



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Influencia de compuestos derivados del propóleo en
la formación de biocapas mono especie por
Streptococcus mutans y *Escherichia coli***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A N :

FABIOLA DENEZ ORTEGA MURILLO

BERTHA ALICIA TÉLLEZ VARGAS



MEXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz
SECRETARIO: Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
1er. SUPLENTE: Dra. Rachel Mata Essayag
2° SUPLENTE: QFB. José Alberto Rivera Chavez

Sitio donde se desarrolló el proyecto
Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentantes

Fabiola Deneb Ortega Murillo

Bertha Alicia Téllez Vargas

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo y cariño.

A Jorge y Alejandro por ser los mejores hermanos.

A Deneb, porque la mitad de este trabajo no existiría de no ser por ella.

A Mayté y Ximena por escuchar mis quejas y por hacerme pasar tan buenos momentos después de tanto tiempo.

A todos *¡los de allá!*, principalmente a súper Caro por ser tan buena amiga y por ser de las mejores personas que he conocido, a Kory por innumerables comentarios fuera de lugar, a Rafa por hacerme reír tanto, a Piffs por entenderme en muchos aspectos, a Myrna por ser de las primeras amigas que tuve en esta facultad, a Lalo por sus chistes sobre los Simpsons, a Memo por saber tantos datos curiosos, a Esteban por dar vida al mejor superhéroe de todos los tiempos: Stevie Pipetas, a Gabo por sus consejos, a Chava por ser una excelente persona y a Cariño por su sentido del humor.

Bertha Alicia.

A mis padres por creer en mí, por su apoyo y cariño durante estos 24 años.

A mi abuelita Soledad por estar siempre pendiente de mí, por ser mi gran ejemplo a seguir..... ¡Te quiero mucho!

A mi hermana Angela y a mi prima Eunice por todos los momentos buenos y malos que hemos pasado juntas.

A mis tíos: Gabriel, Rosario, Silvia y Delia por ser tan importantes en mi vida.

A Chava (Chavis) por todo su amor, comprensión e incondicional apoyo. Por ser siempre tan bueno conmigo, eres la mejor persona que conozco.

Al “CME y a la TROPA” por ser los mejores amigos que he tenido. Por preocuparse siempre por mí. A Ximena y Fabiola por ser las mejores amigas.

A Alicia porque a lo largo de este tiempo de trabajo te convertiste en una persona muy importante, una gran amiga.

A todos mis amigos de la facultad en especial a Piffs por su gran apoyo a lo largo de tantos años, a Memo, a Caro, a Gabo, Aline, Laura, Eli, Myrna, Lalo, Kory, Stevie, Rafa, Romina, Óscar y Erika.

A la familia Reyes por ser siempre tan amables y buenos conmigo.

Fabiola Deneb

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarnos la formación académica que recibimos durante estos 5 años.

A nuestros profesores Dr. José Fausto Rivero Cruz y Dr. Carlos Alberto Eslava Campos por contribuir directamente a la realización de este proyecto.

A Ángel y a Don Federico por proporcionarnos las muestras vegetales utilizadas.

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	III
Lista de Cuadros.....	IV
Lista de Diagramas.....	V
Lista de Abreviaturas.....	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Propóleo	3
2.1.1 Definición y generalidades	3
2.1.2 Aspectos históricos	5
2.1.3 Composición química	5
2.1.4 Propiedades biológicas	11
2.3 Biocapas	13
2.3.1 Definición y generalidades	13
2.3.2 Formación de biocapas.....	14
2.3.3 Biocapas en dispositivos médicos	16
2.4 <i>Streptococcus mutans</i>	17
2.4.1 Descripción y clasificación	17
2.4.2 Patogenicidad	17
2.5 <i>Escherichia coli</i>	19
2.5.1 Descripción y clasificación	19
2.5.2 Patogenicidad	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS.....	22
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
5.1 Procedimientos generales	23
5.1.1 Análisis cromatográficos	23
5.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	23
5.2 Material vegetal.....	24
5.3 Estudio fitoquímico de propóleo	24
5.3.1 Preparación del extracto de propóleo	24
5.3.2 Fraccionamiento primario del extracto de propóleo	24
5.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto de propóleo a partir de F1	24
5.3.4 Fraccionamiento terciario a partir de F1.3	25
5.3.5 Obtención y purificación de acetina a partir de F1.3.5	25
5.3.6 Separación a partir de F1.3.4	26
5.3.7 Obtención y purificación de isosakuranetina a partir de F1.3.4.5	26

5.4 Ensayo de inhibición de formación de biocapa.....	29
5.4.1 Estandarización del Método	29
5.4.2 Inhibición de la formación de biocapas	30
5.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana del propóleo y compuestos aislados contra <i>Escherichia coli</i>	31
6. RESULTADOS	33
6.1 Acetina.....	33
6.2 Isosakuranetina	33
6.3 Estandarización del ensayo de inhibición de formación de biocapa	34
6.4 Inhibición de formación de biocapa de <i>Streptococcus mutans</i>	35
6.5 Ensayo de inhibición de formación de biocapa de <i>Escherichia coli</i>	37
6.6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana del propóleo y compuestos aislados contra <i>Escherichia coli</i>	40
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES.....	51
9. PERSPECTIVAS	52
10. BIBLIOGRAFÍA.....	55

LISTA DE FIGURAS

1. Propóleo.....	3
2. Las abejas manufacturan el propóleo y lo utilizan para manutención de sus columnas.....	4
3. Estructura base de un flavonoide	6
4. Productos existentes en el mercado que contienen propóleo	11
5. Proceso de formación de biocapas	16
6. Estructura química de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina)	33
7. Estructura química de la 4'-metoxi-5,7-dihydroxiflavanona (isosakuranetina).....	34
8. a) Formación de biocapa de <i>Streptococcus mutans</i> . Lecturas de D.O. obtenidas a diferentes tiempos de incubación (37°C), en dos medios de cultivo diferentes.....	35
8. b) Formación de biocapa de <i>Escherichia coli</i> . Lecturas de D.O. obtenidas a diferentes tiempos de incubación (37°C), en dos medios de cultivo diferentes.....	35
9. a) Ensayos de inhibición de la formación de biocapas de <i>Streptococcus mutans</i> . Lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, utilizando una concentración de 0.2 mg/mL	36
9. b) Ensayos de inhibición de la formación de biocapas de <i>Streptococcus mutans</i> . Lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, utilizando una concentración de 0.02 mg/mL	36
9. c) Ensayos de inhibición de la formación de biocapas de <i>Streptococcus mutans</i> . Lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, utilizando una concentración de 0.002 mg/mL	37
10. a) Inhibición de la formación de biocapas. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, acacetina e isosakuranetina, compuestos obtenidos del propóleo utilizando una concentración de 0.2 mg/mL.....	38
10. b) Inhibición de la formación de biocapas. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, acacetina e isosakuranetina, compuestos obtenidos del propóleo utilizando una concentración de 0.02 mg/mL.....	39
10. c) Inhibición de la formación de biocapas. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, acacetina e isosakuranetina, compuestos obtenidos del propóleo utilizando una concentración de 0.002 mg/mL.....	39
11. Ensayo de concentración mínima inhibitoria de <i>Escherichia coli</i>	41
12. Ensayo por goteo a partir de las placas de concentración mínima inhibitoria de <i>Escherichia coli</i>	41
13. Ensayo de cristal violeta para <i>Escherichia coli</i>	42
14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN- ¹ H) de acacetina.....	44
15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ Carbono (RMN- ¹³ C) de acacetina.....	45
16. Espectro de masas de acacetina	45

LISTA DE CUADROS

1. Algunos compuestos químicos encontrados en el propóleo.....	7
2. Variables que afectan la adherencia celular y la formación de la biocapa	14
3. Dispositivos médicos que son colonizados por biocapas.....	18
4. Clasificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> patógenas.....	20
5. Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F1.....	25
6. Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F1.3.....	25
7. Purificación por cromatografía en CA de la fracción F1.3.5.....	26
8. Separación por CCA de la fracción F1.3.4.....	26
9. Purificación por cromatografía en CA de la fracción F1.3.4.5.....	27
10. Análisis estadístico de los valores p obtenidos en el ensayo de inhibición de formación de biocapa de <i>Escherichia coli</i>	40

LISTA DE DIAGRAMAS

1. Proceso de extracción, fraccionamiento, separación y purificación de propóleo.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOET	Acetato de etilo
CH ₃ (CO)CH ₃	Acetona
ATCC	American type culture collection
cm	Centímetro
FeCl ₃	Cloruro férrico
CBI	Concentración Bacteriana Inhibitoria
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCV	Cromatografía en columna al vacío
CCF	Cromatografía en capa fina
D.O.	Densidad óptica
Δ	Desplazamiento químico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	Dimetil sulfóxido
eV	Electrovolt
EM/IE	Espectroscopía de masas por Impacto Electrónico
° C	Grado centígrado
g	Gramo
L	Litro
MHz	Mega Hertz
CH ₃ OH	Metanol
CD ₃ OD	Metanol deuterado
μ g	Microgramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de Salud
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta que han utilizado plantas medicinales y otros productos de origen natural para atender sus problemas de salud y una gran mayoría, desarrollados y en desarrollo, siguen haciendo uso de ellos actualmente (Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2010).

Desde sus orígenes, la humanidad ha buscado en las plantas una alternativa para tratar los padecimientos que la aquejan, plantas cuyas propiedades terapéuticas han sentado las bases de la medicina empírica, la que se ha mantenido durante siglos sin que los conocimientos científicos modernos hayan podido prescindir de ellas (Mitscher, *et al.* 2000).

Las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valiosos de la medicina tradicional. Se ha recorrido constantemente a su uso a lo largo de la historia de México, siendo ésta una tarea muy compleja considerando la enorme riqueza cultural y florística de nuestro país: tercero en el mundo en biodiversidad y segundo en el hemisferio occidental en lenguas y culturas distintas actualmente (Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2010).

En nuestro país existe una gran diversidad de especies vegetales de origen tropical, de las cuales unas cinco mil plantas son usadas como medicinales, y que dada la diversidad vegetal podrían llegar a ser hasta 20 mil. A pesar de la riqueza y de la variedad de la flora medicinal, el porcentaje de especies que poseen estudios fotoquímicos y farmacológicos es muy escaso (Osunda *et al.*, 2005).

El estudio de recursos naturales con fines medicinales, adquirido empíricamente por el ser humano a lo largo de miles de años, ha favorecido el desarrollo de diversas áreas como la terapéutica, la farmacéutica, la farmacología y la medicina, así como de la industria cosmética y de los alimentos. Aunque, sin duda, su mayor impacto lo ha tenido en el campo de las ciencias médicas y farmacéutica al identificar y desarrollar nuevos y potentes agentes medicinales (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004).

En este contexto, tomando en cuenta que enfermedades bucodentales, tales como la caries dental y la periodontitis (enfermedad gingival) se encuentran entre las más

comunes en México (SSA, 2006), así como enfermedades diarreicas (segunda causa de enfermedades en México), son un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y, cada vez con mayor frecuencia, a los países en desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres (OMS), es necesario llevar a cabo mayor investigación sobre recursos de origen vegetal que posean actividad sobre las biocapas producidas por bacterias que se desarrollan en la cavidad oral, en el intestino de los humanos o en catéteres causando dichas enfermedades.

En este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que describe el estudio de compuestos derivados del propóleo, resina producida por las abejas mediante la recolección y transformación enzimática de secreciones de plantas (Bankova, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 Propóleo

2.1.1 Definición y generalidades

Las abejas (*Apis mellifera*) han habitado nuestro planeta por más de 6 millones de años y la historia ha demostrado que han sido de gran utilidad tanto para la naturaleza como para el ser humano, siendo responsables de la polinización y de la elaboración de diversos productos entre los que se encuentran: miel, ceras, veneno, polen y jalea real (Bankova, 2005), pero el que más destaca por su utilidad es el propóleo. El nombre “propóleo” proviene de los términos griegos *pro-* que significa defensa de, y *polis-* que significa ciudad: “defensa de la ciudad o de la colmena” (Niraldo, 2005).

El propóleo (figura 1) es un material de carácter lipofílico, duro y quebradizo a bajas temperaturas, maleable y viscoso si es levemente calentado. Su color es variable debido a la coloración de los vegetales abastecedores en las diversas regiones de “hábitat” de colecta y a su edad (Burdok, 1998) pero generalmente oscila entre amarillo-verdoso y marrón oscuro. Por lo general posee un sabor acre aunque a veces es amargo y tiene un aroma muy semejante al de la miel y ceras, aroma que se debe a la gran cantidad de aceites aromáticos que posee en su composición química (Niraldo, 2005). Es difícil de remover de la piel humana debido a que parece interaccionar fuertemente con aceites y proteínas de la piel. Su punto de fusión oscila entre los 60-70° C aunque en algunos casos puede llegar hasta los 100° C. Algunos disolventes como el éter, etanol, acetona, tolueno y tricloroetileno permitan la disolución de muchos constituyentes del propóleo (Marcucci, 1995).



Figura 1. Propóleo

Para que las abejas manufacturen esta sustancia colectan con sus mandíbulas material secretado o exudado por plantas (material lipofílico en hojas, musgos, gomas, resinas, etc.) y posteriormente transforman dicho material mediante ceras, secreciones y enzimas salivales (Bankova, 2005).

Se recoge de las colmenas por medio de trampas o raspado, siendo el entrampado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación. La recolección se hace antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales, al inicio de la estación lluviosa, cuando la propolización parece más activa (Farré *et al.*, 2004). Su procesamiento comercial comprende tres pasos:

- El primer paso es la evaluación del material. Si es muy ceroso se somete a un lavado con agua fría para remover las ceras. El propóleo remanente se seca con aire en pantallas de acero inoxidable.
- El segundo paso involucra su disolución en etanol al 95%, las ceras restantes y las partes de abejas son removidas.
- El último paso involucra la filtración para eliminar cualquier otro material ajeno (Burdok, 1998).

Es utilizado por las abejas para suavizar las paredes internas de las colmenas, para sellar agujeros en las mismas reduciendo así la entrada de viento, frío y principalmente la entrada de intrusos (Burdok, 1998) y para embalsamar pequeños animales muertos evitando su putrefacción cuando no pueden ser retirados de la colmena (Niraldo, 2005). Pero no sólo es utilizado como material de construcción, es el “arma química” más importante que tienen las abejas contra microorganismos patógenos y ha sido utilizado por los humanos como remedio desde tiempos antiguos (Bankova, 2005). (Figura 2).



Figura 2. Las abejas manufacturan el propóleo y lo utilizan para mantención de sus columnas.

2.1.2 Aspectos históricos

Esta resina constituida por una compleja mezcla de metabolitos secundarios ha sido utilizada desde tiempos antiguos por diversas culturas. Los usos más antiguos reportados se remontan a la época de los egipcios, quienes la utilizaban para embalsamar cadáveres, los incas lo usaban como agente antipirético. Pensadores como Aristóteles, Galeno y Dioscórides, así como médicos de culturas griegas y romanas observaron que poseía propiedades antiinflamatorias, por lo cual fue utilizado para el tratamiento de heridas, úlceras y abscesos (Castaldo *et al.*, 2007). En los siglos XII – XV era utilizado como antiinflamatorio bucal y como tratamiento para las caries dentales, resfriados y forúnculos. Entre los siglos XVII – XIX en Europa destacó por sus propiedades antibacterianas. Finalmente, a partir de 1900 el propóleo fue utilizado como desinfectante (Niraldo, 2005) y cicatrizante, esta última propiedad fue aprovechada en África, hace más de 90 años, combinando el propóleo con vaselina para confeccionar pomadas (Marcucci, 1996).

Algunos años atrás, famosos fabricantes de violines usaban todavía el propóleo como un ingrediente en la composición de barnices y pulidores, cuya coloración especial se observa en algunos violines hechos por antiguos maestros de Ceremonia (Marcucci, 1996).

Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse, aunque recientemente, se observa un resurgir en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en diversos campos (Farré *et al.*, 2004).

2.1.3 Composición química

Se estima que el propóleo posee más de trescientos componentes diferentes, identificados de cualquiera de sus tres fuentes diferentes: exudados de plantas colectados por abejas, sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y de materiales que son introducidos durante la elaboración del propóleo (Marcucci, 1995).

Debido a esta gran complejidad algunos autores afirman que su eficacia estaría justamente en la composición química heterogénea (Niraldo, 2005), ya que ésta depende de la flora, del clima, de la estación del año, la ubicación y del año en que fue colectado (Ataç-Uzel *et al.*, 2005). Generalmente está compuesto de 50% de resinas, 30% de ceras, 10% aceites y esencias aromáticas, 5% polen y 5% de otras sustancias variadas (Burdok, 1998). Las ceras y los desechos orgánicos son removidos durante el proceso de

extracción con etanol y el extracto obtenido contiene los constituyentes bioactivos del propóleo. Más de trescientos compuestos, entre los que se encuentran los polifenoles, terpenoides, esteroides, azúcares y aminoácidos han sido detectados en el propóleo crudo (Kalogeropoulos *et al.*, 2009) (Cuadro 1).

