



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA ZONA Y LA ÉPOCA DE COLECTA SOBRE LA  
PRODUCCIÓN DE MARCADORES QUÍMICOS EN PROPÓLEOS  
DE LA REGIÓN DEL ALTIPLANO MEXICANO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**WILBER REYNA GARDUÑO**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Prof.: MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Prof.: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Prof.: PEDRO SALVADOR VALADEZ ESLAVA</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Prof.: NATIVIDAD GARCÍA ESCAMILLA</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Prof.: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO</b>

### **Sitio donde se desarrolló el proyecto:**

Laboratorio **113**, Conjunto E

Facultad de Química, UNAM

### **Asesor**

---

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

### **Sustentante**

---

Wilber Reyna Garduño

---

**CONTENIDO**

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
2.1 Propóleo	3
2.2 Características físicas del propóleo	3
2.3 Obtención del propóleo	4
2.4 Propiedades farmacológicas de los propóleos	5
2.4.1 Actividad antibacteriana	5
2.4.2 Actividad antimicótica	7
2.4.3 Actividad antiviral	7
2.4.4 Actividad antiparasitaria	8
2.4.5 Actividad antiinflamatoria, cicatrizante y anestésica	8
2.4.6 Actividad antioxidante	9
2.4.7 Actividad inmunomoduladora	9
2.5 Uso en bebidas y alimentos	10
2.5.1 Nutracéuticos	10
2.6 Composición química	11
2.7 Flavonoides	16
2.7.1 Distribución en la naturaleza de los flavonoides	16
2.7.2 Ensayos de identificación de flavonoides	16
2.7.2.1 Cromatografía en capa fina	18
2.7.2.2 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	18
2.8 Caracterización de los propóleos	19
2.9 Patrones geográficos de los tipos de propóleos	20
2.10 Estudios realizados en México	22
2.11 Recolección del propóleo	24
2.11.1 Raspado	24
2.11.2 Rejillas	24
2.11.3 Placas plásticas	24
2.11.4 Mallas	25
<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	
3.1 Material vegetal	26
3.2 Análisis por cromatografía en capa fina	26
3.3 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia	27
3.4 Preparación de los extractos de trabajo	27
3.5 Preparación de los estándares	28
3.6 Cuantificación de los flavonoides	28
3.6.1 Adecuabilidad del sistema	28
3.6.2 Curvas de calibración	29
3.7 Diseño factorial $2^3$	29
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	30
4.1 Diseño factorial $2^3$	31
4.2 Identificación de los compuestos marcadores	38
4.3 Cuantificación de los compuestos marcadores	48
<b>5. CONCLUSIONES</b>	58
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	59
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	60
<b>8. ANEXOS</b>	66



8.1 ANEXO I	66
8.2 ANEXO II	68
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE GRÁFICAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición básica de los propóleos	11
<b>Tabla 2.</b> Compuestos químicos identificados en propóleos	12
<b>Tabla 3.</b> Tipos de propóleos de acuerdo con su fuente natural	21
<b>Tabla 4.</b> Ubicación geográfica de los apiarios	26
<b>Tabla 5.</b> Factores y niveles seleccionados para el diseño experimental 2 <sup>3</sup>	29
<b>Tabla 6.</b> Resultados obtenidos cuantificando pinocembrina	33
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza del modelo factorial de la pinocembrina	33
<b>Tabla 8.</b> Modelo factorial, gráfica de contornos y gráfica de interacción para la acacetina	37
<b>Tabla 9.</b> Modelo factorial, gráfica de contornos y gráfica de interacción para la 4',7-dimetilnaringenina	37
<b>Tabla 10.</b> Modelo factorial, gráfica de contornos y gráfica de interacción para la 4',7-dimetilapigenina	38
<b>Tabla 11.</b> Tiempos de retención de los marcadores químicos	39
<b>Tabla 12.</b> Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la pinocembrina	49
<b>Tabla 13.</b> Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la acacetina	50
<b>Tabla 14.</b> Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la 4',7-dimetilnaringenina	51
<b>Tabla 15.</b> Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la 4',7-dimetilapigenina	52
<b>Tabla 16.</b> Cuantificación de pinocembrina	53
<b>Tabla 17.</b> Cuantificación de acacetina	54
<b>Tabla 18.</b> Cuantificación de 4',7-dimetilnaringenina	55
<b>Tabla 19.</b> Cuantificación de 4',7-dimetilapigenina	56
<b>Tabla 20.</b> Análisis de varianza del modelo factorial de la acacetina	66
<b>Tabla 21.</b> Análisis de varianza del modelo factorial de la 4',7-dimetilnaringenina	66
<b>Tabla 22.</b> Análisis de varianza del modelo factorial de la 4',7-dimetilapigenina	67

