5 M y se le agregó 1.25 mL de solución intestinal, después, se dejó 2 horas en incubación en baño maría con agitación horizontal a 37 °C. Finalmente se centrifugaron inmediatamente (HERMLE, Modelo Z36 HK, Alemania) a 12 000 rpm durante 10 min. y se realizaron los análisis de las alícuotas que se tomaron.

6.7 Análisis estadístico

Se realizaron extractos etanólicos de propóleos: propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP) y propóleo de San Jerónimo (PSJ), a los cuales se sometieron a una digestión simulada de dos fases (fase gástrica y fase intestinal) posteriormente se evaluaron fenoles totales, flavonoides, ABTS•⁺, DPPH•, α-amilasa y α-glucosidasa, todas las pruebas se realizaron por triplicado y se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias muestrales se analizaron mediante una prueba de comparación de medias Tukey con diferencias significativas ($p < 0.05$). Todos los análisis se realizaron empleando el software IBM® SPSS Statistics versión 24 (2019).

7 Resultados y discusión

7.1 Porcentaje de rendimiento

Con base en la literatura, se seleccionaron las condiciones más adecuadas, utilizando el método de extracción por ultrasonido y etanol al 80 % como disolvente con un tiempo de sonicación de 30 minutos.

Tabla 3. porcentaje de rendimiento de los propóleos

Muestras de propóleo	% rendimiento
Eloxochistlán (PE)	68 ± 0.28 ^c
Teotitlán (PT)	42 ± 0.25 ^a
San Pedro (PSP)	69 ± 0.35 ^d
San Jerónimo (PSJ)	49 ± 0.26 ^b

Los valores presentados son la media ± error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

El propóleo de PE y PSP obtuvieron mayor rendimiento en comparación con los ET y ESJ (tabla 3). El Rendimiento obtenido por Carrasco y Cepeda (2020) con el método de maceración y utilizando propóleo de Ecuador, cae dentro del intervalo de rendimientos reportados aquí. Los rendimientos obtenidos de los propóleos de Oaxaca son similares a los reportados por Rodríguez *et al.* (2020), donde se analizaron 8 extractos de propóleo obtenidos por ultrasonido de diferentes estados de México, obteniendo un porcentaje máximo de rendimiento de 50.9 y un mínimo de 25.5.

Oroian *et al.* (2019), utilizaron propóleos de Rumania y reportaron rendimientos que oscilan del 32 a 92 % de diferentes métodos de extracción, donde el ultrasonido tuvo mejores resultados.

El método de extracción por ultrasonido aumenta los parámetros de rendimiento y compuestos fenólicos (Wong *et al.*, 2020). Los rendimientos de los extractos de propóleos son diferentes debido a que, el propóleo crudo presenta impurezas como; cera, restos de insectos, astillas de madera de las colmenas y otros desechos. Las prácticas apícolas influyen de manera negativa en el rendimiento final de los extractos de propóleos, por el contenido de material extraño (Escriche y Juan, 2018). Además, el método y el tipo de solvente utilizado también influyen en el rendimiento, al utilizar solventes orgánicos (Etanol, metanol) funciona mejor para la extracción de propóleo (C.-T. Chen *et al.*, 2019). Además, el rendimiento también se ve afectado por el método de extracción, el tipo de solvente, el tiempo de extracción y temperatura (C. T. Chen *et al.*, 2019; Golmahi *et al.*, 2021).

7.2 Determinación de compuestos bioactivos

A los compuestos fenólicos que tienen los propóleos les atribuyen su capacidad antioxidante, farmacológica, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria, hepatoprotectora, antiinflamatoria, propiedades antivirales, anticancerígenas y antitumorales (Anjum *et al.*, 2019). Por lo anterior, es importante conocer el contenido de los compuestos fitoquímicos presentes en los propóleos para determinar su capacidad antioxidante. Por lo general el contenido de fenoles varía de 3000 a 20000 mg GAE/100 g propóleo, el contenido de

flavonoides oscila entre los 3000 a 7000 mg EQ/100 g de propóleo y de 20 a 190 µg/mL en el caso de la actividad de eliminación de radicales libres de DPPH• (Kocot *et al.*, 2018).

7.2.1 Determinación de fenoles totales

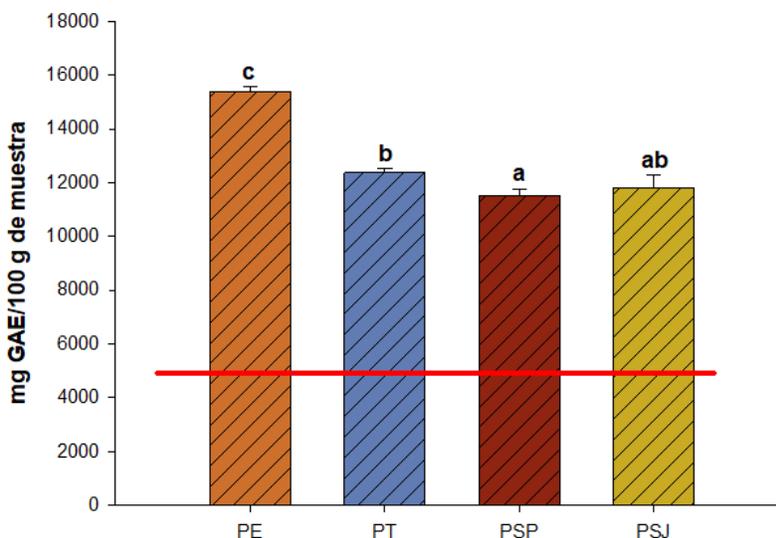


Figura 6. Contenido de fenoles totales. La línea roja indica el contenido mínimo de fenoles totales especificado por la NOM-003-SAG/GAN-2017. Propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP) y propóleo de San Jerónimo (PSJ). Los valores presentados son la media \pm error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

En los extractos, el contenido de fenoles totales de los propóleos mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) en un rango de 15,362.4 a 11,520.3 mg GAE/100 g (figura 6), cumpliendo lo indicado en la NOM-003-SAG/GAN-2017 (fenoles totales: > 5000 mg GAE/100 g de muestra) (SEGOB, 2017), estos resultados son menores a los presentados por Yuan *et al.* (2019), donde se estudió propóleo chino, que reportaron 24,584 mg GAE/100 g, pero mayores a los 7,621 a 9,294 mg GAE/100 g, reportados por Zainal *et al.* (2021), que utilizaron propóleos de Malasia. Las abejas recolectan la resina de diferentes plantas por lo

que variabilidad de los compuestos químicos del propóleo está directamente relacionada con la disponibilidad de la vegetación en donde encuentra la colmena, asimismo son importante las condiciones y el tipo de compuestos que tenga la planta (Ribeiro *et al.*, 2023). Uno de los factores principales en obtención de los compuestos bioactivos es método de extracción, los cuales sean estudiado y comparado concluyendo que la extracción por ultrasonido es la mejor alternativa con las condiciones adecuadas (Teixeira *et al.*, 2023; Trusheva *et al.*, 2007; Yusof *et al.*, 2021).