Los flavonoides (flavonas, flavonoles y flavononas) son el grupo de compuestos mayoritariamente aislados del propóleo. Son químicamente clasificados de acuerdo a la presencia o no del anillo C, la doble ligadura entre los carbonos C-2 y C-3 en el anillo y de un grupo hidroxilo en C-3 (Niraldo, 2005) (Figura 3).

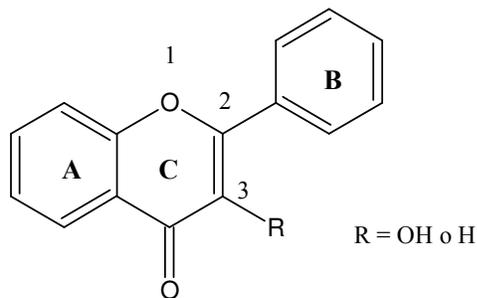


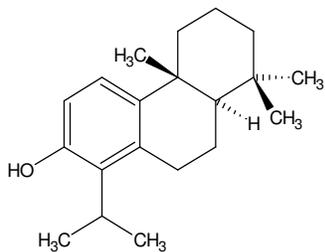
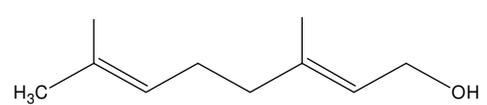
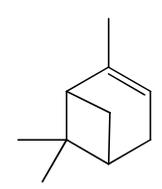
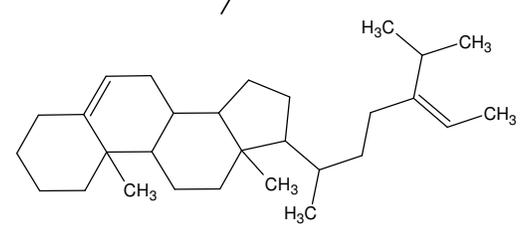
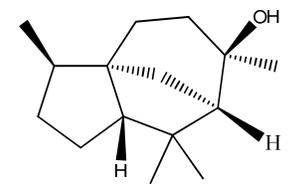
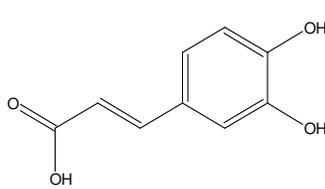
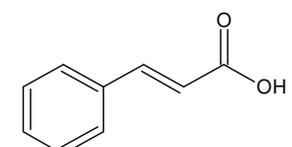
Figura 3. Estructura base de un flavonoide.

Los flavonoides son ubicuos en el reino de las plantas. Por lo anterior, no es sorprendente que de diferentes muestras de propóleo se hayan aislado el mismo tipo de flavonoides (Burdok, 1998). Se cree que los flavonoides son responsables de la mayoría de las actividades biológicas. Las propiedades antimicrobianas de esta mezcla de sustancias naturales es principalmente atribuida a la flavanona pinocembrina, el flavonol galangina y el ácido caféico que es un compuesto fenólico (Ataç-Uzel *et al.*, 2005).

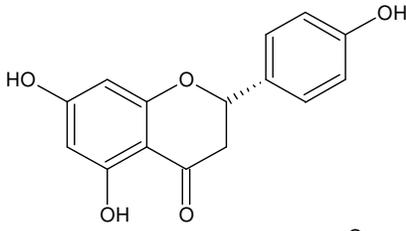
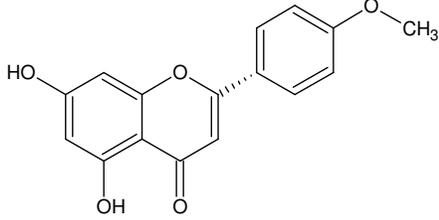
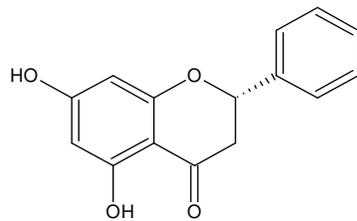
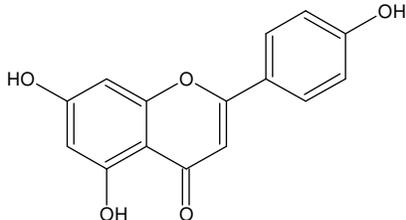
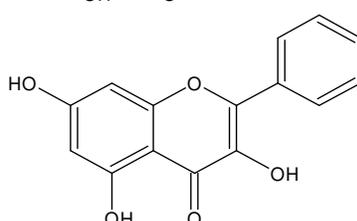
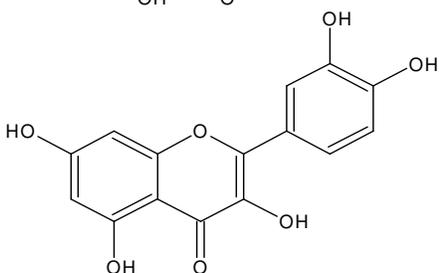
Además de los flavonoides, los compuestos fenólicos y aromáticos representan un grupo de productos activos farmacológicamente importantes presentes en el propóleo. Estudios realizados a propóleos europeos han demostrado que tanto los compuestos fenólicos como los aromáticos, compuestos ampliamente encontrados en las plantas de manera natural (Ataç-Uzel *et al.*, 2005), representan más de la mitad de los 160 compuestos identificados en esta resina (Farré *et al.*, 2004).

También posee azúcares como la galactosa, xilosa (Marcucci, 1996); vitaminas como la B₁, B₂, B₆, C y E, así como minerales tales como la plata, cesio, mercurio, lantano, antimonio, cobre, manganeso, hierro, calcio, aluminio, vanadio y silicio (Marcucci, 1995); y aminoácidos como lisina, fenilalanina, cisteína, glicina, leucina y serina, entre otras (Marcucci, 1996).

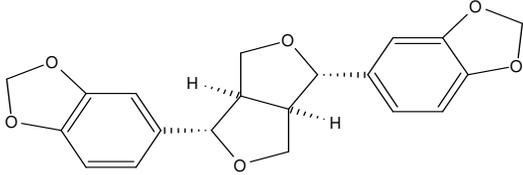
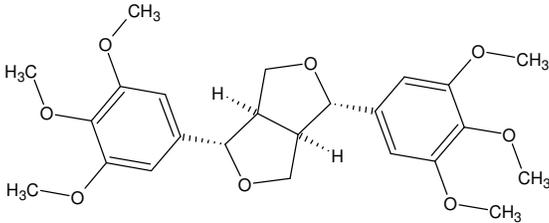
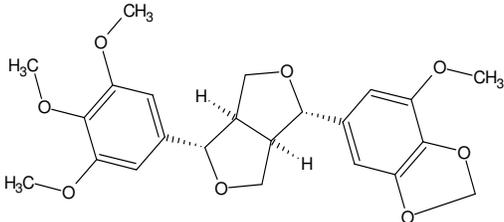
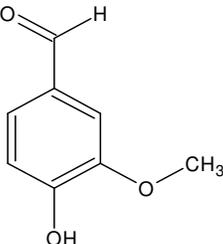
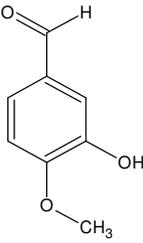
Cuadro 1. Algunos compuestos químicos encontrados en el propóleo.

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Terpenoides		
Totarol		Popova, <i>et al.</i> , 2009.
Geraniol		Marcucci, 1996. Bankova, <i>et al.</i> , 2000.
Pineno		Bankova, <i>et al.</i> , 2000.
Fucosterol		Popova, <i>et al.</i> , 2009.
Cedrol		Silici, <i>et al.</i> , 2005.
Compuestos fenólicos		
Ácido caféico		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Gardana, <i>et al.</i> , 2005.
Hidroquinona		Popova, <i>et al.</i> , 2009.
Ácido cinámico		Gardana, <i>et al.</i> , 2005.

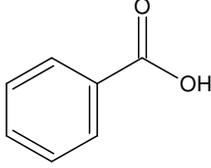
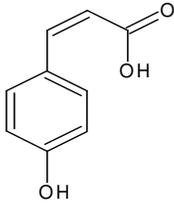
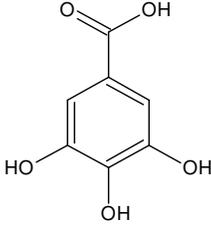
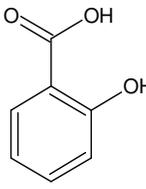
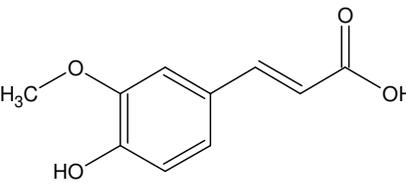
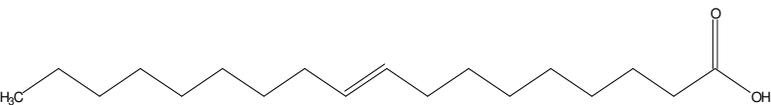
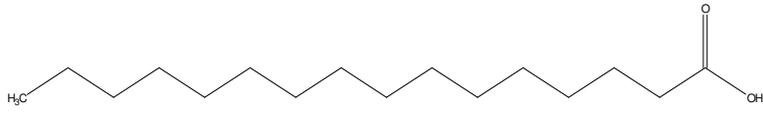
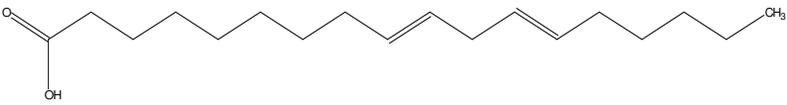
Cuadro 1. Algunos compuestos químicos encontrados en el propóleo (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Flavonoides		
Naringenina		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Silici, <i>et al.</i> , 2005.
Acacetina		Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005.
Pinocembrina		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005. Gardana, <i>et al.</i> , 2005.
Apigenina		Marcucci, 1996. Gardana, <i>et al.</i> , 2005.
Galangina		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005. Gardana, <i>et al.</i> , 2005.
Quercetina		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Silici, <i>et al.</i> , 2005.

Cuadro 1. Algunos compuestos químicos encontrados en el propóleo (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Lignanos		
Sesamina		Bankova, <i>et al.</i> , 2000. Silici, <i>et al.</i> , 2005.
Yangambina		Bankova, <i>et al.</i> , 2000.
Sesartenina		Bankova, <i>et al.</i> , 2000.
Aldehídos		
Vainillina		Marcucci, 1996. Mohammadzadeh, <i>et al.</i> , 2007.
Isovainillina		Marcucci, 1996.

Cuadro 1. Algunos compuestos químicos encontrados en el propóleo (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Compuestos aromáticos		
Ácido benzoico		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005. Mohammadzadeh, <i>et al.</i> , 2007.
Ácido <i>p</i> -cumárico		Marcucci, 1996.
Ácido gálico		Marcucci, 1996.
Ácido salicílico		Marcucci, 1996.
Ácido ferúlico		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Silici, <i>et al.</i> , 2005.
Ácidos grasos		
Ácido oléico		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996.
Ácido palmítico		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005.
Ácido linoléico		Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996.

2.1.4 Propiedades biológicas

El propóleo, como ya se describió con anterioridad, es un producto natural extensamente utilizado en la medicina popular, por ello se han realizado muchos estudios químicos y farmacológicos que constatan que posee diversas actividades biológicas que le permiten ser ampliamente utilizado en las industrias de la medicina y de alimentos para promover la salud y prevenir enfermedades (Figura 4).



Figura 4. Productos existentes en el mercado que contienen propóleo.

Entre las propiedades más comunes se encuentran:

- **Actividad antioxidante:** es una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación. Esta propiedad se debe a su actividad estabilizadora de los radicales libres y su efecto inhibitor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Farré *et al.*, 2004).
- **Actividad antitumoral:** extractos de propóleo han sido examinados *in vivo* sobre diferentes líneas celulares. Se ha determinado que extractos etanólicos de propóleo poseen la mayor actividad citotóxica contra el carcinoma cervical humano (Castaldo *et al.*, 2007; Marcucci, 1996).
- **Actividad antiinflamatoria:** es descrita principalmente contra dolencias en el sistema muscular y de las articulaciones y de otros tipos de inflamaciones, infecciones, en reumatismo y torceduras (Marcucci, 1996).

- *Actividad inmunoestimulante*: se han realizado estudios que comprueban que, aunque no se modifican sus valores plasmáticos, la capacidad de secreción de citoquinas aumenta significativamente (Basim *et al.*, 2006) (Farré *et al.*, 2004).
- *Actividad anestésica, cicatrizante y antiséptica*: es popular en la industria de los cosméticos, gracias a estas propiedades ha sido utilizado en cremas faciales, pomadas, lociones, soluciones. Ha sido utilizado por cirujanos plásticos brasileños para el tratamiento estético de pieles con acné y arrugas superficiales (Niraldo, 2005). También es encontrado en otros productos como ungüentos, shampoos, acondicionadores, brillos labiales y barnices (Walgrave *et al.*, 2005). Estas mismas propiedades también le permiten ser de gran uso en la medicina dental, principalmente en hilos dentales, pastas dentales y enjuagues bucales para tratar la gingivitis (Burdok, 1998), infecciones de la boca y garganta y caries dentales (Walgrave *et al.*, 2005).
- *Actividad antimicrobiana*: ha demostrado actividad contra bacterias como *Helicobacter pylori* (Ataç-Uzel *et al.*, 2005), bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus* (Marcucci, 1996); bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (Castaldo *et al.*, 2007), *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes spp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella bronchiseptica* y *Serratia marcescens* (Marcucci, 1996). También posee actividad contra protozoarios (*Trypanosoma cruzi*), hongos: *Candida albicans* (Castaldo *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2004), *Microsporum*, *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum* (Marcucci, 1995) y virus: *VIH*, *virus del herpes* o *virus de la influenza* (Castaldo *et al.*, 2007). Esta actividad es comúnmente atribuida a sus contenidos en ésteres y ácidos fenólicos, aunque los componentes cinámicos y flavónicos del propóleo, que alteran las membranas e inhiben la motilidad bacteriana, probablemente también contribuyen a esta acción (Farré *et al.*, 2004).

Algunos extractos de propóleo han demostrado potenciar el efecto de ciertos antibióticos (Sforzin *et al.*, 2000). La acción de antibióticos como la biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina estreptomycinina (Marcucci, 1996) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se incrementó con la adición de propóleo para nutrir el medio. La presencia de éste impide o reduce cualquier acumulación gradual de tolerancia por parte de *Staphylococcus* a los antibióticos (Marcucci, 1995).

Los disolventes y el método de extracción utilizado pueden modificar la actividad antimicrobiana del propóleo. Los extractos etanólicos al 60-80% inhiben el crecimiento microbiano, al 70-80% tienen una mayor actividad antioxidante y al 80% inactivan mayoritariamente a la hialuronidasa (Farré *et al.*, 2004).

- *Otras actividades biológicas*: se han reportado que el propóleo posee actividad como antiulcérico, citostático, hepatoprotectivo, inmunomodulador (Basim *et al.*, 2006), bacteriostático, colérico, espasmolítico (Burdok, 1998), antihipertensivo (Nirardo, 2005), regenerador de tejido cartilaginoso y tejido óseo y acción desintoxicante en el hígado (Marcucci, 1996).

2.3 Biocapas

2.3.1 Definición y generalidades

En todos los hábitats estudiados hasta la fecha, las bacterias prefieren reproducirse en cualquier superficie disponible en lugar de hacerlo en fase líquida (Carpentier, 1993). Desde el punto de vista ecológico, es conveniente que las bacterias sean propensas a colonizar en superficies, pues esto alienta la formación de relaciones simbióticas. Esta inclinación por parte de las bacterias a unirse a superficies sugiere una ventaja en la supervivencia en comparación con las bacterias planctónicas (libremente suspendidas) (Dunne, 2002).

Donlan y Costerton (2002) definen a las biocapas como una comunidad bacteriana caracterizada por células que se adhieren irreversiblemente a un sustrato o interfase o entre ellas, son embebidas en una matriz de polímeros extracelulares que las mismas células han producido y muestran un fenotipo alterado con respecto al tipo de crecimiento y transcripción de genes (Carpentier, 1993).

Cuando la superficie de un material es expuesta a un medio acuoso, casi inmediatamente, moléculas orgánicas y polímeros contenidos en dicha fase acuosa “acondicionan” la superficie neutralizando la carga que repele el acercamiento de las bacterias (Dreeszen, 2003; Donlan, 2002). Además de lo anterior, la adhesión de las bacterias a las superficies se ve limitada por otras condiciones (Cuadro 2), pero en general una biocapa puede formarse tanto en tejidos vivos como inertes, ya sea en una roca sumergida en una corriente, en un implante en el cuerpo humano, en un diente, en una pipa o conducto de agua, etc (Carpentier, 1993).