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

<b>Figura 1.</b>	Propóleo proveniente de la zona del altiplano mexicano	3
<b>Figura 2.</b>	Abeja recolectando resinas de árboles	4
<b>Figura 3.</b>	Principales metabolitos identificados en la zona del altiplano mexicano	23
<b>Figura 4.</b>	Métodos de recolección de propóleos	25
<b>Figura 5.</b>	Representación geométrica del diseño 2 <sup>3</sup> para el experimento con pinocembrina	32
<b>Figura 6.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla granizera del apiario “El búho”	39
<b>Figura 7.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “El búho”	40
<b>Figura 8.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Nico”	40
<b>Figura 9.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla granizera del apiario “Nico”	40
<b>Figura 10.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Panteón”	41
<b>Figura 11.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla granizera del apiario “Panteón”	41
<b>Figura 12.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Trojes”	41
<b>Figura 13.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla granizera del apiario “Trojes”	42
<b>Figura 14.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla granizera del apiario “Acuexcomatl”	42
<b>Figura 15.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Acuexcomatl”	42
<b>Figura 16.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “El Búho”	43
<b>Figura 17.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla sombra del apiario “El Búho”	43
<b>Figura 18.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “Nico”	44
<b>Figura 19.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla sombra del apiario “Nico”	44
<b>Figura 20.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “Panteón”	44
<b>Figura 21.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla sombra del apiario “Panteón”	45
<b>Figura 22.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla sombra del apiario “Trojes”	45
<b>Figura 23.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla sombra del apiario “Trojes”	45
<b>Figura 24.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “Acuexcomatl”	46
<b>Figura 25.</b>	Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla sombra del apiario “Acuexcomatl”	46
<b>Figura 26.</b>	Cromatoplaca del extracto de propóleo y compuestos identificados	47

**ÍNDICE DE GRÁFICAS**

		Página
<b>Gráfica 1.</b>	Superficie de respuesta para concentración de pinocembrina, el factor mes de colecta se ha fijado en su nivel inferior	34
<b>Gráfica 2.</b>	Contornos de respuesta para la concentración de pinocembrina; fijando el factor malla	35
<b>Gráfica 3.</b>	Probabilidad Normal para concentración de pinocembrina.	35
<b>Gráfica 4.</b>	Interacciones para la concentración de pinocembrina.	36
<b>Gráfica 5.</b>	Relación lineal entre las variables para la pinocembrina	49
<b>Gráfica 6.</b>	Relación lineal entre las variables para la acacetina.	50
<b>Gráfica 7.</b>	Relación lineal entre las variables para la 4",7-dimetilnaringenina.	51
<b>Gráfica 8.</b>	Relación lineal entre las variables para la 4',7-dimetilapigenina.	52
<b>Gráfica 9.</b>	Relación entre la concentración de pinocembrina ( $\mu\text{g/mL}$ ) y recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).	53
<b>Gráfica 10.</b>	Relación entre la concentración de acacetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) y recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).	54
<b>Gráfica 11.</b>	Relación entre la concentración de 4',7-dimetilnaringenina ( $\mu\text{g/mL}$ ) y recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).	55
<b>Gráfica 12.</b>	Relación entre la concentración de 4',7-dimetilapigenina ( $\mu\text{g/mL}$ ) Vs. Recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).	56