7.2.2 Determinación de flavonoides totales

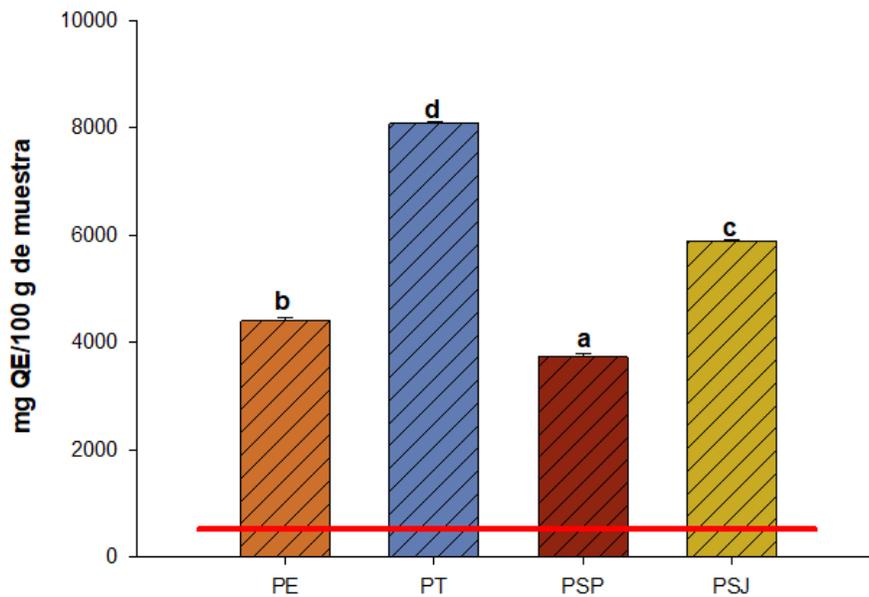


Figura 7. Contenido de flavonoides totales. La línea roja indica el contenido mínimo de fenoles totales especificado por la NOM-003-SAG/GAN-2017. Propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP) y propóleo de San Jerónimo (PSJ). Los valores presentados son la media \pm error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

El extracto de PT destacó por su contenido de flavonoides con 8,084.6 mg QE/100 g de muestra, mientras que los extractos de PE, PSP y PSJ se mantuvieron entre los 3,721.7 a 5,881.6 mg QE/100 g de muestra (Figura 7), el contenido de flavonoides en las 4 muestras se encuentra dentro de lo indicado en la NOM-003-SAG/GAN-2017 (Flavonoides totales: > 500 mg QE/100 g muestra) (SEGOB, 2017). Estos resultados son superiores a los reportados por Aboulghazi *et al.*(2022), utilizando propóleos marroquíes (970 a 3472 mg QE/100 g de muestra) con el mismo tiempo de extracción, pero diferentes relaciones y concentración de solvente, así mismo en otros estudios utilizando extracción por maceración Aboulghazi *et al.* (2022) y Barrientos *et al.*(2023) donde obtuvieron flavonoides totales de 1745 a 2479 mg QE/100 g de muestra y 1 a 1298 mg QE/100 g de muestra (propóleos colombianos) respectivamente. Los extractos de propóleo tienen diferencias en la composición química y actividad biológica debido a una correlación en la flora y el método de extracción, además, los flavonoides al ser sustancias polares del propóleo son solubles en etanol (Sun *et al.*, 2022). Otra razón podría ser la diferencia entre regiones como cambio climático, estacional y tiempo de recolección (Ding *et al.*, 2021).

7.3 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se atribuye principalmente a los compuestos fenólicos y especialmente a los flavonoides. Esto gracias a que, los fenoles son donadores de hidrógeno por lo cual su potencial antioxidante va a depender del número y posición de sus grupos hidroxilos, así como también la presencia de electrones donadores en sus grupos aromáticos (Kuskoski *et al.*, 2004).

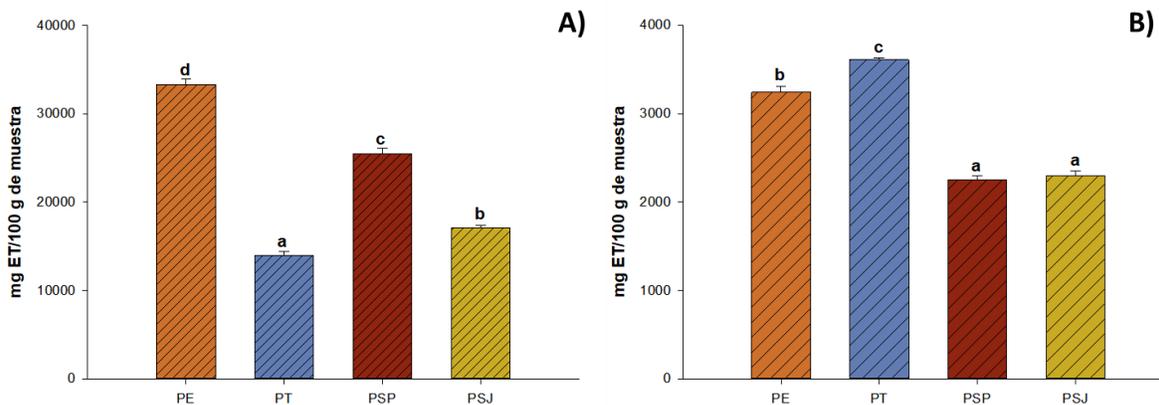


Figura 8. Contenido de ABTS•⁺ (A) y DPPH• (B) de los extractos de propóleo. Propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP) y propóleo de San Jerónimo (PSJ). Los valores presentados son la media \pm error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

En la Figura 8 se muestra que el extracto de PE tiene mayor capacidad antioxidante mediante la inhibición del radical ABTS•⁺ con 33,307.1 mg ET/100 g de muestra, el contenido en el extracto de PSJ>PSP>PE, en un rango de 13,984.4 a 25,483.4 mg ET/100 g de muestra y existen diferencias significativas entre los extractos ($p < 0.05$). El extracto PT tienen mayor inhibición del radical DPPH• que el extracto PE, mientras que las muestras PSP y PSJ no tienen diferencia significativa ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos de ABTS•⁺ son similares a los reportados por Bayram *et al.* (2020) y Cunha *et al.* (2021) donde reportaron 18,640 mg ET/100 g de muestra y 21,135 mg ET/100 g de muestra respectivamente. Peng *et al.* (2023) reportaron valores máximos de DPPH• y ABTS•⁺ de 11,845 mg de TE/100 g muestra y 17,518 mg de TE/100 g muestra respectivamente, donde, los valores de ABTS•⁺ son menores, pero los de DPPH• son mayores a los reportados en este estudio, de igual forma Altuntaş *et al.* (2023) reportaron valores de DPPH que oscilaron entre 4,672 a 22,823 mg TE/100 g de muestra, donde utilizaron propóleos de Turquía. La variación del alto potencial

antioxidante tanto en la inhibición del radical ABTS^{•+} y DPPH[•] es debido principalmente a la presencia de diferentes compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos de propóleo (Lima *et al.*, 2022; Miłek *et al.*, 2022; Widelski *et al.*, 2022).

7.4 Determinación de capacidad antidiabética

7.4.1 Ensayo *in vitro* de α-amilasa

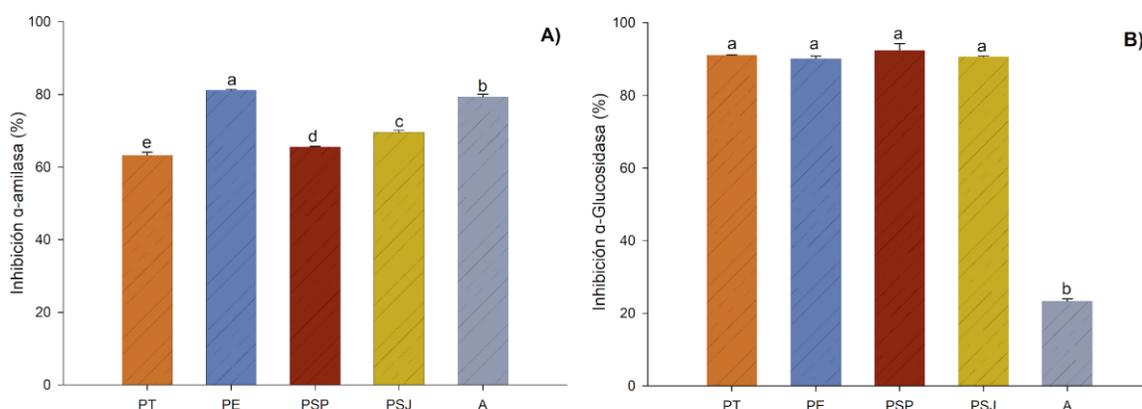


Figura 9. Inhibición de la α-amilasa (A) y α-glucosidasa (B) de extractos de propóleo. Propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP) y propóleo de San Jerónimo (PSJ). Los valores presentados son la media ± error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

La inhibición de α-amilasa mostró que la acarbosa tiene mayor inhibición (79.3 %), pero en los extractos fueron el PSJ (69.5 %) y PT (67.3 %), mientras que los demás se mantuvieron arriba de 60 % (figura 9 A), Cunha *et al.* (2023), reportaron que en otros estudios que los flavonoides son los principales agentes antidiabéticos del propóleo, esta relación se hace notar debido a PSJ y PT también son los extractos con mayor contenido de flavonoides. En el ensayo de α-glucosidasa la acarbosa y el extracto PT tiene la menor inhibición con 30 %, seguido de PSJ con 61 % y el PE tiene mayor inhibición con 95 % (Figura 9 B). Karagecili

et al. (2023), reportaron que la acarbosa tienen menor inhibición de la α -glucosidasa que propóleos de Turquía.