Cuadro 2. Variables que afectan la adherencia celular y la formación de la biocapa (adaptado de Donlan, 2002).

Propiedades del sustrato	Propiedades del fluido	Propiedades de la célula
Textura	Velocidad del fluido	Hidrofobicidad de la
Hidrofobicidad	pH	superficie celular
Acondicionamiento del	Temperatura	Fimbrias
Sustrato	Nutrientes	Flagelos
	Presencia de agentes antimicrobianos	Sustancias poliméricas extracelulares

La comunicación célula a célula es esencial en el desarrollo y mantenimiento de la biocapa. Las bacterias poseen un mecanismo denominado *Quorum Sensing* que les permite responder efectivamente a señales de su ambiente, incluyendo la presencia de microorganismos de la misma especie. Esta señalización conduce a la expresión de genes específicos de una biocapa cuando la densidad de la población llega a ser suficientemente alta. Estos genes codifican proteínas que sintetizan moléculas que actúan como señales para la unión célula a célula y el inicio de la formación de los polisacáridos que dan lugar al glicocáliz (Madigan, 2004).

El glicocáliz es el “pegamento” que sostiene firmemente a la biocapa a la superficie colonizada y es un complejo de exopolisacáridos de origen bacteriano, atrapa sustancias exógenas del ambiente incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, minerales, nutrientes, material de pared celular, etc. (Dunne, 2002).

2.3.2 Formación de biocapas

Estudios genéticos de biocapas mono especie (Waltnc *et al.*, 2000) han demostrado que son formadas en múltiples pasos:

- *Transporte*: las bacterias son acarreadas hacia la superficie por difusión, la turbulencia del flujo, gravedad o quimiotaxis (Carpentier, 1993).
- *Adhesión primaria de bacterias*: una vez que las bacterias planctónicas alcanzan cierta proximidad a la superficie (usualmente <1 nm), intervienen fuerzas de atracción o repulsión generadas entre la superficie y la bacteria (Figura 5.1). Estas fuerzas incluyen interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, impedimento estérico, fuerzas de van der Waals y fuerzas hidrodinámicas entre otras. Las fuerzas electrostáticas tienden a favorecer la repulsión puesto que muchas bacterias y superficies inertes están cargadas

negativamente (Dunne, 2002). Por otro lado, las interacciones hidrofóbicas probablemente posean mayor influencia en esta fase de la formación de biocapas pues algunas bacterias alteran su pared celular para aumentar su afinidad hacia las superficies, es decir, sus paredes celulares se vuelven hidrofóbicas (Dreeszen, 2003). La fase de adhesión es reversible, es decir, las bacterias pueden ser fácilmente removidas (Carpentier, 1993).

- *Adhesión secundaria de bacterias*: esta fase comprende la unión molecular, por tanto irreversible, entre las adhesinas y la superficie. Los microorganismos débilmente ligados consolidan su adhesión mediante la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) con materiales de la superficie y/o con ligandos de receptores específicos localizados en los pilis o fimbrias (Figura 5.2) (Dunne, 2002). Estos polímeros extracelulares son grupos poliméricos cargados y neutros que además de unir a las bacterias a la superficie funcionan como un sistema de intercambio iónico que concentra los nutrientes presentes en el medio (Dreeszen, 2003). Durante esta etapa, los microorganismos planctónicos también pueden unirse entre sí formando agregados en el sustrato (Dunne, 2002).
- *Maduración de la biocapa*: los microorganismos adheridos comienzan a replicarse (y morir) y las SPE interaccionan con moléculas orgánicas e inorgánicas en el medio ambiente dando lugar al glicocálix (Figura 5.3). Esta replicación está controlada por factores como: pH, perfusión de oxígeno, osmolaridad (Dunne, 2002) y la acumulación de moléculas en la interfase sólido- líquido. En esta interfase existe una concentración mayor de moléculas de nutrientes en comparación con la encontrada en masa en el fluido, por lo tanto, la transferencia de nutrientes por difusión es más rápida a los microorganismos contenidos en la biocapa que a las bacterias planctónicas contenidas en la fase acuosa (Carpentier, 1993). Durante la reproducción bacteriana, el metabolismo de las bacterias adheridas produce desechos que sirven para el desarrollo de las células “hijas” (Dreeszen, 2003). Esto trae como consecuencia un aumento en la producción de SPE y por tanto, en el volumen de la biocapa; cuando ésta madura la mayoría de su volumen (75-95 %) es ocupado por el glicocálix lleno de agua.
- *Generación de bacterias planctónicas*: cuando la biocapa alcanza una masa crítica (Figura 4.4) las condiciones ambientales en los diferentes “niveles” de ésta cambian y en ocasiones se vuelven desfavorables provocando que algunas de las bacterias se vuelvan inactivas. Incluso, en algunos casos llegan a morir por la falta de fuente de carbono, la disminución del pH, variaciones en la concentración de oxígeno o por la

acumulación de metabolitos tóxicos (Dunne, 2002). Por otro lado, algunas bacterias se desprenden para colonizar una superficie que provea una ambiente más favorable (Figura 5.5) (Waltnic *et al.*, 2000).

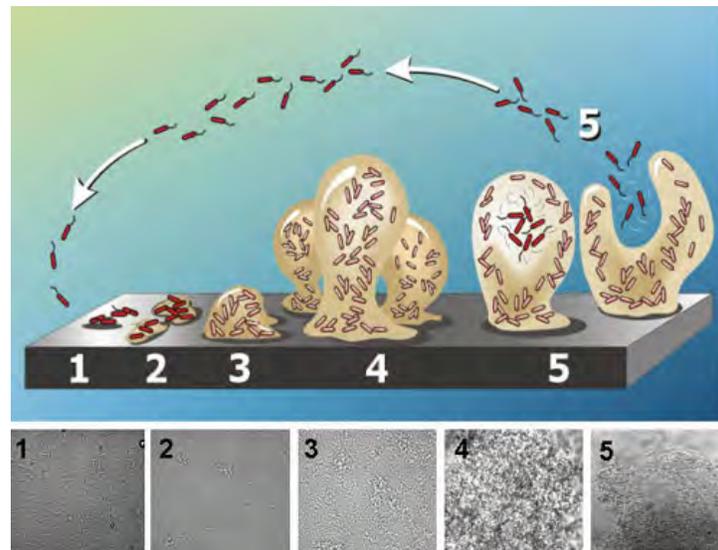


Figura 5. Proceso de formación de biocapas.

Tomado de: <http://knol.google.com/k/notas-sobre-microbiolog%C3%ADa-y-evoluci%C3%B3n#>

Fecha de acceso: 3 de septiembre de 2010.

2.3.3 Biocapas en dispositivos médicos

Puesto que el criterio de crecimiento de las biocapas es muy extenso, como ya se mencionó anteriormente, los ambientes adecuados para la colonización de los microorganismos son prácticamente ilimitados (Donlan *et al.*, 2002).

La habilidad de formar biocapas en dispositivos médicos es un factor de virulencia (Sandoe *et al.*, 2003) que poseen microorganismos tales como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros; estos microorganismos pueden ser originados por la piel de pacientes o de personal médico o de otras fuentes ambientales (Donlan, 2001).

Cuando se habla de dispositivos médicos infectados, es importante recordar que las bacterias presentes en una biocapa madura se comportan de manera diferente que las bacterias planctónicas. En particular, los microorganismos de las biocapas son más resistentes a agentes antimicrobianos que los microorganismos en suspensión (Dunne, 2002). Esta resistencia puede ser debida a: (i) los agentes antimicrobianos pueden ser impedidos por glicocálix para profundir hacia los blancos celulares, (ii) crecimiento

alterado de los microorganismos de la biocapa, (iii) otros cambios fisiológicos durante el desarrollo de la biocapa, y (iv) el microambiente de la biocapa afecta negativamente la actividad de los antimicrobianos (Dunne, 2002; Donlan *et al.*, 2002).

Los dispositivos médicos que son recurrentemente susceptibles a la formación de biocapas se resumen en el Cuadro 3.

Las biocapas, además de intervenir en contaminaciones de dispositivos médicos, también son responsables de algunas infecciones humanas: endocarditis, otitis media, prostatitis crónica bacteriana, fibrosis quística, periodontitis y caries (Donlan *et al.*, 2002), ésta última es provocada por la biocapa mono especie de *Streptococcus mutans*.

2.4 *Streptococcus mutans*

2.4.1 Descripción y clasificación

Es un coco Gram-positivo que normalmente se asocia en pares o en cadenas. Es catalasa negativo, anaerobio facultativo. Es capaz de fermentar carbohidratos obteniendo como producto principalmente ácido láctico. Generalmente es α -hemolítico. Es ureasa positivo y hialuronidasa negativo (De la Maza *et al.*, 2004). Su hábitat natural es la cavidad oral humana, aunque también puede ser aislado de heces humanas (Hamada *et al.*, 1980).

2.4.2 Patogenicidad

Streptococcus mutans es el principal agente causal de caries dentales en humanos y su habilidad para adherirse a la superficie dental colabora con la progresión de la enfermedad. Uno de sus principales factores de virulencia es la capacidad de formar biocapas con la placa dental en los dientes (Yoshida *et al.*, 2005).

S. mutans produce las enzimas glucosiltransferasas (GTFs) de tipo B, C y D que poseen la capacidad de sintetizar glucano a partir de la sacarosa contenida en nuestra dieta. Los glucanos mejoran el potencial patogénico de la placa dental mediante la promoción de la adherencia y acumulación de *S. mutans* en la superficie de los dientes y contribuyen al volumen y a la integridad estructural de la placa (Koo *et al.*, 2003).

Se cree que reduciendo la masa de esta bacteria cariogénica en la biocapa dental se podría disminuir la incidencia de caries dentales, para ello, muchas investigaciones sugieren el uso de compuestos de origen natural para impedir la adhesión de *S. mutans* (Stauder *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Dispositivos médicos que son colonizados por biocapas (Donlan *et al.*, 2002; Donlan, 2001).

Dispositivo médico	Microorganismos responsables de la formación de biocapas	Descripción
Prótesis de válvulas cardíacas	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • La biocapa resultante es mayoritariamente formada en el tejido alrededor de la prótesis.
Catéteres venosos	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • Es el dispositivo que presenta mayor incidencia de infección (3-5 %). • Las plaquetas, el plasma y algunas proteínas como albúmina y fibrinógeno “acondicionan” la superficie del catéter favoreciendo la adhesión bacteriana.
Catéteres urinarios	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • Son dispositivos tubulares de silicón o látex. • Cationes divalentes (calcio y magnesio) y el aumento del pH urinario (mediante la producción de ureasa) aumentan la adhesión bacteriana.
Lentes de contacto	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia</i> spp., <i>Proteus</i> spp. Y <i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • El grado de adherencia depende de la naturaleza del lente, pH, concentración de electrolitos y carga iónica del polímero del cuál esté hecho el lente.
Dispositivos intrauterinos	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Corynebacterium</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., enterococcus y lactobacilos anaerobios.	<ul style="list-style-type: none"> • Generalmente poseen un filamento de plástico rodeado de nylon que facilita su remoción, éste es la principal fuente de contaminación.

2.5 *Escherichia coli*

2.5.1 Descripción y clasificación

Esta bacteria capaz de formar biocapas (Donlan, 2001) forma parte del grupo de las enterobacteriáceas (*Enterobacteriaceae*) que son un vasto grupo heterogéneo de bacilos Gram-negativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales (Brooks *et al.*, 2008). Es oxidasa negativo, catalasa positivo y reducen el nitrato a nitrito, es no formador de esporas, anaerobio facultativos, usualmente tienen motilidad con flagelos aunque a veces carecen de motilidad. Es capaz de fermentar una gran cantidad de carbohidratos obteniendo como productos tanto ácido como gas (Marcucci, 1995). Crece sobre peptona o medios con extracto de carne sin adición de cloruro de sodio ni otros complementos; crecen bien en agar MacConkey, forma colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien definidos (Brooks *et al.*, 2008).

2.5.2 Patogenicidad

Escherichia coli es un miembro de la flora intestinal normal, incluso puede contribuir a la función normal del intestino y a la nutrición, por lo que es poco común que cause enfermedades, salvo cuando alcanza los tejidos fuera de su sitio normal en el intestino o en otros menos comunes, incluyendo el aparato urinario, vías biliares y otros en la cavidad abdominal (Brooks *et al.*, 2008).

- *Infección del tracto urinario*

Escherichia coli es el microorganismo que con mayor frecuencia ocasiona infecciones del tracto urinario (ITU). Se le considera responsable del 90% de todas las infecciones urinarias y del 78 a 80% de la etiología de estas infecciones en niños (Villarreal *et al.*, 2002). Implican una cuantificación al menos de 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/ mL de orina (Echeverría-Zarate *et al.*, 2006).

Una vez que *Escherichia coli* coloniza el área periuretral, las bacterias ascienden por el tracto urinario por la uretra e infectan la vejiga. En algunos casos, los microorganismos continúan el progreso a través de la uretra causando pielonefritis afectando a uno o a ambos riñones (Marcucci, 1995).

Las ITU pueden ser clasificadas en: asociadas a catéteres y no asociadas a catéteres (adquiridas en la comunidad) (Villarreal *et al.*, 2002). Las asociadas a catéteres, incluyen la contaminación microbiana y adherencia, por dentro o por fuera del mismo, luego producen polisacáridos extracelulares dando lugar a biocapas (Donlan, 2001).

- *Enfermedades intestinales*

Con base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos:

Cuadro 4. Clasificación de las cepas de *Escherichia coli* patógenas.

Clasificación	Mecanismo de patogenicidad	Referencia
Enterotoxigénica (ETEC)	Produce al menos una de dos tipos de enterotoxinas: toxina termolábil (TL) y toxina termoestable (ST), éstas producen la salida de agua y iones.	Gillespie <i>et al.</i> , 2005. Rodríguez-Angeles, 2002.
Enterohemorrágica(EHEC)	Forma una verotoxina que cesa la síntesis de proteínas.	Kaper <i>et al.</i> , 2004.
Enteroinvasiva (EIEC)	Se adhiere a las vellosidades de la mucosa invadiendo el epitelio del colon para después entrar por endocitosis a las células.	Rodríguez-Angeles, 2002.
Enteropatógena (EPEC)	Destruye las vellosidades del intestino delgado e interfiere con la cascada de señalización de las células hospederas.	Gillespie <i>et al.</i> , 2005.
Enteroagregativa (EAEC)	Las bacterias se adhieren a la mucosa intestinal, predominantemente del colon y forman una biocapa colonizando persistentemente el tracto gastrointestinal lo que ocasiona diarrea crónica.	Kaper <i>et al.</i> , 2004. Rodríguez-Angeles, 2002. Avelino <i>et al.</i> , 2010.
Adherencia difusa (DAEC)	Se caracteriza por el desarrollo de grandes extensiones celulares que envuelven a las bacterias adheridas.	Kaper <i>et al.</i> , 2004.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la falta de eficacia, el incremento de la resistencia, la toxicidad y el alto costo de los antibióticos comerciales ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos a partir de fuentes naturales que permitan combatir procesos infecciosos que afectan a la mayor parte de la población. Por esta razón, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la búsqueda exhaustiva de metabolitos secundarios a partir de especies vegetales, hongos y propóleos.

Asimismo, el estudio de varias especies vegetales ha conducido al descubrimiento de entidades químicas novedosas desde el punto de vista estructural y que inhiben de manera notable la formación de biocapa, algunos ejemplos notables son los flavonoides, terpenos y ácidos grasos. Estos hallazgos, en conjunto con la gran diversidad de propóleos en México, prácticamente inexplorados como fuentes de compuestos activos, constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de compuestos que actúen sobre la patogenicidad de ciertos microorganismos como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans*, causantes de diarreas crónicas y caries, respectivamente.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar si el extracto etanólico de propóleo y sus compuestos derivados tienen efecto sobre la formación de biocapas secretadas por bacterias patógenas con la intención de contar con nuevos productos que puedan ser utilizados para el control de diarreas y caries.

Objetivos particulares

- Realizar el fraccionamiento primario del extracto etanólico, empleando para ello, métodos cromatográficos convencionales y procesos de partición. Obteniendo así una serie de fracciones de menor complejidad que el extracto original.
- Aislar los compuestos activos a partir de las fracciones primarias.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados.
- Evaluar el efecto de los extractos derivados del propóleo sobre la formación de la biocapa mono especie por las bacterias *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Procedimientos generales

5.1.1 Análisis cromatográficos

Se utilizaron tres tipos de cromatografía en columna abierta (CCA) y tres diferentes adsorbentes para cada una:

- Cromatografía en columna al vacío (CCV) (12 cm×9 cm) sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula de 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM.
- Cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 (Merck) empacado en una columna de vidrio (4.77×37cm).
- Cromatografía en columna sobre Poliamida 6 (Supelco) empacada en una columna de vidrio (3.8×46.5 cm).

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60F₂₅₄ Merck ®, tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm). Posteriormente las placas fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 1%, FeCl₃, DPPH o anisaldehído sulfúrico seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa de los compuestos.

5.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas para los compuestos aislados, se realizaron mediante los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV. El espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) se generó en un equipo marca Varian, modelo VNMR5 el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 MHz. Los espectros se realizaron utilizando DMSO y los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

5.2 Material vegetal

Las muestras de propóleo se recolectaron de un apiario “Don Federico” ubicado en el Paraje del Panteón, San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, México, D.F. las cuales fueron colectadas por personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria.

5.3 Estudio fitoquímico de propóleo

5.3.1 Preparación del extracto de propóleo

El material vegetal (278 g) se sometió a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente utilizando 1.3 L de etanol por un período de 8 días. Se filtró al vacío el extracto obtenido y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose así un extracto total de consistencia cerosa de color marrón (92 g).

5.3.2 Fraccionamiento primario del extracto de propóleo

Una muestra del extracto obtenido se suspendió en metanol-agua (95-5) y fue sometida a diferentes particiones con CH_2Cl_2 , AcoEt, y CH_3OH utilizando 300 mL de cada disolvente y por triplicado. De este procedimiento se obtuvieron 3 fracciones: F1, F2 y F3 respectivamente.

5.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto de propóleo a partir de F1

La fracción F1 (28.1512 g) se sometió a un proceso de CCV sobre gel de sílice, se eluyó utilizando como fase móvil CH_2Cl_2 - CH_3OH a diversas proporciones, Cuadro 5. Este proceso generó 10 fracciones combinadas (F1. 1 – F1.10).

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F1.

Sistema de elución	Proporción	Fraciones Obtenidas	Fraciones Combinadas
CH ₂ Cl ₂	100	1 - 3	F1.1
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	95:5	4 - 5	F1.2
		6 - 8	F1.3
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	90:10	9 - 11	F1.4
		12 - 13	F1.5
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	85:15	14 - 15	F1.6
		16	F.1 7
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	70:30	17 - 19	F1.8
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	1:1	20	F1.9
		21 - 25	F1.10
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	100		

5.3.4 Fraccionamiento terciario a partir de F1.3

La fracción F1.3 (2.094 g de peso) fue sometida a un fraccionamiento en CCA utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil se utilizó CH₃OH. Mediante este proceso se obtuvieron 20 fracciones que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniendo 7 fracciones combinadas (F1.3.1- F1.3.6).

Cuadro 6. Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F1.3.

Sistema de elución	Proporción	Fraciones Obtenidas	Fraciones Combinadas
CH ₃ OH	100	1 - 3	F1.3.1
		4 - 5	F1.3.2
		6	F1.3.3
		7 - 9	F.1.3.4
		10 - 18	F1.3.5
		19 - 20	F1.3.6

5.3.5 Obtención y purificación de acetina a partir de F1.3.5

La fracción F1.3.5 (0.321 g de peso) fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil se utilizó

CH₃OH. Mediante este proceso se obtuvieron 15 fracciones que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniendo 5 fracciones combinadas (F1.3.5.A-F1.3.5.E).

A partir de la fracción F1.3.5.D cristalizó un sólido de color amarillo el cual se purificó mediante un proceso de cristalización. Este proceso permitió la obtención de 50 mg de un compuesto (PAN-C001). El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como el flavonoide acetina.

Cuadro 7. Purificación por cromatografía en CA de la fracción F1.3.5

Sistema de elución	Proporción	Fracciones Obtenidas	Fracciones Combinadas
CH ₃ OH	100	1 - 2	F1.3.5A
		3 - 4	F1.3.5B
		5	F.1.3.5C
		6 - 10	F.1.3.5D
		11 - 15	F.1.3.5E

5.3.6 Separación a partir de F1.3.4

La fracción F1.3.4 (386 mg de peso) fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta sobre Sephadex LH-20 como adsorbente y utilizando como fase móvil CH₃OH. De este proceso se obtuvieron 5 fracciones combinadas (F1.3.4.1-F1.3.4.5)

Cuadro 8. Separación por CCA de la fracción F1.3.4.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones Obtenidas	Fracciones Combinadas
CH ₃ OH	100	1 - 3	1
		4	2
		5	3
		6	4
		7 - 13	5

5.3.7 Obtención y purificación de isosakuranetina a partir de F1.3.4.5

La fracción F1.3.4.5 (85.6 mg de peso) fue sometida a un fraccionamiento por CCA sobre Poliamida 6 como adsorbente y utilizando como fase móvil CH₃OH en las

primeras 23 fracciones colectadas y $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ hasta la última fracción colectada. De este proceso se obtuvieron 38 fracciones que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniendo 4 fracciones combinadas (F1.3.4.5.1- F1.3.4.5.4).

A partir de la fracción F1.3.4.5.1 cristalizó de manera espontánea un sólido de color blanco el cual se purificó mediante un proceso de recromatografía en placa de gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 14 mg de un compuesto (PAN-C002). El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como el flavonoide isosakuranetina.

Cuadro 9. Purificación por cromatografía en CA de la fracción F1.3.4.5

Sistema de elución	Proporción	Fracciones Obtenidas	Fracciones Combinadas
CH_3OH	100	1	1
		2 - 3	2
		4 - 18	3
$\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$		19 - 38	4

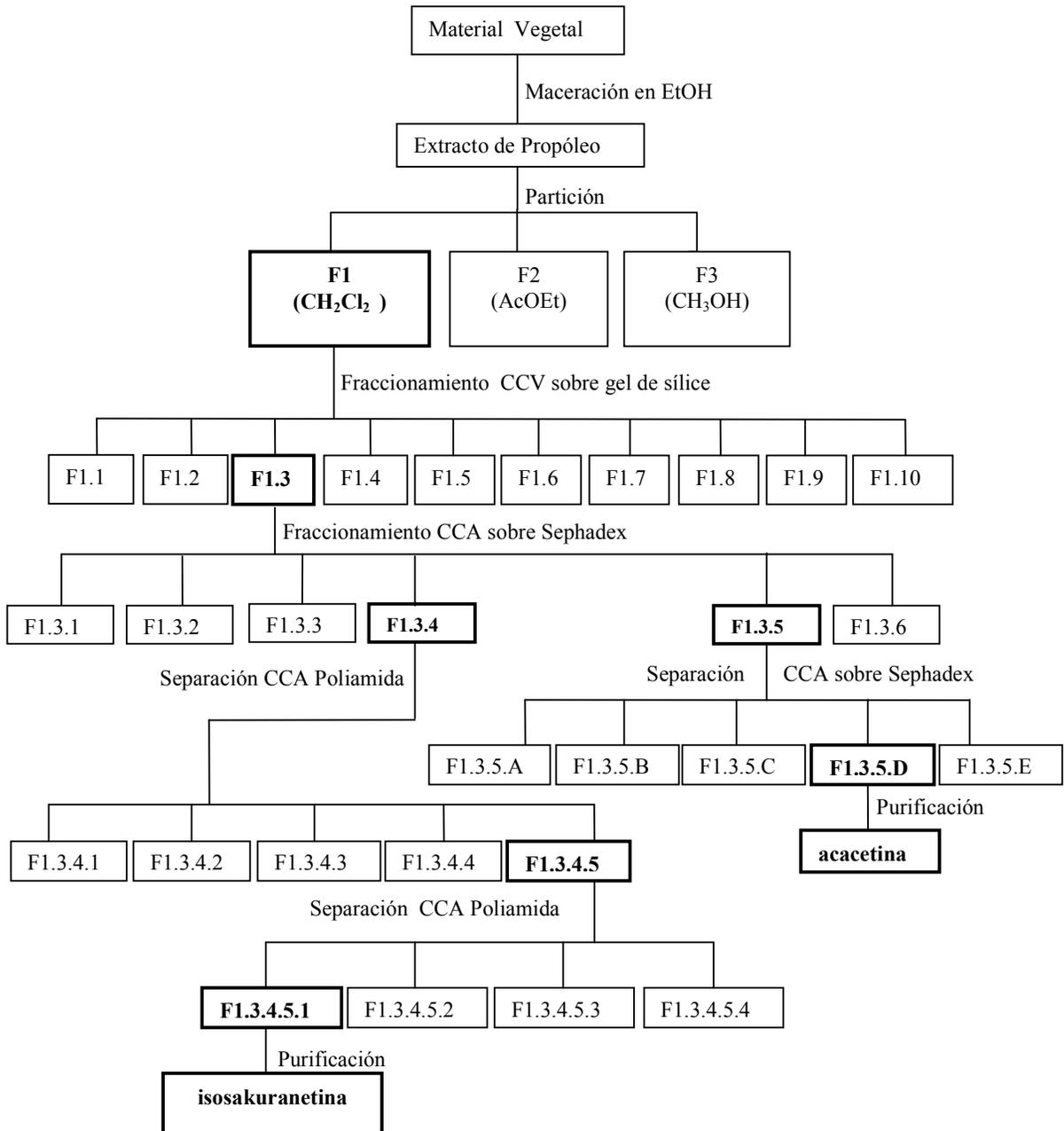


Diagrama 1. Proceso de extracción, fraccionamiento, separación y purificación de propóleo.

5.4 Ensayo de inhibición de formación de biocapa

5.4.1 Estandarización del Método

Para este ensayo se utilizó la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa O42 con el serotipo O44:H18 y una cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 700611. Las células bacterianas se transfirieron por separado de un tubo de trabajo a cajas Petri con medio BHI (Brain Heart Infusion) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se tomaron colonias aisladas y se prepararon suspensiones bacterianas con solución salina estéril al 0.85% y se ajustó a 67%-77% de transmitancia en un colorímetro Vitek (BioMérieux Vitek, Inc. Colirimeter) que corresponde a 3×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ mL).

En la primera fase de esta parte del estudio se definió el tiempo óptimo para la formación de biocapa. Los tiempos de incubación de los cultivos bacterianos seleccionados fueron: 24 horas, 48 horas y 72 horas, en cada tiempo los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Para el estudio se emplearon placas de 24 pozos (Costar Corning Incorporated NY; USA), que se inocularon con 50 μ L del cultivo bacteriano previamente ajustado en 1000 μ L de dos medios de cultivo D-MEM y BHI. Lo anterior para definir cual de éstos favorecía la formación de biocapa. Las placas inoculadas se incubaron a 37° C a los tiempos referidos, concluido cada periodo se retiraban las placas de la incubadora y se procedía a evaluar la formación de la biocapa. Para la cuantificación de la biocapa mono especie producida, se utilizó el método descrito por Stepanović y colaboradores con modificaciones de acuerdo a lo descrito por Burmølle y su equipo de colaboradores.

Para conocer si se formaban las biocapas, el contenido de cada uno de los pozos se retiró con una pipeta Pasteur, posteriormente para eliminar las bacterias que no se integraron a la biocapa (planctónicas), se hizo un lavado por triplicado de cada pozo con solución salina estéril al 0.85%. Una vez realizados los lavados, a cada pozo se le agregó 1.0 mL de cristal violeta al 1% y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Este colorante se une a moléculas cargadas negativamente, incluyendo ácidos nucleicos y polisacáridos, de ahí que sirva como una medida general para evaluar la formación de biocapa (Burmølle *et al.*, 2006). Una vez transcurridos los 20 minutos, el colorante se retiró con una pipeta Pasteur y se realizaron nuevamente tres lavados para eliminar el colorante no fijado a la biocapa.

El cristal violeta adherido se disolvió en 1 mL de etanol al 96%, y el contenido de cada pozo se colocó en celdas de plástico con ayuda de una pipeta Pasteur para tomar la lectura de densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2). El

ensayo se realizó por duplicado en dos ocasiones diferentes tanto en la fase de estandarización como posteriormente en la evaluación de la actividad de los compuestos (extracto etanólico de propóleo, acetina e isosakuranetina) y en la concentración mínima inhibitoria . De los resultados obtenidos en cada ensayo se eliminaron los datos que dieron las lecturas más altas y más bajas (D.O. 570 nm), se consideró la media para definir la desviación estándar y se calculó la p para definir si los resultados eran significativos ($p < 0.05$).

5.4.2 Inhibición de la formación de biocapas

- Ensayo con *Escherichia coli*.

Este ensayo, se realizó de acuerdo a lo descrito previamente durante la estandarización del procedimiento. En esta fase del estudio se utilizó la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa O42 con el serotipo O44:H18. Las células bacterianas de *Escherichia coli* se transfirieron de un tubo de trabajo a cajas Petri con medio BHI (Brain Heart Infussion) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se tomaron colonias aisladas y se prepararon suspensiones bacterianas con solución salina estéril al 0.85% y se ajustó a 67%-77% de transmitancia en un colorímetro Vitek (BioMérieux Vitek, Inc. Colirimeter) que corresponde a 3×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ mL).

Para evaluar la actividad del propóleo y posteriormente dos de sus compuestos se realizó el siguiente procedimiento: en placas de 24 pozos (Costar Corning Incorporated NY; USA) se colocó la cantidad necesaria de medio BHI (900, 990, 999 μ L) y la correspondiente de cada uno de los compuestos (100, 10 y 1 μ L) por separado, para obtener las concentraciones de 0.2, 0.02 y 0.002 mg/mL tanto del propóleo completo como de los compuestos aislados isosakuranetina y acetina, el volumen final para cada pozo fue de 1 mL, al cual se le adicionaron 50 μ L de la suspensión bacteriana previamente preparada. En los diferentes ensayos se utilizaron varios testigos: pozos únicamente con medio de cultivo sin inocular, un testigo de la cepa de *E. coli* para crecimiento bacteriano y de la formación del biocapa (positivo), pozos con medio BHI, pozos con cada uno de los compuestos y los solventes utilizados para solubilizarlos. Estos últimos se utilizaron sin inocular la bacteria, para verificar que no existiera alguna contaminación de los mismos y que ésta influyera en los resultados finales, además se incluyeron otros pozos con solvente e inoculados con la bacteria, para corroborar que los solventes no fuesen los responsables de inhibir la formación de la biocapa. En el ensayo

se evaluó si en la actividad de los compuestos analizados influía su adición previa a los pozos, para tal se realizaron dos variantes, en la primera el compuesto a probar se agregó y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de colocar el medio de cultivo y las bacterias, en el segundo se adicionó el medio de cultivo junto con el compuesto justo antes de agregar el cultivo de bacterias. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas que fue el tiempo óptimo para la formación de la biocapa.

- Ensayo con *Streptococcus mutans*.

Para probar la actividad del extracto etanólico de propóleo con *S. mutans* se llevó a cabo la misma metodología descrita para *E. coli* con algunas modificaciones, ya que con los resultados obtenidos en la estandarización se observó que la cepa a prueba de *S. mutans* no formaba gran cantidad de biocapa. Por tanto, se realizó el ensayo probando solamente el extracto de propóleo y no los compuestos aislados. Se probaron dos cepas denominadas: *S. mutans* ATCC 700611-1 (cepa original), la cual se utilizó desde el comienzo de los ensayos y *S. mutans* ATCC 700611-2 (cepa nueva), la cual surgió a partir de la resiembra de la cepa original con el fin de purificar y cerciorarnos que la cepa no se encontraba contaminada, para lo cual se realizaron tinciones Gram. Con los resultados obtenidos se comprobó la hipótesis de que la cepa era mala formadora de biocapa y que los datos graficados no eran confiables, por lo que se decidió no continuar la investigación con este microorganismo.

5.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana del propóleo y compuestos aislados contra *Escherichia coli*

Para evaluar si el efecto de inhibición de la biocapa no estuviese relacionado con un efecto antimicrobiano del propóleo, isosakuranetina y acacetina, se realizó un ensayo de concentración inhibitoria mínima en placa de 96 pozos. Para esta fase se utilizó la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa O42, ésta se sembró en placas de agar BHI y se incubó a 37°C durante 18 horas, para ajustar el inóculo se seleccionaron de dos a tres colonias que fueron suspendidas en solución salina (0.85%) hasta 67%-77% de transmitancia en un colorímetro (BioMérieux Vitek, Inc. Colirimeter).

En el ensayo se evaluaron el extracto etanólico de propóleo, acacetina e isosakuranetina, además se utilizó un control sin inocular, un control de crecimiento bacteriano para *E. coli*, controles con ampicilina y gluconato de clorhexidina, así como

controles de los compuestos a evaluar y de los antimicrobianos, para corroborar que éstos no estuvieran contaminados e influyeran en los resultados finales.