Estos resultados concuerdan con informes anteriores donde mostraron inhibición de la α -amilasa y α -glucosidasa en propóleo de Nigeria Ugwor *et al.* (2022), propóleos de Marruecos El-Guendouz *et al.* (2016), propóleos de Turquía Keskin *et al.* (2020) y propóleos de Australia Uddin *et al.* (2022), donde concluyeron que los compuestos fenólicos y principalmente los flavonoides puede inhibir estas enzimas digestivas, lo que retrasa la digestión de los carbohidratos y evita la absorción de la glucosa, por lo tanto, disminuye la hiperglucemia posprandial.

7.5 Digestión simulada

7.5.1 Evaluación de los compuestos bioactivos durante la digestión

Tabla 4. Contenido de fenoles y flavonoides en la digestión simulada.

Muestras	Fenoles totales (mg GAE/100 g de muestra)			Flavonoides totales (mg QE/100 g de muestra)		
	Extracto	Fase gástrica	Fase intestinal	Extracto	Fase gástrica	Fase intestinal
PE	15,362.4 ± 225 ^a	6,022.0 ± 171 ^a	3,284.8 ± 148 ^a	4,395.5 ± 62 ^c	383.6 ± 39 ^c	1,524.3 ± 60 ^c
PT	12,360.8 ± 158 ^b	4,464.9 ± 265 ^{bc}	2,594.5 ± 357 ^b	8,084.6 ± 19 ^a	1,481.1 ± 55 ^a	2,146.5 ± 37 ^a
PSP	11,520.3 ± 247 ^c	3,658.2 ± 485 ^c	1,713.8 ± 4 ^c	3,721.7 ± 73 ^d	131.2 ± 23 ^d	807.0 ± 51 ^d
PSJ	11,820.5 ± 455 ^{bc}	4,521.2 ± 265 ^b	2,439.0 ± 214 ^{bc}	5,881.6 ± 27 ^b	588.4 ± 53 ^b	1,958.0 ± 33 ^b

Propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP) y propóleo de San Jerónimo (PSJ). Los valores presentados son la media ± error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

A los extractos obtenidos se les realizó una digestión de dos fases donde se observó que el extracto de PE es el que tiene mayor contenido de fenoles totales, seguido de PT, PSJ y PSP (Figura 6), evidenciando un comportamiento similar en la fase gástrica de 6,022.0 a 3,658.2 mg GAE/100 g y fase intestinal de 3,284.8 a 1,713.8 mg GAE/100 g. sin embargo, en la transición del extracto a la fase gástrica el contenido de fenoles disminuye de 60 a 68 % y partiendo del extracto a la fase intestinal se reduce de 78 a 85 %. Siendo el PE el de mayor contenido y menor disminución de fenoles, contrario a PSP con menor contenido y mayor disminución (tabla 4). González *et al.* (2022), reportaron un comportamiento similar teniendo una disminución de un 80% del contenido de compuestos fenólicos y mencionaron que la disminución puede deberse al pH ácido o la pepsina. Esto se relaciona con estudios donde se ha observado una disminución en la actividad de la pepsina sugiriendo escisiones autolíticas lo cual sucede después de la activación de esta en condiciones de digestión, por otra parte, los compuestos fenólicos tienen la capacidad de unirse covalentemente a

estructuras proteicas como son enzimas y receptores celulares (Prado Massarioli *et al.*, 2023; Stewart *et al.*, 2019). Por lo que supone una interacción entre los compuestos químicos y la pepsina o sus fragmentos, además, pH ácido pues inducir hidrólisis ácida o transformación estructural de los compuestos fenólicos (Cardoso *et al.*, 2022).

De acuerdo con el contenido de flavonoides los extractos se pueden ordenar de mayor a menor; PT, PSJ, PE y PSP (Figura 7), conservando el orden durante fase gástrica e intestinal, esto podría deberse a que se utilizaron las mismas condiciones y los propóleos son de regiones similares, aunque haya diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos, es proporcional en cada fase. De la misma manera que en los fenoles, los flavonoides presentan una disminución al pasar de los extractos a la fase gástrica (80 - 96 %), pero en este caso aumentó al pasar a la fase intestinal (66 – 79 %) (tabla 4). Ozdal *et al.* (2019), analizaron mediante digestión simulada 11 propóleos y observaron un comportamiento similar al transcurrir la digestión, obteniendo una disminución del contenido de flavonoides del extracto a la fase intestinal de hasta 45 %. Mientras que González *et al.* (2022), obtuvieron una disminución de 92 %. Estos resultados pueden deberse a que, los flavonoides son isomerizados en la fase gástrica y debido al cambio de pH vuelven a la normalidad en la fase intestinal.

7.5.2 Determinación de actividad antioxidante durante la digestión

Tabla 5. Capacidad antioxidante durante la digestión simulada.

Muestra	ABTS ^{•+} (mg ET/100 g de muestra)			DPPH [•] (mg ET/100 g de muestra)		
	Extracto	Fase gástrica	Fase intestinal	Extracto	Fase gástrica	Fase intestinal
PE	33,307.1 ± 567 ^a	4,867.0 ± 136 ^b	4,068.7 ± 360 ^a	3,242.3 ± 69 ^b	839.2 ± 39 ^{ab}	1,454.7 ± 22 ^a
PT	13,984.4 ± 436 ^d	1,546.5 ± 104 ^c	1,587.1 ± 86 ^b	3,611.4 ± 17 ^a	764.2 ± 8 ^b	907.7 ± 33 ^d
PSP	25,483.4 ± 601 ^b	1,592.0 ± 68 ^c	1,471 ± 132 ^b	2,250.1 ± 43 ^c	928.6 ± 54 ^a	1,052.2 ± 66 ^c
PSJ	17,041.1 ± 327 ^c	6,004.6 ± 208 ^a	3,924.5 ± 259 ^a	2,296.3 ± 59 ^c	940.2 ± 39 ^a	1,246.1 ± 28 ^b

Propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP) y propóleo de San Jerónimo

(PSJ). Los valores presentados son la media ± error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican

diferencias significativas ($P < 0,05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

En la digestión hubo una disminución en el potencial de eliminación del radical ABTS^{•+} del extracto a la fase gástrica 64 a 93 % y del radical DPPH[•] fue de 58 a 78 %, así mismo, los extractos mostraron una disminución en la inhibición del radical ABTS a la fase intestinal de PE 87 %, PT 88 %, PSP 94%, PSJ 76 %, y en la eliminación del radical DPPH[•] la disminución fue de PE 55 %, PT 74 %, PSP 53 %, PSJ 45 % (Tabla 5). Resultados similares fueron reportados por Ozdal *et al.* (2019), donde en el DPPH[•] tuvieron un incremento de la fase gástrica a la intestinal, sin embargo, González *et al.* (2022), reportaron disminuciones la actividad antioxidante del radical ABTS^{•+} en la fase gástrica de 86 a 93 % y en el radical DPPH[•] un aumento de casi el 50 %, el cual lo atribuyen al pH ácido, en este estudio no se ve ese incremento debido a que se neutralizó para evitar interferencia del pH y así compuestos fenólicos no actúan como prooxidantes (Martelli *et al.*, 2023). Por otro lado, la actividad antioxidante depende de la composición química del propóleo, la cual tiene una gran diversidad de estos compuestos y puede cambiar el comportamiento de la digestión simulada debido a las transformaciones de los compuestos fenólicos que dependen del pH como son: degradación, epimerización, hidrólisis y oxidación (Wojtunik *et al.*, 2020).