A cada uno de los pozos de las placas se adicionaron 100 μL de medio BHI (doble concentración), posteriormente en cada una de las filas (A-H) de la columna 1 de las placas se colocaron 100 μL de cada compuesto o de cada control, alcanzando una concentración inicial de 1 mg/mL tomando en cuenta el volumen de medio BHI añadido. Se prosiguió realizando diluciones sucesivas de 100 μL hasta llegar a la columna 12. Finalmente, se añadieron 100 μL de la suspensión bacteriana de *E. coli* y las placas se incubaron por 24 horas a 37° C.

Una vez transcurrido ese tiempo, para conocer el efecto sobre la viabilidad de la bacteria y definir la CMI de cada pozo se tomaron 5 μL del cultivo y se sembraron por goteo en cajas Petri con medio BHI, las placas se incubaron durante 24 horas a 37° C para que al concluir el tiempo se analizara la presencia o no de crecimiento bacteriano.

6. RESULTADOS

6.1 Acacetina

Se obtuvieron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN- H^1), de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C^{13}) y de masas con la finalidad de obtener la estructura química de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona, comúnmente denominada acacetina.

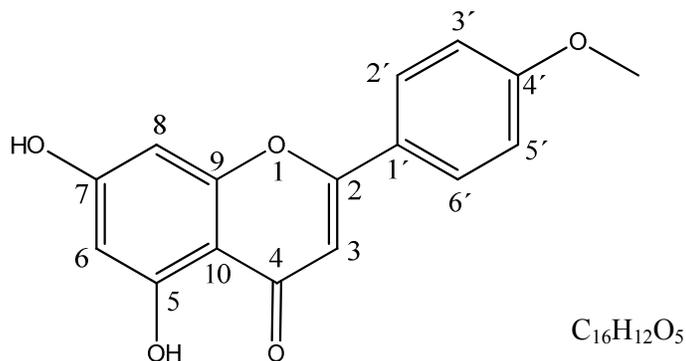


Figura 6. Estructura química de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina).

Acacetina (PAN-C001): 1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H (ppm): 3.82 (3H, s, 4'-OCH₃), 6.17 (1H, s, H-6), 6.48 (1H, s, H-8), 6.83 (1H, s, H-3), 7.08 (2H, d, $J= 8.50$ Hz, H-3', H-5'), 7.98 (2H, d, $J= 8.50$ Hz, H-6', H-2'), 10.57 (1H, s, 7-OH), 12.89 (1H, s, 5-OH); ^{13}C -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ_C (ppm): 164.6 (C-2), 163.7 (C-7), 162.7 (C-5), 161.9 (C-4'), 157.8 (C-9), 128.7 (C-2', C-6'), 123.2 (C-1'), 115 (C-3', C-5'), 104.2 (C-10), 103.9 (C-3), 99.3 (C-6), 94.5 (C-8), 56.0 (-OCH₃). EMIE: M^+ 284(100), 132 (24), 285 (17), 241 (13), 152 (10), 128 (9), 283 (9), 89 (9), 152 (9), 117, (7), 300 (6), 69 (5), 256 (4), 213 (4), 135 (3), 269 (2), 67 (2), 153 (1), 111 (1), 167 (0.5), 229 (0.5).

6.2 Isosakuranetina

Se obtuvieron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN- H^1), de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C^{13}) y de masas con la finalidad de obtener la estructura química del 4'-metoxi-5,7-dihydroxiflavanona, conocido con el nombre trivial de isosakuranetina.

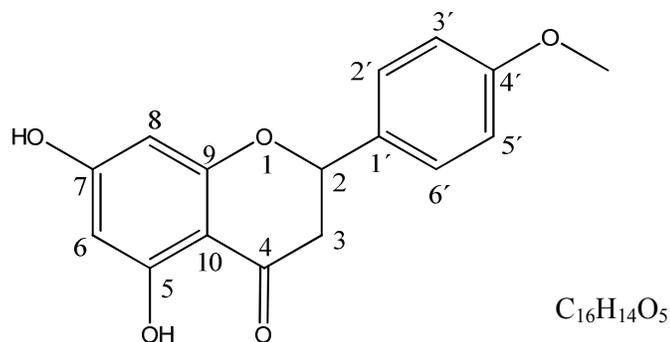


Figura 7. Estructura química del 4'-metoxi-5,7-dihidroiflavanona (isosakuranetina).

Isosakuranetina (PAN-C002) : 1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H (ppm): 2.72 (1H, dd, $J= 17.0, 3.0$ Hz, Ha-3) 3.27 (1H, dd, $J= 17.0, 13.0$ Hz, Hb-3), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃), 5.50 (1H, dd, $J= 13.0, 3.0$ Hz, H-2), 5.88 (1H, d, $J= 2.0$ Hz, H-6), 5.89 (2H, d, $J= 8.50$ Hz, H-3', H-5'), 6.48 (1H, s, H-8), 7.44 (2H, d, $J= 8.50$ Hz, H-2', H-6'), 12.14 (1H, s, -OH). EMIE: M^+ 286 (100), , 285 (63), 187 (62) 120 (32), 193 (23), 180 (22), 166 (24), 134 (19), 138 (18), 287 (16), 95 (15), 121 (13), 119 (12), 91 (12), 269 (7), 168 (7), 107 (7), 258 (6), 243 (6), 192 (6), 69 (6), 122 (5), 283(4), 147 (4), 65 (4), 288 (3), 194 (3), 77 (3), 96 (2), 215 (1), 165 (1), 229 (0.05).

6.3 Estandarización del ensayo de inhibición de formación de biocapa

- Formación de biocapa por *Streptococcus mutans*

Como se hizo referencia en el desarrollo experimental para este ensayo, se emplearon dos medios de cultivo (D-MEM y BHI) y tres tiempos de incubación (24, 48, 72 horas). Los resultados obtenidos mostraron que para ambos medios de cultivo el tiempo óptimo de formación de biocapa con la cepa de *S. mutans* fue a las 48 horas con una lectura de D.O. cercana a 0.300 con ambos medios de cultivo. El medio con el que la bacteria mostró mayor formación de biocapa fue con BHI obteniendo lecturas de D.O. de 0.171 a las 24 horas y 0.351 a las 48 horas. El mismo ensayo con el medio D-MEM mostró lecturas promedio de 0.078 a las 24 horas y 0.296 a las 48 horas (Figura 8a). Una observación más, fue la disminución en la intensidad de las lecturas de D.O. a las 72 hrs. con los dos medios de cultivo utilizados.

- Formación de biocapa por *Escherichia coli*

El mismo ensayo con la cepa de *E. coli* O42, mostró que el medio de cultivo D-MEM no favorecía la formación de biocapa, ya que las lecturas de D.O. fueron de 0.181 a las 24 horas y 0.270 a las 48 horas. El mismo ensayo con el medio BHI aportó lecturas de D.O.

de 2.930 a las 24 horas, 2.617 a las 48 horas y 3.205 a las 72 horas, resultado que muestra que *E. coli* O42 es una cepa excelente formadora de biocapas (Figura 8b).

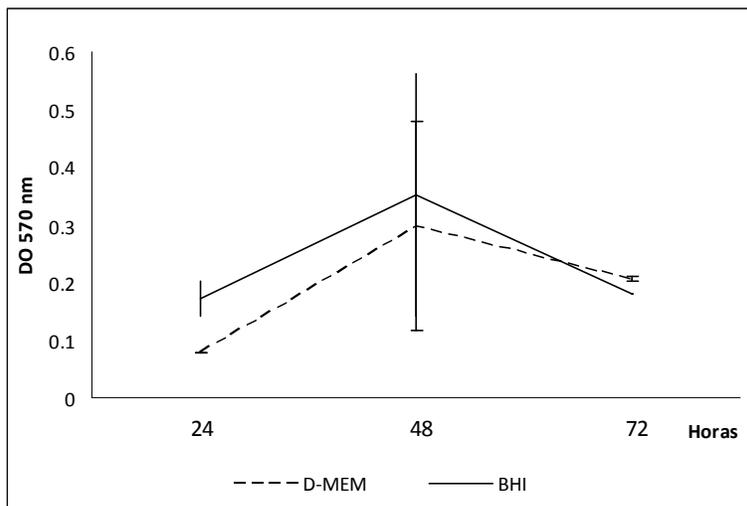


Figura 8a. Formación de biocapa de *Streptococcus mutans*. Lecturas de D.O. obtenidas a diferentes tiempos de incubación (37°C), en dos medios de cultivo diferentes.

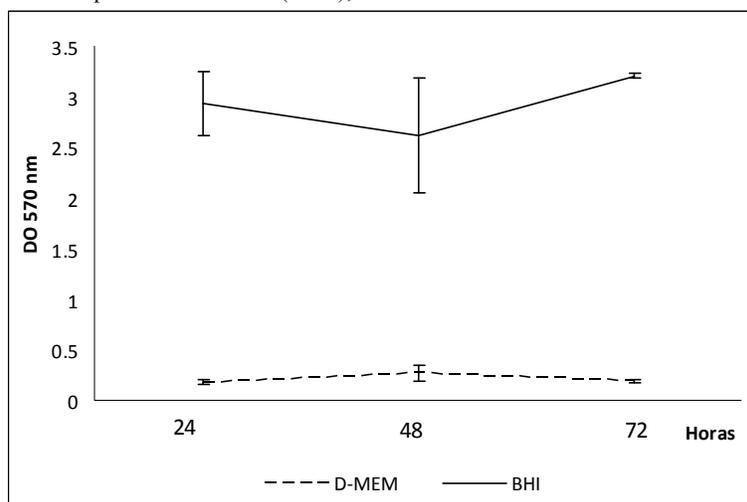


Figura 8b. Formación de biocapa de *Escherichia coli*. Lecturas de D.O. obtenidas a diferentes tiempos de incubación (37°C), en dos medios de cultivo diferentes.

6.4 Inhibición de formación de biocapa de *Streptococcus mutans*

Debido a la escasa capacidad para la formación de biocapa mostrada por la cepa de *S. mutans* ATCC 700611-1 (original) en el ensayo de estandarización, en esta fase del estudio se incluyó una cepa recuperada del cultivo que se mantenía en congelación: ATCC 700611-2 (nueva). Los resultados obtenidos para los controles mostraron que la cepa ATCC 700611-2 dio lecturas de D.O de 0.470, mayor a la obtenida con la cepa de *S. mutans* ATCC 700611-1 que nuevamente dio lecturas de D.O. bajas (0.190).

No obstante que ambas cepas de *S. mutans* no se pueden considerar buenas formadoras de biocapas, se decidió evaluar el efecto del propóleo sobre dicha propiedad. Los resultados al respecto mostraron que en ninguna de las tres concentraciones de propóleo analizadas (0.2, 0.02 y 0.002 mg/mL) se inhibió la formación de biocapa, por el contrario se observó un incremento en la lectura de D.O., efecto que se identificó principalmente con la cepa ATCC 700611 y en el ensayo en el que se realizó la preincubación del propóleo durante 20 minutos.

En la concentración más alta (Figura 9a), las D.O. obtenidas para la cepa ATCC 700611-2 fueron de 0.247 sin incubar y 0.378 incubando. Con respecto al *S. mutans* ATCC 700611-1 los resultados mostraron una D.O. de 0.378 sin preincubar y 1.349 incubando, por lo tanto el aumento en la formación de biocapa es muy evidente al igual que en la Figura 9b y en la Figura 9c.

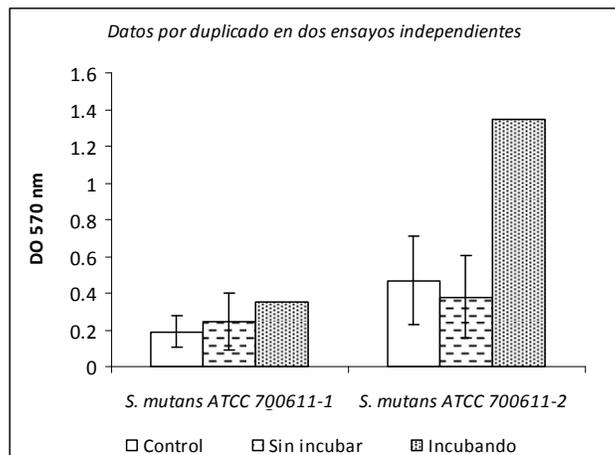


Figura 9a. Ensayos de inhibición de la formación de biocapas de *Streptococcus mutans*. Lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, utilizando una concentración de 0.2 mg/mL.

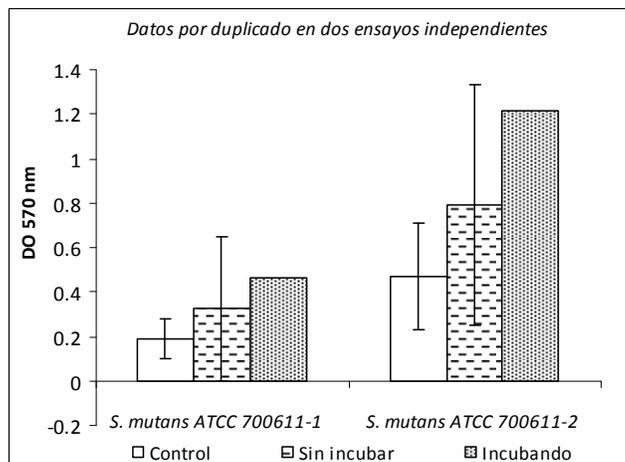


Figura 9b. Ensayos de inhibición de la formación de biocapas de *Streptococcus mutans*. Lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, utilizando una concentración de 0.02 mg/mL.

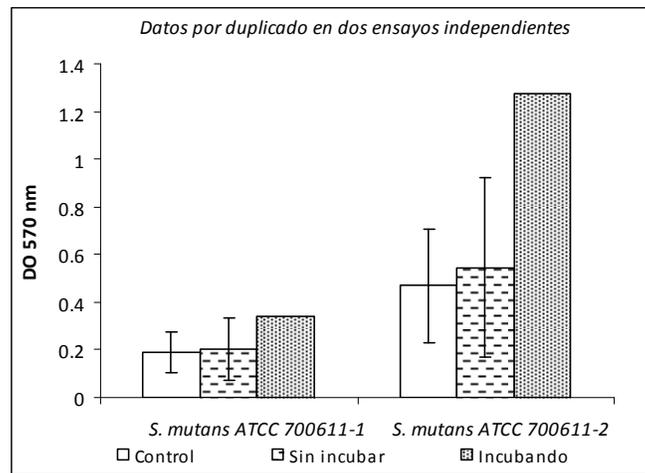


Figura 9c. Ensayos de inhibición de la formación de biocapas de *Streptococcus mutans*. Lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, utilizando una concentración de 0.002 mg/mL.

6.5 Ensayo de inhibición de formación de biocapa de *Escherichia coli*

Para evaluar si el propóleo, la isosakuranetina y la acetina por si solos no retenían el cristal violeta, se realizaron ensayos con cada uno de los compuestos siguiendo el mismo protocolo empleado para la formación de biocapas. Los resultados al respecto mostraron que ninguno de los compuestos retenía el colorante lo que permitió continuar con el ensayo de inhibición con la cepa de *Escherichia coli*.

El ensayo con esta cepa como en los casos anteriores se realizó en dos ocasiones y cada uno por duplicado; para el análisis de resultados se eliminaron los valores más altos y más bajos con los que se obtuvieron la media y la desviación estándar. Para definir el porcentaje de inhibición de la formación de biocapa, se consideró como 100% (formación de biocapa) la lectura en D.O. mostrada por el control sin tratamiento. A diferencia de lo observado con las cepas de *S. mutans*, con *Escherichia coli* se observó que el propóleo tiene un efecto inhibitor sobre la formación de biocapas. Dicha propiedad fue dosis dependiente observando mayor inhibición (mayor a 90%) a la concentración más alta (0.2 mg/mL). Como se hizo referencia en el desarrollo experimental, el ensayo se realizó con dos variantes: una realizando una preincubación del propóleo durante 20 minutos antes de administrar la bacteria y la otra agregando al mismo tiempo el propóleo y la bacteria. Los resultados a la concentración de 0.2 mg/mL de propóleo no mostraron diferencias entre ambas condiciones (sin incubar y preincubación) obteniendo una inhibición del 94% y 96% respectivamente (Figura 10a.), el mismo ensayo a la concentración de 0.02 mg/mL indujo una inhibición de 64% sin incubar y de 48% preincubando (Figura 10b.). Con relación a la dosis de 0.002 mg/mL la

inhibición de la formación del biocapa con la condición sin incubar fue del 41% y con incubación previa del 14% (Figura 10c.).

Los resultados de inhibición en la formación de biocapa obtenidos con el propóleo con *E. coli*, dieron elementos para evaluar a la acetina y la isosakuranetina, los dos compuestos obtenidos del extracto. Los procedimientos para evaluar su actividad inhibitoria de la formación de biocapas, fueron los mismos utilizados con el propóleo. Las concentraciones de acetina e isosakuranetina se ajustaron para obtener las mismas que se utilizaron con el propóleo (0.2, 0.02 y 0.002 mg/mL). Con la concentración de 0.2 mg/mL de acetina se obtuvo una inhibición de la formación de biocapa del 86% en el ensayo sin incubar y del 91% con preincubación, en las siguientes concentraciones (0.02 y 0.002 mg/mL) la inhibición fue mayor a 80% y de 75% respectivamente. Tomando en cuenta las desviaciones estándar obtenidas en los ensayos de acetina, no se identificaron diferencias entre la preincubación y el ensayo sin incubar (Figura 10).

El otro compuesto que se probó (isosakuranetina), a la concentración más alta, causó inhibición del 90% en el ensayo en el que no se incubó previamente y 27% cuando se realizó la incubación del compuesto 20 minutos. Con la concentración de 0.02 mg/mL la inhibición sin incubación previa fue de 84% y preincubando del 65%, con la concentración más baja (0.002 mg/mL) la inhibición obtenida fue del 61% y 68% respectivamente (Figura 10).

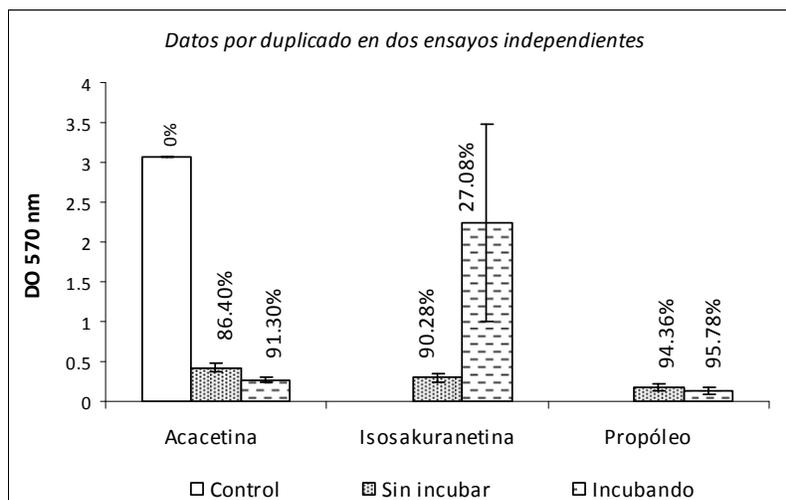


Figura 10a. Inhibición de la formación de biocapas. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, acetina e isosakuranetina, compuestos obtenidos del propóleo utilizando una concentración de 0.2 mg/mL

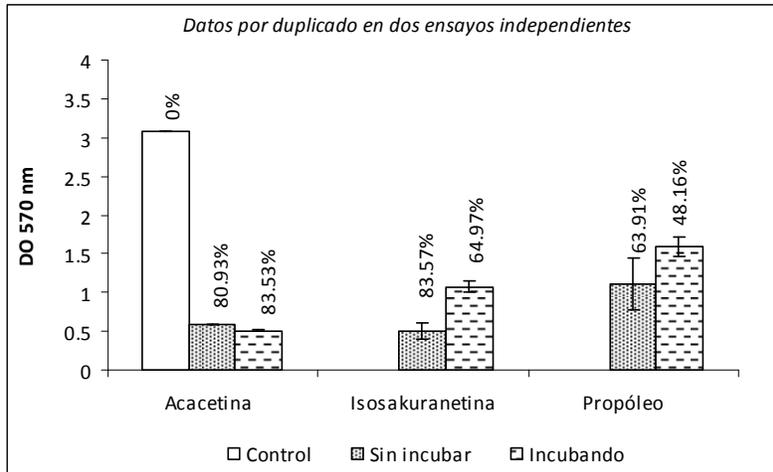


Figura 10b. Inhibición de la formación de biocapas. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, acetina e isosakuranetina compuestos obtenidos del propóleo utilizando una concentración de 0.02 mg/mL

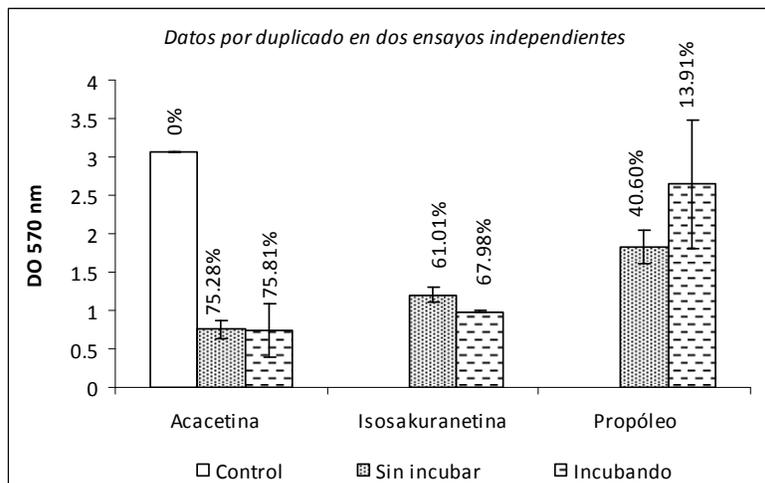


Figura 10c. Inhibición de la formación de biocapas. Porcentaje de inhibición de las lecturas de transmitancia obtenidas con el propóleo, acetina e isosakuranetina compuestos obtenidos del propóleo utilizando una concentración de 0.002 mg/mL.

Se realizó análisis estadístico de los resultados con un paquete estadístico, esto con la finalidad de conocer si las lecturas promedio de transmitancia obtenidas para los controles bacterianos presentaban diferencias significativas con respecto a los valores de transmitancia obtenidos utilizando propóleo y sus derivados (Cuadro 10).

Para el caso de isosakuranetina y acetina sin incubar, todos los valores obtenidos muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$), por su parte, el propóleo únicamente muestra diferencia significativa a la mayor concentración. Cuando los compuestos fueron incubados los resultados variaron dependiendo del compuesto utilizado.

Cuadro 10. Análisis estadístico de los valores *p* obtenidos en el ensayo de inhibición de formación de biocapa de *Escherichia coli*.

Compuesto	Concentración (mg/mL)	Valor <i>p</i> Sin incubar	Valor <i>p</i> Incubando
Propóleo	0.002	0.076	0.600
	0.02	0.076	0.038
	0.2	0.006	0.006
Isosakuranetina	0.002	0.023	0.003
	0.02	0.019	0.015
	0.2	0.009	0.515
Acetina	0.002	0.023	0.067
	0.02	0.001	0.002
	0.2	0.009	0.006

6.6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): actividad antimicrobiana del propóleo y compuestos aislados contra *Escherichia coli*

Para conocer si el efecto de inhibición en la formación de biocapa de la cepa de *E. coli*, inducido por el propóleo, la acetina y la isosakuranetina, no estaba relacionado con actividad antimicrobiana de los compuestos, se decidió realizar un ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI). Como se mencionó en desarrollo experimental se realizaron diluciones seriadas partiendo de una concentración de 1mg/mL y la última de 0.49 µg/mL.

Ninguno de los tres compuestos (propóleo, acetina e isosakuranetina) inhibió el crecimiento de la bacteria (Figura 11). En el ensayo, además se incluyeron como controles ampicilina y gluconato de clorhexidina a las concentraciones de 100 µg/mL y 400 µg/mL respetivamente, los resultados obtenidos por los controles mostraron inhibición del crecimiento de la bacteria incluso a concentraciones bajas. Esto se comprobó en el ensayo por goteo en las placas de agar BHI (Figura 12).

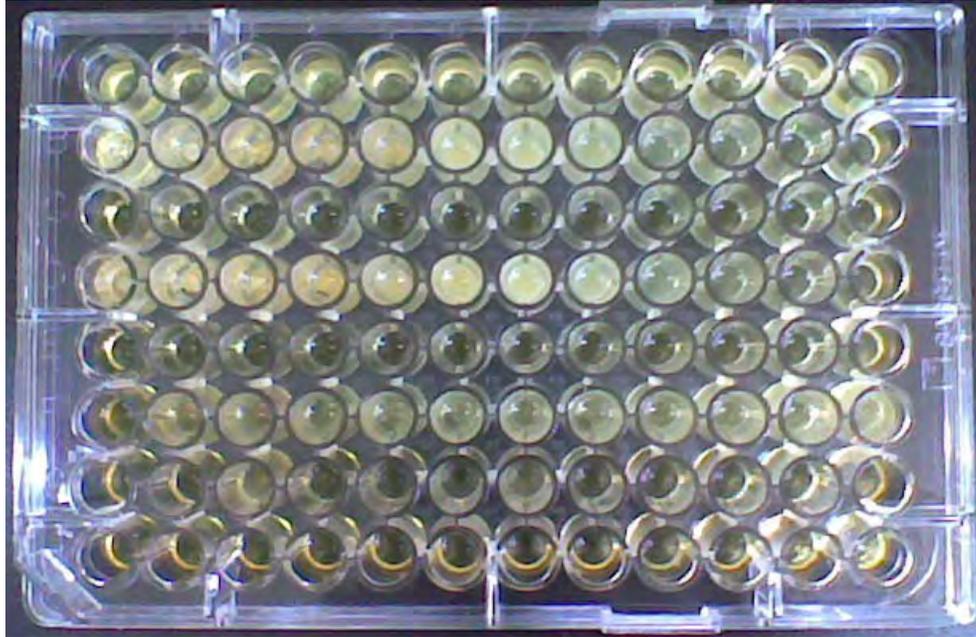
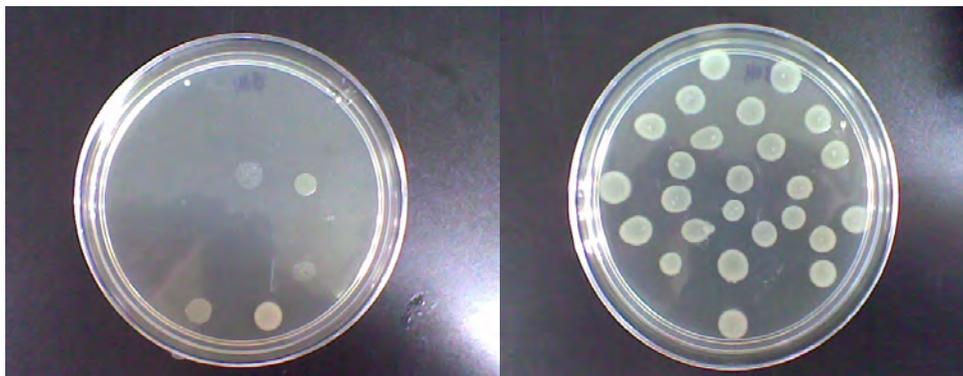


Figura 11. Ensayo de concentración mínima inhibitoria de *Escherichia coli*.



Escherichia coli con ampicilina o gluconato de clorhexidina.

Escherichia coli con propóleos o derivados.

Figura 12. Ensayo por goteo a partir de las placas de concentración mínima inhibitoria de *Escherichia coli*.

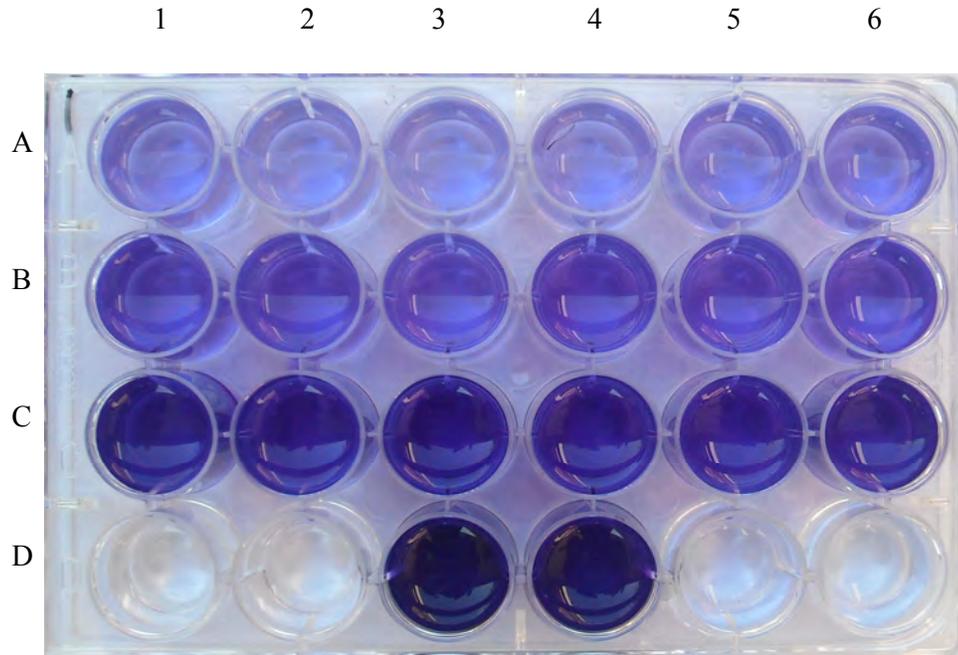


Figura 13. Ensayo de cristal violeta para *Escherichia coli*.

- A 1-3: 0.2 mg/mL de propóleo sin incubar.
- A 4-6: 0.2 mg/mL de propóleo incubando.
- B 1-3: 0.02 mg/mL de propóleo sin incubar.
- B 4-6: 0.02 mg/mL de propóleo incubando.
- C 1-3: 0.002 mg/mL de propóleo sin incubar.
- C 4-6: 0.002 mg/mL de propóleo incubando.
- D 1-2: Control de esterilidad.
- D 3-4: Control bacteriano.
- D 5-6: Control de disolvente.

7. DISCUSIÓN

El estudio de productos de origen natural se incrementa día con día, principalmente por el hecho de que representan una alternativa para la búsqueda de compuestos activos eficaces y menos tóxicos, para el tratamiento de diferentes padecimientos (Duarte *et al.*, 2006). El propóleo es un producto que está conformado por diversos compuestos químicos, también se sabe que dicha composición depende del sitio en el que se localicen los panales de abejas, principalmente por la vegetación nativa de los lugares de recolección (Alencar *et al.*, 2007).

Los flavonoides representan el grupo de compuestos farmacológicamente más importantes identificados en el propóleo, en la literatura existen numerosos reportes sobre su composición y propiedades biológicas entre las que destacan la actividad antioxidante, antiviral, antiulcerosa, inmunoestimulante, citostático, cicatrizante (Burdok, 1998).

Estudios recientes como el realizado por García Bernal y colaboradores (2007), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de propóleo cubano identificaron que 10.5 µg/mL era la CMI₉₀ contra *Escherichia coli*. Otro estudio realizado por Ophoril y colaboradores (2010) reportan que el extracto etanólico de propóleo nigeriano presenta efecto antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans* con una CMI de 2 µg/mL.

Nuestro país cuenta con diversas variedades de propóleo, sin embargo, son escasos los trabajos orientados al estudio de la actividad biológica del propóleo y de los compuestos relacionados con dichas propiedades.

En nuestro laboratorio se viene trabajando de manera sistemática sobre el análisis de los compuestos presentes en muestras de propóleo obtenido de apiarios localizados en Milpa Alta, México, D.F. y que forman parte del patrimonio de la UNAM. En el presente trabajo se presentan resultados relacionados con la participación de algunos compuestos obtenidos de dichas muestras de propóleo, sobre la capacidad de formación de biocapas de dos bacterias de importancia médica, *Streptococcus mutans* bacteria relacionada con la caries dental y *Escherichia coli* patógeno responsable de infecciones intestinales y de vías urinarias.

Las biocapas son exopolisacáridos secretados por diferentes bacterias cuya expresión es inducida entre otros, por un evento llamado “*Quorum Sensing*”. Una vez que se forma la matriz de polisacáridos las bacterias se pueden adherir a sustratos

bióticos y abióticos, en estas condiciones pueden sobrevivir en condiciones extremas y evitar el efecto de antimicrobianos, anticuerpos y de algunos antisépticos.

El proceso de extracción y fraccionamiento, así como las cromatografías permitieron identificar en la fase de diclorometano la mayor cantidad de compuestos químicos del propóleo.

Para los fines de nuestro estudio y con el propósito de obtener compuestos puros responsables de la actividad en la formación de biocapa, dicha fracción se sometió a cromatografías sucesivas con lo que se logró el aislamiento de los compuestos denominados PAN-C001 y PAN-C002. El compuesto PAN-C001 (Figura 7) se aisló como un sólido amarillo que se caracterizó como acetina mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura (Hu *et al.*, 1994; Figuras 14, 15 y 16).