7.5.3 Determinación de actividad antidiabética durante la digestión

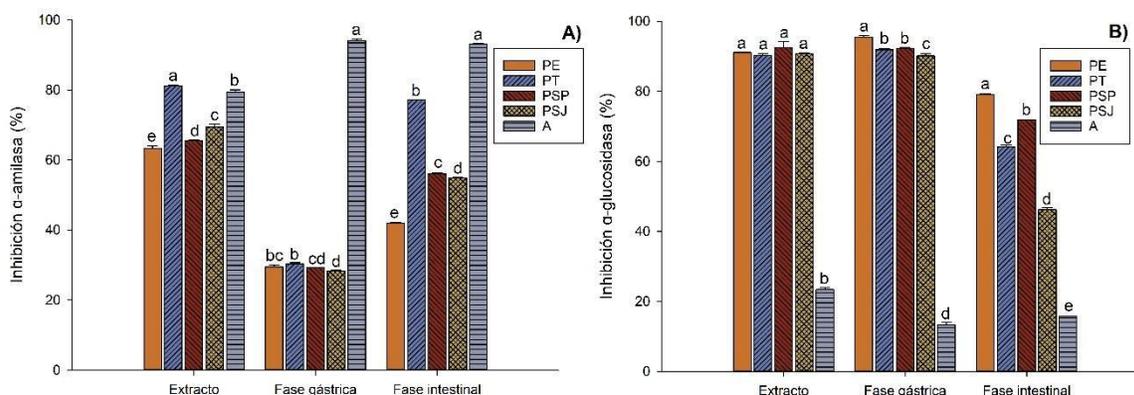


Figura 10. Inhibición enzimática durante la digestión simulada. (A) inhibición de la α -amilasa, (B) inhibición de la α -glucosidasa. Propóleo de Eloxochistlán (PE), propóleo de Teotitlán (PT), propóleo de San Pedro (PSP), propóleo de San Jerónimo (PSJ) y acarbosa (A). Los valores presentados son la media \pm error estándar de las pruebas realizadas por triplicado. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey.

Todos los extractos mostraron actividad antidiabética en las dos fases de la digestión, en el ensayo de α -amilasa se puede observar que hay una disminución en la fase gástrica en los 4 propóleos, seguido de un aumento en la fase intestinal, por otro lado, al pasar del extracto a la fase intestinal el PT tuvo un aumento de 14% y los demás tuvieron una disminución de 14 a 33 % (figura 10 A). En el ensayo de α -glucosidasa se observa el mismo comportamiento en las dos fases, sin embargo, el extracto de PT muestra un incremento por cada fase. Finalmente, al pasar del extracto a la fase intestinal PE (24%) y PSP (4%) tuvieron una disminución, mientras que PT (149%) y PSJ (4%) tuvieron un aumento en la inhibición. Debido a que la inhibición de las enzimas es atribuida a los compuestos fenólicos y el propóleo tiene una gran cantidad y variedad de estos compuestos su comportamiento en una digestión simulada es cambiante en cada muestra y se asemeja al comportamiento de los

flavonoides durante la digestión (Adaouia *et al.*, 2020). El aumento de inhibición en la fase intestinal de PT puede deberse a que tienen mayor contenido de flavonoides, estos al pasar por el medio ácido incrementan su inhibición, resultados similares reportaron Peláez *et al.* (2022), donde evaluaron el efecto de la digestibilidad *in vitro* sobre la actividad enzimática en mieles y acarbosa, donde las mieles disminuyeron su actividad y la acarbosa aumentó su actividad en cada fase de la digestión. Por otro lado, Medina *et al.* (2019, 2020), analizaron extracto cactus ácido y encapsulado del mismo y reportaron que la inhibición disminuía o se mantenía al pasar en las fases de la digestión.

8 Conclusiones

Los extractos de propóleos obtenidos del estado de Oaxaca cumplen las especificaciones indicadas en la norma mexicana para su producción y procesamiento (NOM-003-SAG/GAN-2017).

El extracto de propóleo de la comunidad de San Pedro es el que obtuvo mayor rendimiento.

Todos los extractos de propóleo tuvieron fenoles, flavonoides y actividad antioxidante. El extracto de propóleo del municipio de Eloxochistlán tiene mayor contenido de compuestos fenólicos, así como, de inhibición del radical ABTS•⁺ encontrando una disminución durante la digestión simulada *in vitro*.

Todos los extractos de propóleo inhibieron a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa que están relacionadas con la capacidad antidiabética. El extracto de propóleo del municipio de Teotitlán tiene mayor cantidad de flavonoides, por lo que proporcionalmente ejerció un mayor porcentaje de inhibición de la enzima α -amilasa. Por otra parte, en la digestión simulada disminuyó la actividad biológica de inhibir ambas enzimas.

9 Aplicaciones a futuro

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda continuar la investigación evaluando de manera *in vitro* posibles recubrimientos que protejan los compuestos bioactivos del propóleo para conservar o aumentar la actividad antioxidante y antidiabética hasta la fase gástrica. Posteriormente optimizar y establecer las mejores condiciones e interacciones del recubrimiento con el propóleo durante la digestión. Así mismo se podría evaluar sus propiedades de manera *in vivo*, para determinar las posibles dosis según el tipo de enfermedad al que se enfoque, de esta manera el propóleo pueda considerarse una alternativa en la industria nutracéutica y farmacéutica.

Debido a sus múltiples propiedades, el propóleo se puede considerar en la industria alimentaria para incorporar en un alimento funcional o mejorar la vida de anaquel de este.

10 Referencias

- Abirami, A., Nagarani, G., y Siddhuraju, P. (2014). *In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.02.001>
- Aboulghazi, A., Bakour, M., Fadil, M., y Lyoussi, B. (2022). Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. *Processes*, 10(2), 297. <https://doi.org/10.3390/pr10020297>
- Aboulghazi, A., Touzani, S., Fadil, M., y Lyoussi, B. (2022). Physicochemical characterization and *in vitro* evaluation of the antioxidant and anticandidal activities of Moroccan propolis. *Veterinary World*, 341–349. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.341-349>
- Adaouia, R. T. El, Djebli, N., Chenini, H., Sahin, H., y Kolayli, S. (2020). *In vivo* and *in vitro* anti-diabetic activity of ethanolic propolis extract. *Journal of Food Biochemistry*, 44(7). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13267>
- Ahangari, Z., Naseri, M., y Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iranian endodontic journal*, 13(3), 285–292. <https://doi.org/10.22037/IEJ.V13I3.20994>
- Alaribe, C. S., Esposito, T., Sansone, F., Sunday, A., Pagano, I., Piccinelli, A. L., Celano, R., Cuesta Rubio, O., Coker, H. A., Nabavi, S. M., Rastrelli, L., y Picerno, P. (2021). Nigerian propolis: chemical composition, antioxidant activity and α -amylase and α -glucosidase

inhibition. *Natural Product Research*, 35(18), 3095–3099.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1682576>

Ali, S., Corbi, G., Maes, M., Scapagnini, G., y Davinelli, S. (2021). Exploring the impact of flavonoids on symptoms of depression: A systematic review and meta-analysis. *Antioxidants*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10111644/S1>

Altuntaş, Ü., Güzel, İ., y Özçelik, B. (2023). Phenolic Constituents, Antioxidant and Antimicrobial Activity and Clustering Analysis of Propolis Samples Based on PCA from Different Regions of Anatolia. *Molecules*, 28(3), 1121. <https://doi.org/10.3390/molecules28031121>

Álvarez, B. Y. E. (2018). Determinación de fenoles totales y la capacidad antioxidante de los pétalos de caléndula officinalis L. (caléndula), Arequipa-2018. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica.

Amarante, S. J., Catarino, M. D., Marçal, C., Silva, A. M. S., Ferreira, R., y Cardoso, S. M. (2020). Microwave-Assisted Extraction of Phlorotannins from *Fucus vesiculosus*. *Marine Drugs*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/MD18110559>

Andrei, V., Copolovici, D., Munteanu, F. D., Ngounou Wetie, A. G., Mihai, I., Darie, C. C., y Vasilescu, A. (2019). Detection of Biomedically Relevant Stilbenes from Wines by Mass Spectrometry. *Advances in experimental medicine and biology*, 1140, 665–684. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4_40

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., y Dash, C. K. (2019). Composition and functional

properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2018.08.013>

Arana, N. M. T. (2021). Una revisión de los beneficios en la salud humana y métodos de extracción de compuestos bioactivos de *Vaccinium meridionale* [Universidad Nacional de Frontera-Sullana].

Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., y Legret, P. (1994). [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6), 462–468.