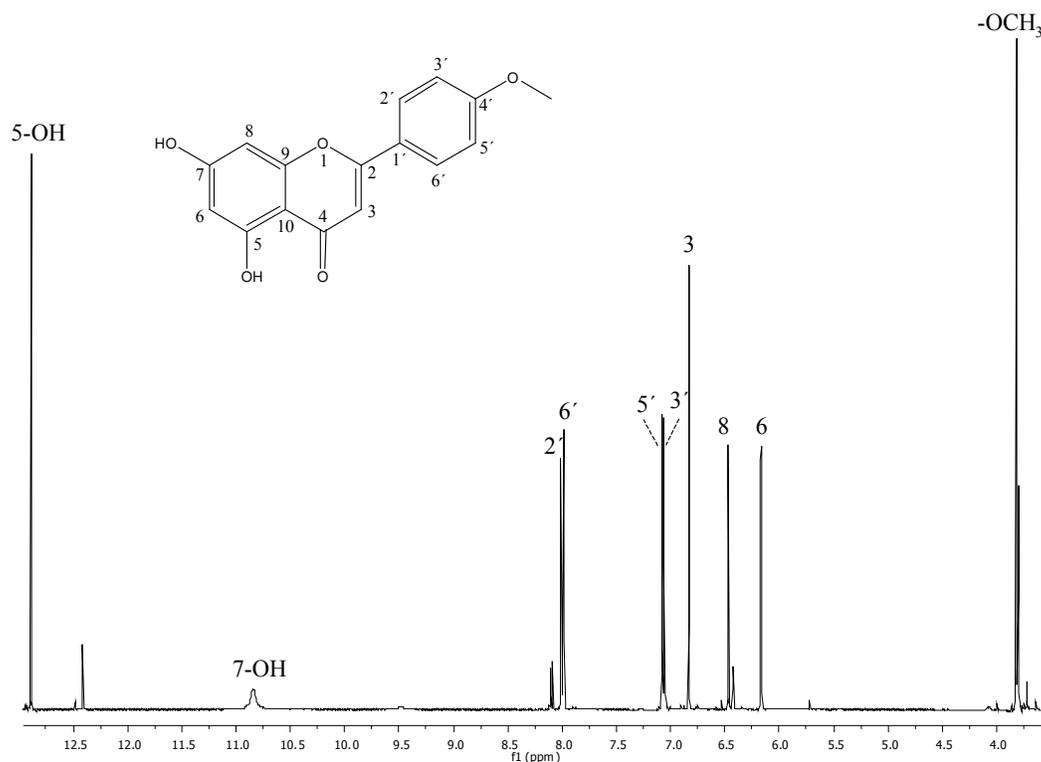


Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN-¹H) de acetina.

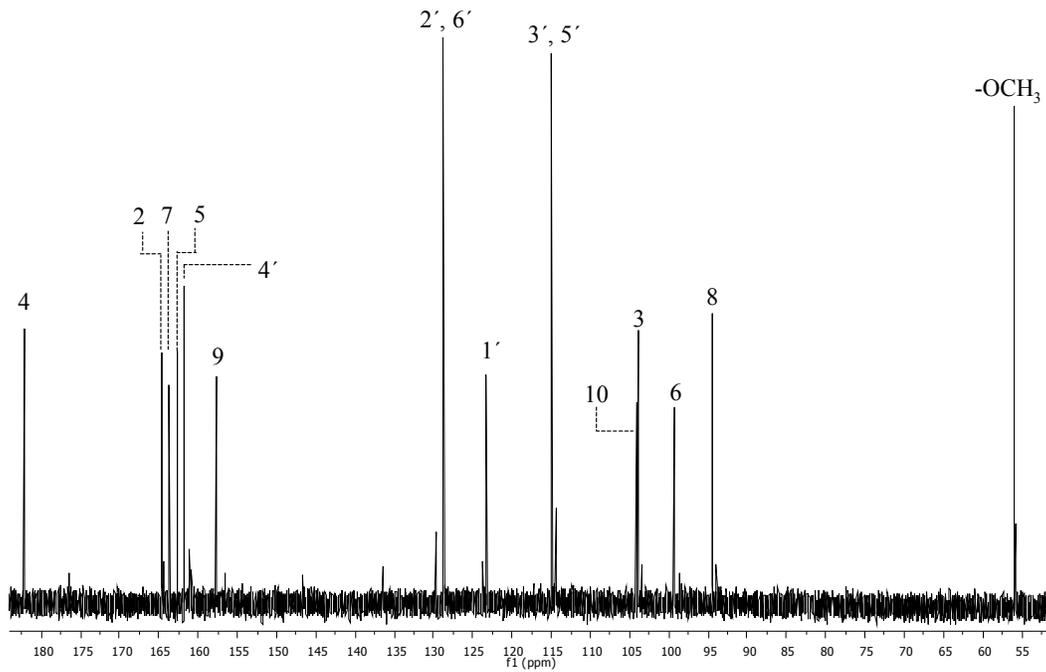


Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³Carbono (RMN-¹³C) de acetina.

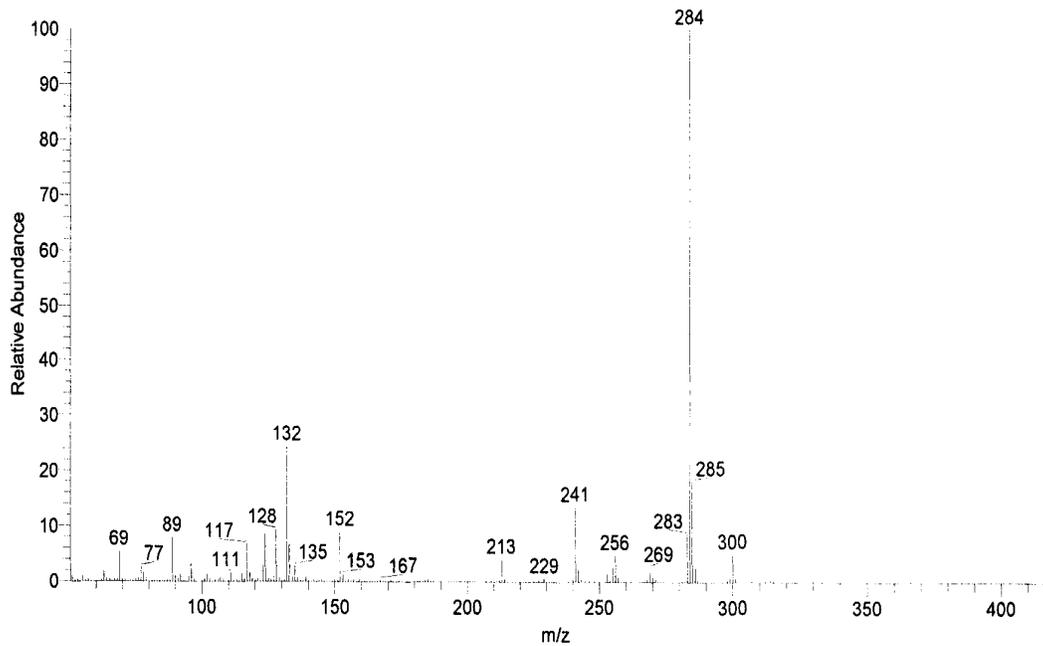
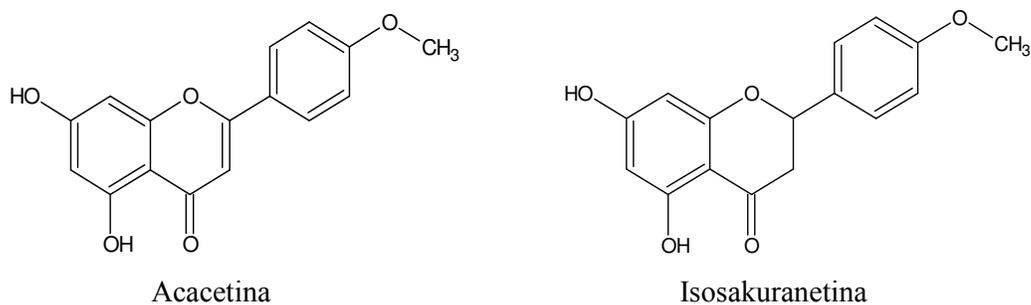


Figura 16. Espectro de masas de acetina.

El compuesto PAN-C002 se aisló como un sólido blanco a partir de la fracción F1.3.4.5.1 y se caracterizó siguiendo una estrategia similar a la del compuesto PAN-C001 como la isosakuranetina (Maruyama *et al.*, 2009, Figura 8).



Figuras 7 y 8. Estructuras químicas de los compuestos aislados.

La presencia de ambos compuestos acacetina e isosakuranetina ha sido reportada en propóleos de otros países, sin embargo, este es el primer reporte de la caracterización de un propóleo de origen mexicano. Para la isosakuranteina se obtuvo un rendimiento 0.15%, concordante con el 0.2% reportado por Maruyama y colaboradores (2009). Con el flavonoides acacetina se obtuvo un mayor rendimiento (0.54%).

El siguiente objetivo de nuestro estudio era evaluar el efecto de los compuestos aislados, sobre la capacidad de *S. mutans* y *E. coli*, para formar biocapas y así definir su empleo para el control de algunas enfermedades.

Un primer paso consistió en realizar la estandarización del ensayo, en ésta se evaluó cuál medio de cultivo era más conveniente, para inducir la formación de biocapa tanto por *S. mutans* como por *E. coli*. Al respecto existe cierta controversia ya que algunos autores proponen el empleo de MEM (Medio Esencial Mínimo) que es un medio utilizado para el cultivo de células y otros sugieren el empleo de BHI (Infusión Cerebro Corazón). Los resultados obtenidos en esta etapa del estudio mostraron que *S. mutans* formaba la biocapa (exopolisacárido) indistintamente con ambos medios de cultivo, sin embargo, los resultados al analizar las lecturas de D.O. fueron de mayor intensidad cuando las bacterias se incubaron en BHI (Figura 8a). Con respecto al mismo ensayo con *E. coli* se observó una gran diferencia en la producción de biocapa utilizando los medios de cultivo referidos y al igual que en el caso anterior una mayor producción con el medio BHI (Figura 8b).

En el ensayo se evaluó además el tiempo óptimo en la expresión de biocapa, en el caso de *S. mutans* se observó que independientemente del medio de cultivo (BHI o D-MEM), la formación de biocapa se presentaba entre las 24 y 48 horas, aunque, los

resultados con esta bacteria fueron considerados como pobre formadora de biocapas (Figura 6a). Para descartar que la capacidad de formación de biocapa, pudiera estar relacionada con la cepa de *S. mutans* con la que se estaba trabajando, se decidió probar otra cepa obtenida del cultivo original que se tenía guardado en congelación. Los resultados obtenidos con este nuevo cultivo resultaron similares a los previos, este hecho nos condujo a considerar que nuestros cultivos de *S. mutans* no eran buenos formadores de biocapas. Rukayadi y su equipo (1997) trabajaron con biocapas de *S. mutans* y proponen acondicionar las placas en las cuales las biocapas se desarrollan utilizando saliva artificial con 1% (p/v) de mucina gástrica de cerdo e incubándolas por 2 horas a temperatura ambiente con ligera agitación. Ésta u otras condiciones podrían ser probadas para incrementar la producción de biocapa mono especie de *S. mutans*. Ésta podría ser la explicación de nuestros resultados, por lo que se ha procedido a solicitar el compuesto para posteriormente evaluar las cepas antes referidas.

En el caso de *E. coli* al igual que con *S. mutans*, se identificó que el tiempo óptimo para la obtención de biocapa fueron las 48 horas con el medio BHI, sin embargo, la formación de biocapa fue varias veces mayor que lo obtenido con *S. mutans*, por lo que esta bacteria se caracterizó como una excelente formadora de biocapa de acuerdo a lo propuesto por Koreňová *et al.* (2008) utilizando la técnica de tinción con cristal violeta.

Una vez estandarizado el método, se procedió a evaluar si el propóleo tenía efecto sobre la formación de biocapa de los microorganismos en estudio. El ensayo de inhibición de formación de biocapa se realizó por duplicado en dos ensayos independientes, para el tratamiento estadístico se decidió eliminar el valor más alto y el más bajo con el propósito de dar mayor consistencia en nuestros resultados.

Como se hizo referencia en el apartado de métodos se utilizaron dos variantes, una era agregar el propóleo al mismo tiempo que las bacterias y la otra colocar el propóleo 20 minutos antes de adicionar las bacterias. Dicha propuesta se realizó considerando que la gente consume el propóleo antes de infectarse y que éste probablemente se va depositando en la cavidad bucal o en el intestino, es decir, se va “incubando”. Las variantes propuestas además consideran que el propóleo podrá ser un material vegetal, con el cual se podrán pre-tratar dispositivos médicos para evitar su colonización. En nuestro estudio se utilizaron como controles adicionales los disolventes utilizados para la extracción de los compuestos del propóleo, lo anterior para evaluar si el efecto de inhibición o retención del cristal violeta observado, pudiera estar relacionado

con dichos compuestos. Los resultados mostraron que no tienen ningún efecto, por lo que nuestras observaciones corresponden exclusivamente al efecto inducido por el propóleo y los compuestos que lo componen.

Un estudio previo con acetina reportó que una concentración mayor a 500 µg/mL posee actividad antimicrobiana contra *S. mutans* (Koo *et al.*, 2002). Los resultados en nuestro estudio mostraron que el propóleo incrementó la formación de biocapa de *S. mutans* (Figura 9). Desconocemos los factores que influyeron en este resultado, una de las explicaciones podría ser la baja concentración de acetina en el propóleo contrario a la dosis empleada por Koo y su equipo (2002), que fue muchas veces mayor. Aunque no tenemos información al respecto, es factible la presencia de algún compuesto estimulante en el propóleo para la formación de biocapas de *S. mutans*. Al respecto también es importante evaluar si el propóleo activa la expresión de genes responsables de la formación de biocapa, después de todo, sabemos que la formación de dicha estructura se ve afectada por las condiciones de crecimiento de la bacteria (planctónica o biocapa) y por condiciones ambientales (pH, fuentes de carbono, disponibilidad de carbohidratos) (Burne *et al.*, 1997). Para probar lo anterior, inicialmente sería conveniente desarrollar el modelo de biocapas de *S. mutans* utilizando la mucina (Rukayadi *et al.*, 1997) y posteriormente repetir nuestros ensayos de inhibición.

Los ensayos en los que se evaluó la actividad del propóleo y sus compuestos (acetina e isosakuranetina) con *E. coli* fueron satisfactorios, ya que tanto el extracto como los compuestos aislados inhibieron la formación de biocapa (Figura 10). Con el extracto etanólico de propóleo se observó inhibición de biocapa tanto con la concentración de 0.2 mg/mL (por encima del 90%), como con las más bajas 0.02 mg/mL (64% - 48%) y de 0.002 mg/mL (40 y 14 %). Es importante destacar que al obtener inhibición a una concentración tan baja como es 0.002 mg/mL, hace inferencia sobre que el extracto obtenido tiene diferentes compuestos que le confieren esta propiedad inhibidora de formación de biocapa.

Los resultados con los flavonoides aislados mostraron con la acetina inhibición de formación de biocapa mayor al 70%. Con este compuesto la preincubación favoreció la inhibición, aunque, no distante al porcentaje de inhibición que se obtuvo sin la incubación previa del compuesto. Este resultado permite inferir que la acetina es probablemente uno de los compuestos del propóleo involucrado en la inhibición de la

formación de biocapa ya que tiene una gran actividad a concentraciones mínimas como es 0.002 mg/mL.

La acacetina, además de ser aislada de diversas muestras de propóleo, también se ha encontrado en hojas de Jome (*Eupatorium angustifolium*) (Espitia de Pérez *et al.*, 1984.), las flores de Rama de la Cruz (*Chromolaena odorata*) (Suksamrarn *et al.*, 2004) y de las flores del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) (Hu *et al.* 1994). Los estudios con la acetina, muestran que posee propiedades antibacterianas contra *Mycobacterium tuberculosis* (CMI= 704.2 μ M) (Suksamrarn *et al.*, 2004), actividad moderada contra células de cáncer de pulmón NCI-H187 (CMI= 24.6 μ M) (Suksamrarn *et al.*, 2004), buena actividad anti-VIH con relativa baja toxicidad (Hu, C. *et al.* 1994), actividad contra células de cáncer de próstata LNCaP (andrógeno- dependientes) mostrando inhibición del 30-63% con dosis de 25 μ M, del 45-7% con 50 μ M y del 50-80% con 100 μ M, resultados similares fueron obtenidos para células DU145 (andrógeno-independientes) (Singh *et al.*, 2005), induce apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7 con una CI_{50} de 26.4 \pm 0.7 μ M (Shim *et al.*, 2007), a una dosis de 25-100 mg/kg administrada oralmente a ratones reduce la fragilidad capilar y a dosis de 50-100 mg/kg reduce la permeabilidad vascular (Raj Narayana *et al.*, 2001), también se ha visto que tiene actividad antiinflamatoria, de ahí que sea utilizado en la medicina tradicional para afecciones de la tos y garganta (Li *et al.*, 2010).

El aislamiento de este flavonoide y su evaluación biológica, presentados en este trabajo son elementos de gran relevancia, ya que hasta el momento este es el primer trabajo en el que se muestra su efecto de interferencia con la colonización de bacterias.