Ávila, W. Á., Vargas, O. J. M., y Bastidas, L. M. M. (2019). Aplicación de un diseño factorial 23 en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(3), 643–661. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n3.84983>

Bagade, S. B., y Patil, M. (2021). Recent Advances in Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Complex Herbal Samples: A Review. *Critical reviews in analytical chemistry*, 51(2), 138–149. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1686966>

Bankova, V., Trusheva, B., y Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: a review. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426>, 60(5), 734–743. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426>

Barker, D. (2019). Lignans. *Molecules*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24071424>

- Barrientos-Lezcano, J. C., Gallo-Machado, J., Marin-Palacio, L. D., y Builes, S. (2023). Extraction kinetics and physicochemical characteristics of Colombian propolis. *Journal of Food Process Engineering*. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14272>
- Barriga, S. M., Churata, H. A., y Tinoco, G. Ó. (2018). Optimización del rendimiento de la extracción de aceite de semillas de *Vitis vinifera* con CO₂ supercrítico. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(2), 217–227.
- Bayram, N. E., Gerçek, Y. C., y Öz, G. C. (2020). Screening for antioxidant capacity, pollen types and phytochemical profile by GC/MS and UHPLC from propolis. *PROGRESS IN NUTRITION*, 22(3). <https://doi.org/10.23751/PN.V22I3.8416>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cahuana, P. S. J. (2020). Efecto del solvente y tiempo en la extracción por microondas de glucosinolatos y compuestos fenólicos de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum*). Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Cardoso, B. V. de S., de Moraes Sousa, M., Augusto Gasparotto Sattler, J., Cristina Sousa Gramoza Vilarinho Santana, A., Bruno Fonseca de Carvalho, R., de Sousa Lima Neto, J., de Matos Borges, F., Angelica Neri Numa, I., Braga Ribeiro, A., y César Cunha Nunes, L. (2022). Nanoencapsulation and bioaccessibility of polyphenols of aqueous extracts from *Bauhinia forficata* link. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100144>

- Carrasco, M. L. M., y Cepeda, G. N. S. (2020). Caracterización química y actividad antioxidante de tres muestras de propóleos ecuatorianos [Universidad Técnica de Machala].
- Chen, C. T., Chien, Y. H., Yu, Y. H., y Chen, Y. W. (2019). Extraction and Analysis of Taiwanese Green Propolis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2019(143), e58743. <https://doi.org/10.3791/58743>
- Chen, C.-T., Chien, Y.-H., Yu, Y.-H., y Chen, Y.-W. (2019). Extraction and Analysis of Taiwanese Green Propolis. *Journal of Visualized Experiments*, 143. <https://doi.org/10.3791/58743>
- Choroco, H. H. R., y Cusquisiban, F. J. J. (2021). Caracterización de compuestos bioactivos en frutos de dos variedades de moras del género *Rubus* ssp de Querocoto-Cajamarca. Escuela Academico Profesional Ingeniería Agroindustrial y Comercio Exterior.
- Coronel, B. M. B. (2019). Uso del propóleo en el desarrollo de alimentos funcionales de alto poder antioxidante. *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 9(9).
- Cui, Q., Du, R., Liu, M., y Rong, L. (2020). Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules*, 25(1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25010183>
- Cunha, G. A. da, Carlstrom, P. F., Franchin, M., Alencar, S. M., Ikegaki, M., y Rosalen, P. L. (2023). A Systematic Review of the Potential Effects of Propolis Extracts on Experimentally-induced Diabetes. *Planta Medica*, 89(03), 236–244. <https://doi.org/10.1055/a-1910-3505>
- Cunha, G. F., Soares, J. C., de Sousa, T. L., Egea, M. B., de Alencar, S. M., Belisário, C. M., y Plácido, G. R. (2021). Cassava-starch-based films supplemented with propolis extract:

Physical, chemical, and microstructure characterization. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(4), 12149–12158. <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1214912158>

Ding, Q., Sheikh, A. R., Gu, X., Li, J., Xia, K., Sun, N., Wu, R. A., Luo, L., Zhang, Y., y Ma, H. (2021). Chinese Propolis: Ultrasound-assisted enhanced ethanolic extraction, volatile components analysis, antioxidant and antibacterial activity comparison. *Food Science & Nutrition*, 9(1), 313–330. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1997>

El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, M. D., Faleiro, M. L., y Miguel, M. G. (2016). Anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, anti-inflammatory, antityrosinase and antixanthine oxidase activities of Moroccan propolis. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(8), 1762–1773. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13133>

Escrache, I., y Juan, B. M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.055>

Espinoza, A. J. D. (2021). Separación de compuestos bioactivos a partir de maíz morado: una revisión. Universidad Nacional de frontera- Sullana.

Fernández, D. R., y Proaño, J. K. T. (2021). Extracción asistida por ultrasonido de licopenos provenientes de residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) con capacidad antioxidante. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Gaikwad, S. B., Mohan, K. G., y Rani, M. S. (2014). Phytochemicals for Diabetes Management. *Pharmaceutical Crops*, 5(1), 11–28. <https://doi.org/10.2174/2210290601405010011>

- Gámez, V. J. (2020). Avances en la determinación de compuestos bioactivos en alimentos. *Revista Cienc. Technol. Agrollanía*, Vol. 19, 7–17.
- Gandhi, G. R., Neta, M. T. S. L., Sathiyabama, R. G., Quintans, J. de S. S., de Oliveira e Silva, A. M., Araújo, A. A. de S., Narain, N., Júnior, L. J. Q., y Gurgel, R. Q. (2018). Flavonoids as Th1/Th2 cytokines immunomodulators: A systematic review of studies on animal models. *Phytomedicine*, 44, 74–84. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.03.057>
- García, C. A., Roman, G. A. D., Guzmán, O. F. A., Castañeda, O. A., y Cariño, C. R. (2022). Compuestos bioactivos presentes en alimentos con actividad antihipertensiva y su efecto en COVID-19. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 9(18), 1–6. <https://doi.org/10.29057/ICBI.V9I18.8098>
- Gasaly, N., Riveros, K., y Gotteland, M. (2020). Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista chilena de nutrición*, 47(2), 317–327. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182020000200317>
- Golmahi, Z., Hossein Elhamirad, A., Golmahi, Z., y Hossein Elhamirad, A. (2021). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolics and Antioxidants from Propolis for Stabilization of Sunflower Oil. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 38(1), 4–19. <https://doi.org/10.22267/RCIA.213801.141>
- Gondi, M., y Prasada, R. U. J. S. (2015). Ethanol extract of mango (*Mangifera indica* L.) peel inhibits α -amylase and α -glucosidase activities, and ameliorates diabetes related biochemical parameters in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7883–7893. <https://doi.org/10.1007/S13197-015-1963-4>

- González, L. Á. M., Quiñones, A. E. E., y Rincón, E. G. (2016). Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción (A. Espinosa Andrews, E. García Marquez, & E. Gastélum Martínez, Eds.; 1a ed., Vol. 1). CIATEJ, A.C. Tecnología Alimentaria.
- González-Montiel, L., Figueira, A. C., Medina-Pérez, G., Fernández-Luqueño, F., Aguirre-Álvarez, G., Pérez-Soto, E., Pérez-Ríos, S., y Campos-Montiel, R. G. (2022). Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Extracts during *In vitro* Digestion. *Applied Sciences*, 12(15), 7892. <https://doi.org/10.3390/app12157892>
- Hamsalakshmi, Alex, A. M., Arehally Marappa, M., Joghee, S., y Chidambaram, S. B. (2022). Therapeutic benefits of flavonoids against neuroinflammation: a systematic review. *Inflammopharmacology* 2021, 1–26. <https://doi.org/10.1007/S10787-021-00895-8>
- Hernandez, K., Morales, N., y Ordoñez, R. (2021, febrero 28). Relación entre consumo de compuestos bioactivos de frutas y riesgo de enfermedades cardiovasculares en un conjunto residencial de Quito-Ecuador. *Qualitas Revista Científica*, 79–92.
- IBM Corp. (2019). IBM SPSS Statistics para Windows (versión 26.0). IBM Corp.
- INEGI. (2021, noviembre 12). Estadísticas a propósito del Día mundial de la diabetes.
- Irigoití, Y., Navarro, A. S. del R., y Yamul, D. K. (2019). Actividad antioxidante y características espectroscópicas de extractos etanólicos de propóleos líquido y liofilizado. Libro de trabajos completos CyTAL®-ALACCTA 2019 : parte I, 10.
- Karagecili, H., Yılmaz, M. A., Ertürk, A., Kiziltas, H., Güven, L., Alwasel, S. H., y Gulcin, İ. (2023). Comprehensive Metabolite Profiling of Berdav Propolis Using LC-MS/MS:

Determination of Antioxidant, Anticholinergic, Antiglaucoma, and Antidiabetic Effects. *Molecules*, 28(4), 1739. <https://doi.org/10.3390/molecules28041739>

Kesk n, M. (2020). Chemical characterization of Arabic gum- chitosan-propolis beads and determination of α -amylase inhibition effect. *Progress in Nutrition*, 22(2), 562–567. <https://doi.org/10.23751/PN.V22I2.9136>

Kim, B. S., Kim, J. U., So, K. H., y Hwang, N. S. (2021). Supercritical Fluid-Based Decellularization Technologies for Regenerative Medicine Applications. *Macromolecular Bioscience*, 21(8), 2100160. <https://doi.org/10.1002/MABI.202100160>

Kitamura, H. (2019). Effects of Propolis Extract and Propolis-Derived Compounds on Obesity and Diabetes: Knowledge from Cellular and Animal Models. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 4394, 24(23), 4394. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234394>

Kocot, J., Kie czykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., y Musik, I. (2018). Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2018/7074209>

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Garc a-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antoci nicos. *Food Science and Technology*, 24(4), 691–693. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036>

Lima, A. B. S. de, Batista, A. S., Santos, M. R. C., Rocha, R. de S. da, Silva, M. V. da, Ferr o, S. P. B., Almeida, V. V. S. de, y Santos, L. S. (2022). Spectroscopy NIR and MIR toward predicting simultaneous phenolic contents and antioxidant in red propolis by multivariate analysis. *Food Chemistry*, 367, 130744. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130744>

- López, C. N., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación*, 32(3), 81–91.
- Martelli, A. S. C. S., Giovanini de Oliveira Sartori, A., Souza Batista, P., Pedroso Gomes do Amaral, J. E., Oliveira da Silva, N., Ikegaki, M., Rosalen, P. L., y Matias de Alencar, S. (2023). Simulated gastrointestinal digestion/Caco-2 cell transport: Effects on biological activities and toxicity of a Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 403, 134330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134330>
- Martín, G. D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Martínez, N. N., Camacho, V. M. D. M., y Martínez, L. J. J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 12(2), 64–68. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)
- Medina, P. G., Zaldívar, O. A. K., Cenobio, G. A. de J., Afanador, B. L. N., Vieyra, A. R., Estefes, D. J. A., y Campos, M. R. G. (2019). Antidiabetic Activity of Cactus Acid Fruit Extracts: Simulated Intestinal Conditions of the Inhibitory Effects on α -amylase and α -glucosidase. *Applied Sciences* 2019, Vol. 9, Page 4066, 9(19), 4066. <https://doi.org/10.3390/APP9194066>
- Medina-Pérez, G., Estefes-Duarte, J. A., Afanador-Barajas, L. N., Fernández-Luqueño, F., Zepeda-Velásquez, A. P., Franco-Fernández, M. J., Peláez-Acero, A., y Campos-Montiel, R. G. (2020). Encapsulation Preserves Antioxidant and Antidiabetic Activities of Cactus Acid

Fruit Bioactive Compounds under Simulated Digestion Conditions. *Molecules*, 25(23), 5736.

<https://doi.org/10.3390/molecules25235736>

Medina-Pérez, G., Zaldívar-Ortega, A. K., Cenobio-Galindo, A. de J., Afanador-Barajas, L. N., Vieyra-Alberto, R., Estefes-Duarte, J. A., y Campos-Montiel, R. G. (2019). Antidiabetic Activity of Cactus Acid Fruit Extracts: Simulated Intestinal Conditions of the Inhibitory Effects on α -amylase and α -glucosidase. *Applied Sciences*, 9(19), 4066. <https://doi.org/10.3390/app9194066>

Melo, G. M. C., Ortiz, J. D. E., Hurtado, B. A. M., Melo, G. M. C., Ortiz, J. D. E., y Hurtado, B. A. M. (2020). Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44(172), 845–856. <https://doi.org/10.18257/RACCEFYN.862>

Menyiy, E. N., al Waili, N., al Wali, N., el Ghouizi, A., el Guendouz, S., Salom, K., Lyoussi, B., Mohamed Ben Abdallah, S., Menyiy, E. N., Ghouizi, E. A., y Kh, S. (2019). Potential therapeutic effect of Moroccan propolis in hyperglycemia, dyslipidemia, and hepatorenal dysfunction in diabetic rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(11), 1331–1339. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2019.33549.8004>

Milek, M., Ciszkowicz, E., Tomczyk, M., Sidor, E., Zagula, G., Lecka-Szlachta, K., Pasternakiewicz, A., y Dżugan, M. (2022). The Study of Chemical Profile and Antioxidant Properties of Poplar-Type Polish Propolis Considering Local Flora Diversity in Relation to Antibacterial and Anticancer Activities in Human Breast Cancer Cells. *Molecules*, 27(3), 725. <https://doi.org/10.3390/molecules27030725>

- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Morán, L. C., Cruz, J. P., Díaz, G. E., y Vásquez, J. E. (2021). Valoración de la extracción compuestos bioactivos de alto valor agregado en el salvador. *Ciencia y tecnología*, 1, 1050–1065. <https://doi.org/10.47300/978-9962-738-04-6>
- NIH. (2022, abril 22). PubChem Compound Summary for CID 6557. Isoprene.
- Nyambe, S. H., Villa, R. J. A., Ifie, I., Holmes, M., Aydin, E., Jensen, J. M., y Williamson, G. (2015). Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 19, 723–732. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.003>
- OPS. (2021, agosto 17). Pacto Mundial contra la Diabetes. Implementación en la Región de las Américas. OPS.
- Oroian, M., Dranca, F., y Ursachi, F. (2019). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of Food Science and Technology* 2019 57:1, 57(1), 70–78. <https://doi.org/10.1007/S13197-019-04031-X>
- Ortiz, M. D. M. (2018). Evaluación de la actividad antidiabética *In vitro* de plantas medicinales de uso tradicional. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Osorio, M., y Salamanca, G. G. (2017). Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo (pp. 287–311).
- Ozidal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O., y Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International*, 122, 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.028>
- Peláez-Acero, A., Garrido-Islas, D. B., Campos-Montiel, R. G., González-Montiel, L., Medina-Pérez, G., Luna-Rodríguez, L., González-Lemus, U., y Cenobio-Galindo, A. de J. (2022). The Application of Ultrasound in Honey: Antioxidant Activity, Inhibitory Effect on α -amylase and α -glucosidase, and *In vitro* Digestibility Assessment. *Molecules*, 27(18), 5825. <https://doi.org/10.3390/molecules27185825>
- Peng, S., Zhu, M., Li, S., Ma, X., y Hu, F. (2023). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Chinese propolis. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1131959>
- Pimentel, M. S., Borrás, L. I., Lozano, S. J., Arráez, R. D., Martínez, F. A., y Segura, C. A. (2018). Microwave-assisted extraction for Hibiscus sabdariffa bioactive compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 156, 313–322. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2018.04.050>
- Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., y Sabatini, A. G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38(3), 306–306. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2007013>

- Prado Massarioli, A., Giovanini de Oliveira Sartori, A., Francetto Juliano, F., Eduardo Pedroso Gomes do Amaral, J., Cavalcanti dos Santos, R., Maria de Lima, L., y Matias de Alencar, S. (2023). Simulated gastrointestinal digestion/Caco-2 cell model to predict bioaccessibility and intestinal permeability of p-coumaric acid and p-coumaroyl derivatives in peanut. *Food Chemistry*, 400, 134033. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134033>
- Puerto, R. F. (2019). *Relación entre los estilbenos y el estado oxidativo* [Universidad de Sevilla].
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribeiro, V. P., Mejia, J. A. A., Rodrigues, D. M., Alves, G. R., de Freitas Pinheiro, A. M., Tanimoto, M. H., Bastos, J. K., y Ambrósio, S. R. (2023). Brazilian Brown Propolis: an Overview About Its Chemical Composition, Botanical Sources, Quality Control, and Pharmacological Properties. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(2), 288–299. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00374-x>
- Rivera, Y. N., Rodriguez, C. M., Nieto, Y. O., Jimenez, E. M., Ibarra, B. M., Canales, M. M. M., y Rodriguez, M. M. A. (2018). Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4360356>
- Robleda, S. M. G., Moo, H. M. I., y Kantún, R. M. A. (2019). *Progressio: perspectivas científicas del poniente de Yucatán* (1° Edición). Editorial Pearson.

- Robles, O. L. E., y Ochoa, M. L. A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimetros. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, 13(2), 109–122.
- Rodríguez, P. B., Canales, M. M. M., Penieres, C. J. G., Cruz, S. T. A., Rodríguez, P. B., Canales, M. M. M., Penieres, C. J. G., y Cruz, S. T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta universitaria*, 30, 1–30. <https://doi.org/10.15174/AU.2020.2435>
- Rojas, T., Fuentes Campos, M. E., Contreras-López, E., Gómez, S., y Muñoz-Jáuregui, A. M. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de *Sanky* (*Corryocactus brevistylus*). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85.
- Ruiz, R. S. G., Venegas, C. E. A., Valdiviezo, C. J. E., y Plasencia, C. J. L. (2018). Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante *in vitro* del zumo de “pur pur” *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (Passifloraceae). *Arnaldoa*, 25(3), 1003–1014. <https://doi.org/10.22497/ARNALDOA.253.25312>
- Sánchez Elizalde, K. V., y Marquéz Hernández, I. (2017). Composición química y potencial biológico de una muestra de propóleos ecuatoriano. [Machala: Universidad Técnica de Machala]. En Universidad Técnica de Machala.
- Sapra, A., y Bhandari, P. (2021). Diabetes Mellitus. StatPearls.
- SEGOB. (2017). NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sosa, L. Á. A., Cabrera, M. G., y Álvarez, M. Y. (2017). Parámetros físicos y características organolépticas de propóleos provenientes de la Provincia de Misiones, Argentina. *Journal of the Selva Andina Biosph*, 5(1), 51–58.
- Stashenko, E., Jairo, ;, Martínez, R., y Castrillón, J. (2014). Application of the matrix solid-phase dispersion method to hydrocarbon isolation from bituminous rocks. *Boletín de Geología*, 36, 29–35.
- Stewart, R. J. C., Morton, H., Coad, J., y Pedley, K. C. (2019). *In vitro* digestion for assessing micronutrient bioavailability: the importance of digestion duration. *International journal of food sciences and nutrition*, 70(1), 71–77. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1481200>
- Sun, J., Mu, Y., Shi, J., Zhao, Y., y Xu, B. (2022). Super/subcritical fluid extraction combined with ultrasound-assisted ethanol extraction in propolis development. *Journal of Apicultural Research*, 61(2), 255–263. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1772529>
- Šuran, J., Ceganec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Gajger, I. T., y Vlainić, J. (2021). Propolis Extract and Its Bioactive Compounds—From Traditional to Modern Extraction Technologies. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 2930, 26(10), 2930. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26102930>
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., y Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089–1099.

- Tatipamula, V. B., y Kukavica, B. (2021). Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell biochemistry and function*, 39(8), 926–944. <https://doi.org/10.1002/CBF.3667>
- Taype, L. O., Ruiz, R. A., Aguirre, H. L. L., y Ore, A. F. (2021). Compuestos bioactivos, perfil antioxidante y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula*. *Dominio de las Ciencias*, 7(5), 451–464. <https://doi.org/10.23857/DC.V7I5.2260>
- Teixeira, T. D., Machado, B. A. S., Barreto, G. de A., dos Anjos, J. P., Leal, I. L., Nascimento, R. Q., Hodel, K. V. S., y Umsza-Guez, M. A. (2023). Extraction of Antioxidant Compounds from Brazilian Green Propolis Using Ultrasound-Assisted Associated with Low- and High-Pressure Extraction Methods. *Molecules*, 28(5), 2338. <https://doi.org/10.3390/molecules28052338>
- Tinikul, R., Chenprakhon, P., Maenpuen, S., y Chaiyen, P. (2018). Biotransformation of Plant-Derived Phenolic Acids. *Biotechnology journal*, 13(6). <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700632>
- Trusheva, B., Trunkova, D., y Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-1-13>
- Uddin, S., Brooks, P. R., y Tran, T. D. (2022). Chemical Characterization, α -Glucosidase, α -Amylase and Lipase Inhibitory Properties of the Australian Honey Bee Propolis. *Foods*, 11(13), 1964. <https://doi.org/10.3390/foods11131964>
- Ugwor, E. I., James, A. S., Amuzat, A. I., Ezenandu, E. O., Ugbaja, V. C., y Ugbaja, R. N. (2022). Network pharmacology-based elucidation of bioactive compounds in propolis and putative

underlying mechanisms against type-2 diabetes mellitus. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 5, 100183. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100183>

Viloria, B. J. D., Gil, G. J. H., Durango, R. D. L., y García, P. C. M. (2012). Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(1), 77–86.

Widelski, J., Gawel-Bęben, K., Czech, K., Paluch, E., Bortkiewicz, O., Kozachok, S., Mroczek, T., y Okińczyc, P. (2022). Extracts from European Propolis as Potent Tyrosinase Inhibitors. *Molecules*, 28(1), 55. <https://doi.org/10.3390/molecules28010055>

Wojtunik, K. K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., y Matwijczuk, A. (2020). Influence of *In vitro* Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 12(5), 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>

Wong, P. J. E., Aguilar, Z. P., Veana, F., y Muñiz, M. D. B. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23(0). <https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2020.0.255>

Xue, M., Liu, Y., Xu, H., Zhou, Z., Ma, Y., Sun, T., Liu, M., Zhang, H., y Liang, H. (2019). Propolis modulates the gut microbiota and improves the intestinal mucosal barrier function in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109393. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109393>

Yara, E. V., Li, Y., Balcells, M., Canela-Garayoa, R., Fabiano-Tixier, A. S., y Chemat, F. (2017). Vegetable Oils as Alternative Solvents for Green Oleo-Extraction, Purification and

Formulation of Food and Natural Products. *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 1474, 22(9), 1474.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES22091474>

Yıldırım, H. K. (2022). Assessment of Propolis Treated by Different Extraction Methods.

Brazilian Archives of Biology and Technology, 65, e22210251.

<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022210251>

Yuan, Y., Zheng, S., Zeng, L., Deng, Z., Zhang, B., y Li, H. (2019). The Phenolic Compounds,

Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method.

Journal of Food Science, 84(12), 3850–3865. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14934>

Yusof, N., Munaim, M. S. A., y Veloo Kutty, R. (2021). Optimization of total phenolic compounds

extracted from propolis by ultrasound- assisted extraction. *Chemical Engineering*

Communications, 208(4), 564–572. <https://doi.org/10.1080/00986445.2020.1761799>

Zainal, W. N. H. W., Azian, N. A. A. M., Albar, S. S., y Rusli, A. S. (2021). Effects of extraction

method, solvent and time on the bioactive compounds and antioxidant activity of *Tetrigona*

apicalis Malaysian propolis. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1930958>, 61(2), 264–

270. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1930958>

Zavaleta, J., Muñoz, A. M., Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C., y Loja, B. (2005). Capacidad

antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Horizonte*

Médico, 5(2).

11 Anexos

11.1 Anexo 1. Curva de calibración de fenoles totales

Se realizó una curva patrón por triplicado utilizando concentraciones de 0, 40, 80, 120 y 160 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico, se tomó 0.3 mL de cada concentración, se mezclaron con 1.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, se realizó por triplicado y se dejó reposar durante 8 min, pasado el tiempo se le agregó 1.2 mL de solución de Na_2CO_3 y se dejó reposar 2 horas en oscuridad. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Jenway, 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 765 nm usando como blanco agua destilada.