Con relación al flavonoide isosakuranetina en el ensayo de inhibición de formación de biocapa de *E. coli* los resultados mostraron diferencias en los ensayos de incubación previa de la placa con el compuesto y en el que se adiciona al mismo tiempo que la bacteria. Los resultados a la concentración de 0.2 mg/mL al incubar el compuesto mostró menor inhibición (27%) que sin la incubación previa (90%). La diferencia entre ambos tratamientos son exagerados por lo que se podría pensar en algún error experimental o bien, que a concentraciones altas la isosakuranetina previamente incubada favorece la formación de biocapa ya que las bacterias podrían aglomerarse en dicha resina al igual que sucedió con la cepa anteriormente probada (*S. mutans*) contra el extracto de propóleo. De igual manera sucede con la concentración de 0.02 mg/mL se observó mayor inhibición sin la preincubación de la isosakuranetina que incubando, aunque la diferencia no es tan grande (18%) como en la concentración pasada. Estos

datos sugieren que la preincubación no es la condición óptima para que este compuesto se utilice para inhibir la formación de biocapas. Por último en la concentración de 0.002 mg/mL observamos lo contrario, es decir, que la preincubación favorece los resultados de porcentaje de inhibición. Ante este último resultado se puede considerar un efecto dual dependiente de la concentración del compuesto.

Aunque se observó mayor eficacia y consistencia con la acacetina, la isosakuranetina también muestra porcentajes importantes de inhibición de formación de biocapa.

La isosakuranetina es un compuesto que ha sido identificado en extractos etanólicos de propóleos brasileños (Park *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2007). También ha sido aislado de *Terminalia fagifolia* (Combretaceae) mejor conocido como “cachiporra de los gentiles” (Garcez *et al.*, 2006), de jugos *Citrus* (Gattuso *et al.*, 2007) y de *Baccharis* (Compositae) conocido como “romerillo” (Abad *et al.*, 2007). Algunos estudios demuestran que posee la capacidad de reducir la presión sanguínea sistólica (Maruyama *et al.*, 2009), actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de pulmón: Hep₂ y H₂₉₂ (IC₅₀ mayor a 50 µg/ mL para ambos casos) (Garcez *et al.*, 2006) y actividad antimicrobiana contra *Cryptococcus neoformans* (CMI = 40 µg/ mL) (Da Silva *et al.*, 2008), *Plasmodium falciparum* (CI₅₀ =45.56 µM) (Ongkana 2003) y *Streptococcus sobrinus* (CMI = 250 µg/ mL y CBI mayor a 500 µg/ mL) (Koo *et al.*, 2002).

Koo y su equipo (2002) descubrieron que la isosakuranetina también posee actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* (CMI = 500 µg/ mL y CBI mayor a 500 µg/ mL), lo que traería como consecuencia una disminución de la biocapa, sin embargo como ya se mencionó anteriormente, en este estudio esta tendencia no se observó. La pequeña concentración de este flavonoide presente en el extracto de propóleo utilizado podría ser la explicación por la cual hubo un aumento en la formación de biocapa.

Se utilizó la isosakuranetina como control-flavonoide en un estudio donde se propone la nanofiltración como método de separación de flavonoides y compuestos fenólicos del propóleo a partir de un extracto etanólico y uno acuoso (Mello *et al.*, 2010). Con lo mencionado anteriormente se puede apreciar la relevancia de haber aislado un flavonoide relacionado con el presente estudio y evaluarlo en un ensayo biológico, en el cual se obtuvieron resultados favorecedores a ciertas condiciones.

Es prudente pensar que la isosakuranetina y la acacetina pudieran tener una actividad similar en la inhibición de la formación de biocapa de *E. coli* puesto que

poseen un gran parecido estructural, sin embargo con los resultados obtenidos podemos observar que la acacetina posee mayor actividad inhibitoria que la isosakuranetina, actividad probablemente conferida por dicha diferencia estructural (Figuras 7 y 8).

A los resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de formación de biocapa de *E. coli* se les realizaron dos pruebas estadísticas: la desviación estándar la cual sirve para saber que tan alejados de la media están los datos y la prueba p la cual sirve para saber si los datos poseen diferencia significativa con base al control establecido, en este caso la biocapa formada por el microorganismo con medio de cultivo solamente. Cuando el valor $p < 0.05$ indica que existe una diferencia considerable en la formación de biocapa con el compuesto a prueba y la desarrollada con el control.

En el Cuadro 10 se aprecian los valores de p obtenidos en este análisis estadístico. Se observa que en su mayoría existe una diferencia significativa entre los datos obtenidos principalmente cuando los compuestos no eran incubados, aún así, los resultados obtenidos cuando son incubados son en general satisfactorios. Por lo anterior, podemos decir que el uso habitual del propóleo o su uso para tratar dispositivos médicos podría funcionar para disminuir la colonización de *Escherichia coli*, sin embargo, tendría que hacerse un estudio para evaluar la influencia de las enzimas y el pH del tracto gastrointestinal sobre los compuestos químicos presentes en el propóleo con la finalidad de evaluar si dichos compuestos pueden descomponerse y/o perder su actividad biológica.

Una vez obtenidos los resultados que indican que tanto el propóleo como sus derivados ayudan al decremento de la formación de biocapa, nos preguntamos si dicho decremento se debía a una actividad antimicrobiana por parte del propóleo tal como lo expresó García Bernal y su equipo (2007). Esto dio paso a la evaluación del propóleo y los flavonoides aislados sobre el crecimiento de *E. coli*.

Se utilizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos, para determinar la CMI de los compuestos utilizados. Un hecho al respecto fue la precipitación de algunos de los compuestos, principalmente de los antibióticos, lo que dificultaba las lecturas de resultados. Para evitar este inconveniente se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC), por la técnica por goteo sobre agar BHI. Los resultados obtenidos mostraron que incluso a la concentración más alta (1mg/mL) los compuestos evaluados no impedían el crecimiento de *E. coli*, por lo que el decremento de la formación de biocapa no está relacionado con una actividad antimicrobiana.



Discusión

Factores genéticos, como sugerimos para el caso de *Streptococcus mutans*, también pueden ser los responsables de una actividad inhibitoria en la formación de biocapa. Habría que realizar estudios para ambas bacterias, para encontrar el mecanismo de acción que sigue el propóleo.

8. CONCLUSIONES

El proceso de extracción mediante maceración con etanol de una muestra de propóleo colectado en la zona rural de la Ciudad de México permitió la obtención de un extracto activo.

La estrategia biodirigida utilizada permitió el aislamiento y la purificación de dos flavonoides conocidos, que fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como la acacetina y la isosakuranetina. Estos compuestos influyen en la formación e inhibición de biocapas producidas por microorganismos presentes en la flora de la cavidad oral (*S. mutans*) y del tracto gastrointestinal (*E. coli*).

El flavonoide acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona) produce un efecto inhibitorio de la formación de la biocapa mono especie por *Escherichia coli* y presenta una aparente actividad promotora sobre la formación de la biocapa mono especie por la bacteria *Streptococcus mutans*. La actividad obtenida para la isosakuranetina (4'-metoxi-5,7-dihidroxi-flavanona) fue similar.

El presente estudio químico y biológico representa una aportación original al conocimiento de los propóleos mexicanos.

9. PERSPECTIVAS

Estudiar y determinar el mecanismo de acción mediante el cual el propóleo y los compuestos aislados inhiben la formación de biocapa mono especie producida por *Escherichia coli*.

Optimizar las condiciones para la formación de biocapa mono especie producida por *Streptococcus mutans*.

Determinar la farmacodinamia del propóleo, acacetina e isosakuranetina para determinar que éstos no pierdan su actividad cuando entran al tracto gastrointestinal.

Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones que no se utilizaron en el presente proyecto para aislar otros compuestos presentes en el propóleo.

Desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para separar los componentes minoritarios presentes en la muestra de propóleo.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abad, M. J., Bermejo, P. Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc.* **2007**, 7, 76-96.

Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis, *J. Ethnopharmacol.* **2007**, 113, 278-283.

Ataç-Uzel; Kadriye Sorkun; Özant-Önçağ; Dilşah Çoğulu; Ömür Gençay; Bekir Salih. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol. Res.* **2005**, 160, 189-195.

Avelino, F., Saldaña, Z., Islam, S., Monteiro-Neto, V., Dall'Agnol, M., Eslava, C.E., Girón, J.A. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells, *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.02.002.

Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 114-117.

Bankova, V. S., De Castro, S. L., Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, **2000**, 31, 3-15.

Bankova, V.. Recent trends and important developments in propolis research, *eCAM*, **2005**, 2, 29-32.

Basim, E., Basim, H., Özcan, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *J. Food Eng.* **2006**, 77, 992-996.

Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2010.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html>
Revisada el día 3 de septiembre de 2010.

Brooks, Geo F. (*et al.*), *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, 19ª edición traducida de la 24ª edición en inglés, México, Manual Moderno, 2008.

Burdok, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*, 347-363.

Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hanse, L. H., Sørensen, S. J., Kjellerberg, S.. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3916-3923.

Burne, R.A., Chen, Y.M., Penders, J.E.C., Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilm *in vivo*, *Adv. Dent. Res.* **1997**, *11*, 100-109.

Carpentier, B., Cerf, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, *75*, 499-511.

Castaldo, S. y Capasso, F. Propolis, and old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* **2002**, *73*, S1-S6.

Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J.P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., Rodríguez-Landa, J.F. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas, *Rev. Biomed.* **2004**, *15*, 123-136.

Da Silva Filho, A.A., de Sousa, J.P.B., Soares, S., Furtado, N.A.J.C., Andrade e Silva, M.L., Cunha, W.R., Gregório, L.E., Dhammika Nanayakkara, N.P, Bastos, J.K. *Naturfosh*, **2008**, *63*, 40-46.

De la Maza, L. M. *et al.* *Color atlas of medical bacteriology*, U.S.A., ASM Press, 2004.

Donlan, R. M. Biofilms and device-associated infections, *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 277-281.

Donlan, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 881-890.

Donlan, R.M., Costerton, W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 167-193.

Dreeszen, P.H. *Biofilm: The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinking Water Systems*, 2ª edición, Edstrom Industries Inc., June 2003.

Duarte, S., Rosalen, P.L., Hayacibara, M., F., Cury, J.A., Bowen, W.H., Marquis, R.E., Rehder, V.L.G., Sartoratto, A., Ikegaki, M., Koo, H. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats, *Arch. Oral. Biol.* **2006**, *51*, 15-22.

Dunne Jr., W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?, *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 155-166.

Echeverría-Zarate, J., Sarmiento, E., Osoreo-Plenge, F., Infección del tracto urinario y manejo antibiótico, *Acta Med. Per.* **2006**, *23*, 26-31.

Espitia de Pérez, C., Céspedes, A.M., Aislamiento de 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona y 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona de eupatorium angustifolium (h.b.k.) spreng (compositae), *Revista Colombiana de Química*, **1984**, *13*, 49-56.

Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. El própolis y la salud humana, *Ars. Pharmaceutica*, **2004**, *45*, 21-43.

Garcez, F.R., Garcez, W.S., Sntana, A.L.B.D., Alves, M.M., Matos, M.F.C., Scaliante, A.M. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae), *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1223-1228.

García Bernal, M., Medina Marrero, R., Hidalgo Yanes, P.I., Delgado Lasval, M.S., Truffin Truffin E., Gomez Marrero, R. Actividad *in Vitro* del propóleos frente a patógenos bacterianos aislados de infecciones humanas, *Lat. Am. J. Pharm.* **2007**, *26*, 100-102.

Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 390-399.

Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., Caristi, C. Flavonoid composition of *Citrus* juices. *Molecules*, **2007**, *12*, 1641-1673.

Gillespie, Stephen H. y Hawkey, Peter M. *Principles and practice of clinical bacteriology*, 2° edición, Inglaterra, John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

Hamada, S., Slade, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol. Rev.* **1980**, *44*, 331-384.

Hu, C., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R.E., Cheng, Y., Lee, K. Anti-AIDS agents, 10. Acacetin- 7- O- β - D- galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 42-51.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., Karathanos, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus, *Food Chem.* **2009**, *116*, 452-461.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123-140.

Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1302-1309.

Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Vacca-Smith, A.M., Bowe, W.H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 782-789.

Koreňová, J., Lopašovská, J., Kuchta, T. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies, *J. Food Nutr. Res.* **2008**, *47*, 100-104.

Li, G.-R., Wang, H.-B., Qin, G.-W., Jin, M.-W., Tang, Q., Sun, H.-S., Du, X.-L., Deng, X.-L., Zhang, X.-H., Chen, J.-B., Chen, L., Xu, X.-H., Cheng, L.-C., Chiu, S.-W., Tse, H.-F., Vanhoutte, P.M., Lau, C.-P. Acacetin, a natural flavone, selectively inhibits human atrial repolarization potassium currents and prevents atrial fibrillation in dogs, *Circulation*, **2008**, *117*, 2449-2457.

Li, H., Kapur, A., Yang, J.X., Srivastava, S., McLeod, D.G., Paredes-Guzman, J.F., Dausch, A., Park, Y.K., Rhim, J.S. Antiproliferation of human prostate cancer cells by atherolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin, *Int. J. Oncol.* **2007**, *31*, 601-607.

Madigan, M.T., Martinko J.M. y Parker J. *Brock Biología de los Microorganismos*, 10^a edición, Madrid, Pearson Educación, 2004.

Marcucci, M.A. Propiedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da propolis, *Química nova*, **1996**, *19*, 529-536.

Marcucci, M.C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, **1995**, *26*, 83-99.

Maruyama, H., Sumitou, Y., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from Brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats, *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 1244-1250.

Mitscher, L. A., Pillai, S., Shankel, D. Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medicinal products. *J. Food Drug Anal.* **2000**, *8*, 229-234.

Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamedi, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N., Ostad, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis, *Food Chem.* **2007**, *103*, 1097-1103.

Niraldo, P. Avaliação da actividade antiinflamatória do extracto padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin C; Tesis de Doctorado, Florianópolis, Universidad Federal de Santa Catarina, 137 p. Brasil: 2005.

Ongkana, R., Phytochemistry and anti-malarial activity of *Eupatorium odoratum* L. Degree of Master of Science, Mahidol, Mahidol University, 127 pp. Thailand: 2003.

Ophori, E.A.; Eriagbonye, B.N., Ugboadaga, P. Antimicrobial activity of propolis against *Streptococcus mutans*, *Afr.J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 4966-4969.

Osunda, L., Tapia M.E., Aguilar A. *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales*, España, Universitat Barcelona, 2005.

Park, Y. K., Koo, M.H., Abreu, J.A.S, Ikegaki, M., Cury, J.A., Rosalen, P.L. Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. *Current Microbiology*, **1998**, *36*, 24-28.

Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., Bankova, V. S. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis, *Phytochemistry*, **2009**, *70*, 1262-1271.

Rodríguez-Angeles, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Salud Pública México*, **2002**, *44*, 464-475.

Raj Narayana, K., Sripal Reddy, M., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potencial, *J. Pharmacol.* **2001**, *33*, 2-16.

Rukayadi, Y., Hwang, J.-K. *In vitro* activity of xanthorrhizol against *Streptococcus mutans* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *42*, 400-404.

Sandoe, J.A.T., Witherden, I.R., Cove, J.H., Heritage, J., Wilcox, M.H. Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-device-related infection potential *in vivo*, *J. Med. Microbiol.* **2003**, *52*, 547-550.

Sforcin, J. M., Fernandez Jr., A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C., Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 243-249.

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

Stauder, M., Papetti, A., Daglia, M., Vezzulli, L., Gazzani, G., Varaldo, P. E., Pruzzo, C. Inhibitory activity by barley coffee components towards *Streptococcus mutans* biofilm, *Curr. Microbiol.* **2010**, DOI 10.1007/s00284-010-9630-5.

Stepanonić, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., A modified microtiter-plate for quantification of staphylococcal biofilm formation, *J. Microbiol. Methods.* **2000**, *40*, 175-179.

Suksamram, A., Chotipong, A., Suavansri, T., Boongird, S., Timsuksai, P., Vimuttipong, S., Chuaynugul, S. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *5*, 507-511.

Villarroel, E., Navarro, P., Ramos, R., Andrade, E., Bolívar, A., Marcano, J. *Escherichia coli* identificadas en pacientes con infecciones urinarias: sensibilidad antimicrobiana, *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **2002**, *22*, 18-21.

Walgrave, S. E., Warshaw, E. M., Glesne, L. A. Allergic contact dermatitis from propolis, *Dermatitis*, **2005**, *16*, 209-215.

Waltnick, P., Kolter, R. Biofilm, city of microbes, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2675-2679.

Wawer, I., Zielinska, A. ¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 374-380.

Yoshida, A., Ansai, T., Takehara, T., Kuramitsu, H. K. LuxS-Based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2372-2380.