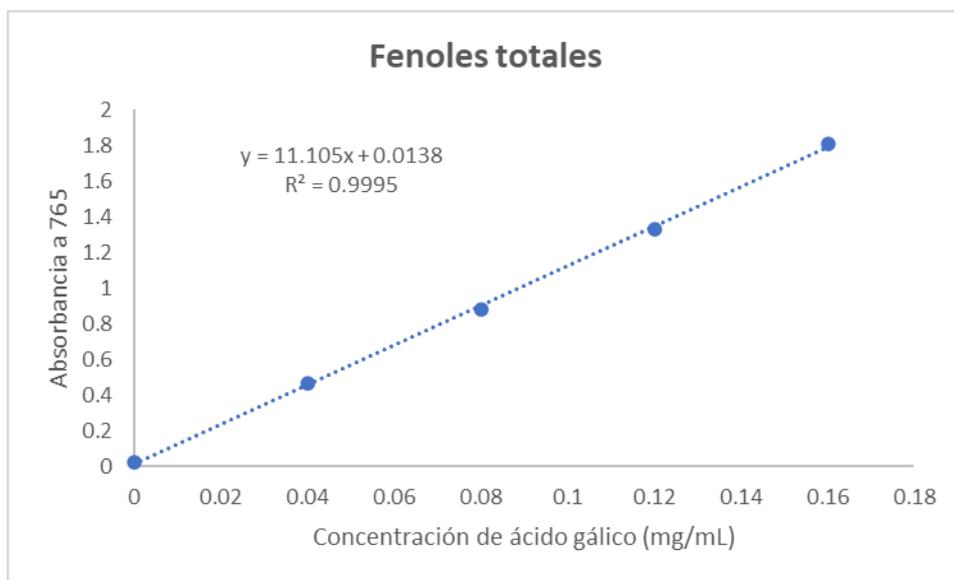


Figura 11. Curva patrón de fenoles totales

11.2 Anexo 2. Curva patrón de flavonoide totales

Se realizó una curva patrón por triplicado utilizando concentraciones 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina posteriormente se tomaron 2 mL de cada concentración, se mezclaron con 2 mL de solución de AlCl_3 (2%) y se dejaron reposar durante 20 min en oscuridad. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Jenway, 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 415 nm usando como blanco metanol.

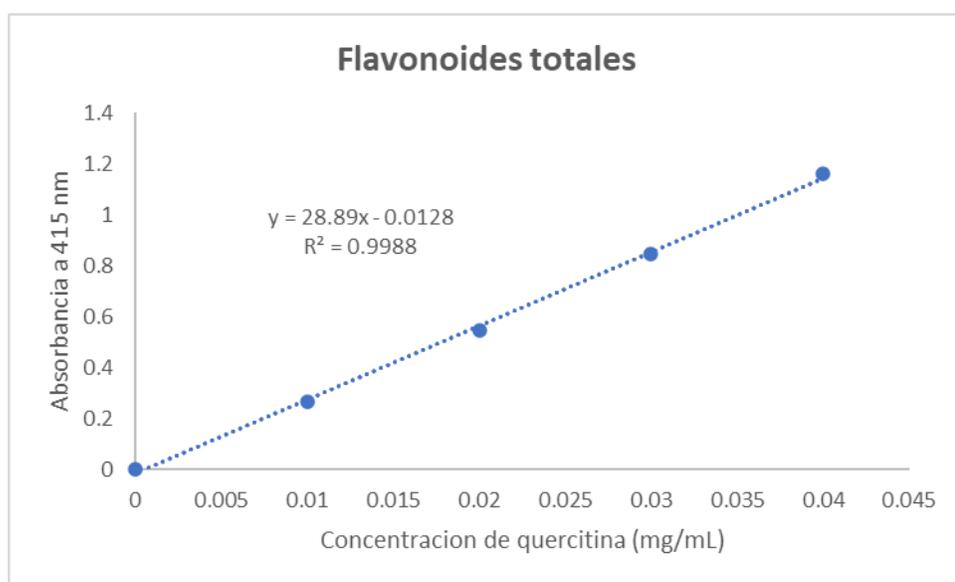


Figura 12. Curva patrón de flavonoides totales

11.3 Anexo 3. Curva patrón de ABTS^{•+}

Para realizar la curva de patrón se preparó el trolox a diferentes concentraciones 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/mL, Subsiguientemente se tomó 0.2 mL, se agregó 2 mL de la solución de ABTS^{•+} estandarizado, se realizó por triplicado, se dejó reposar durante 6 min en oscuridad y a temperatura ambiente, finalmente se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro (Jenway, 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 734 nm usando como blanco etanol 20 %.

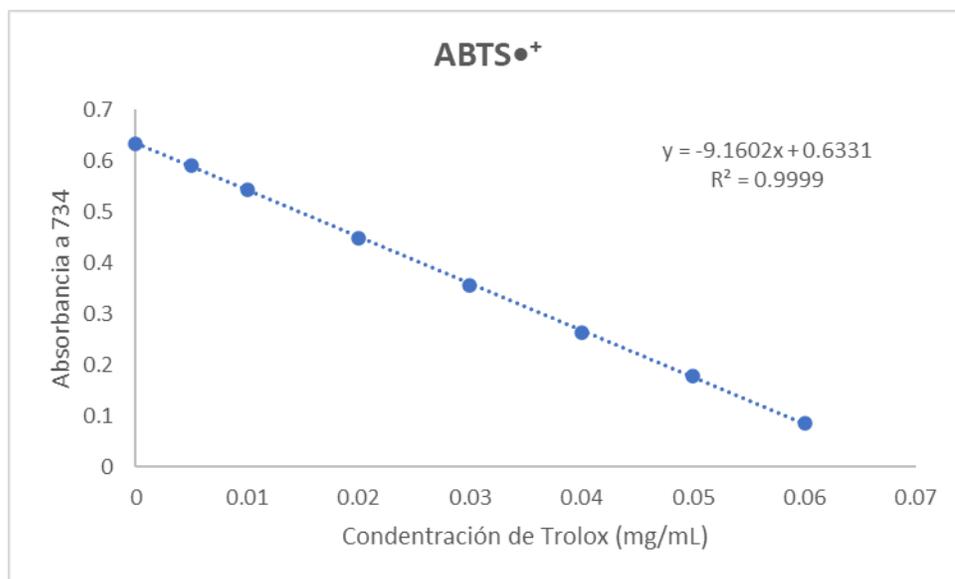


Figura 13. Curva patrón de ABTS^{•+}

11.4 Anexo 4. Curva patrón de DPPH•

Se realizó la curva patrón preparando concentraciones de ácido gálico 0, 2, 4, 6, 8, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$, se realizó por triplicado, se tomó 0.5 mL para posteriormente agregar 2.5 mL de la solución de DPPH• estandarizado, se dejó reposar durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente, finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro (Jenway, 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 515 nm usando como blanco metanol 80 %.

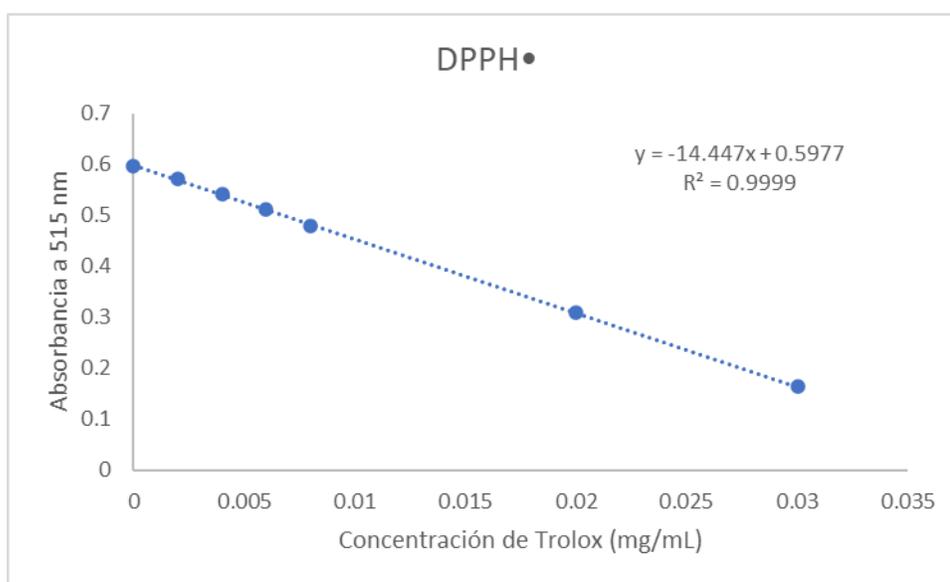


Figura 14. Curva patrón de DPPH•