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
MCI	Concentración Mínima Inhibitoria
MCB	Concentración Mínima Bactericida
µg/mL	Microgramo por mililitro
TLR	Toll-Like Receptor
LPS	Lipopolisacáridos
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferon-gamma
CoA	Coenzima A
UV	Ultravioleta
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
AlCl <sub>3</sub>	Cloruro de Aluminio
P/V	Relación peso-volumen
mm	Milímetro
µm	Micrómetro
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a detector de arreglo de diodos
LC-MS	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas
LC-MS-MS	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas-masas
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
G	Malla Granizera
S	Malla Sombra
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH	Diclorometano/ Metanol
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
MeOH	Metanol
nm	Nanómetro
AcOEt	Acetato de etilo
mg	Miligramo
A	Factor apiario
B	Factor malla
C	Factor mes de colecta
tR	Tiempo de retención



## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años con el aumento del papel de la Medicina Preventiva, se comprende la importancia de los productos naturales y se promueve su consumo. Lo expuesto viene contribuyendo para que la apiterapia, la fitoterapia, y otras llamadas medicinas "naturales" ganen espacio dentro de la "medicina convencional".

El interés del hombre por las colmenas se remota miles de años atrás. La apicultura es una actividad de creciente importancia en el mundo, debido a la gran variedad de productos naturales que ofrece y a la fuerte tendencia del hombre a consumir productos mínimamente procesados. El cuidado y el aprovechamiento de los productos de las abejas en México, se remota a épocas prehispánicas, donde las diferentes culturas existentes tales como los Mayas, Tarascos, Lacandones, Olmecas y Popolucas cultivaban a las abejas sin aguijón (Meliponinos), con fines alimenticios, medicinales y religiosos (Echazarreta y Quezada-Euan, 2002).

Si bien la miel es el producto apícola de más antiguo uso, existen otros de gran interés del hombre como lo son: la cera, polen, jalea real, veneno y propóleos. De este último, se ha incrementado la demanda en el mercado mundial, por las características antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias y cicatrizantes, entre otras que este producto natural posee. Diversos investigadores y apicultores se han enfocado a la tarea de estudiar y validar el propóleo, en la producción de fórmulas medicamentosas, nutritivas y cosméticas, logrando obtener preparados especiales de precisa dosificación como lo son: tinturas, extractos, cremas, ungüentos, cápsulas y pastillas, entre otras formas de productos terminados.

El mayor problema que existe actualmente, a pesar de contar con grandes avances tecnológicos que permiten conocer la composición química de los propóleos, es la variabilidad sorprendente de su composición química





dependiendo del sitio de colecta, de los diferentes ecosistemas, de sus fuentes botánicas, así como de su método de colecta ((Papotti, 2012)

El conocimiento de la composición química de los propóleos es de vital importancia para correlacionarla con las actividades biológicas que aportan los mismos. Por otra parte, permite controlar la calidad de las formas farmacéuticas desde un punto de vista químico y determinar las dosis efectivas en las mismas.

El presente trabajo se basa en el estudio de 5 apiarios del Distrito Federal, pertenecientes a la región del altiplano mexicano. Esta región se distingue por tener mieles ámbar y ámbar clara, (consistencia tipo mantequilla), que por su presentación tiene mucha demanda en el mercado europeo. Su origen floral es el acahual y la acetilla. Esta región incluye los estados de Tlaxcala, Puebla, Estado de México, Morelos, Guanajuato, Aguascalientes, la parte oriente de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; parte poniente de Hidalgo y Querétaro, la región media de San Luis Potosí, así como el Distrito Federal (Hernández, 2007).

La producción de propóleos en México es muy limitada y de mala calidad, debido a que la mayor parte de su producción está basada en el raspado interno que realiza el productor durante la revisión de sus colmenas, sin embargo, por ser un producto que da alternativas terapéuticas, numerosas investigaciones siguen en estudio para obtener propóleos de calidad.

Con base en estas consideraciones el objetivo primordial de este trabajo reside en evaluar el efecto de la época de colecta, el sitio y el tamaño de malla en la concentración de 4 marcadores químicos (siendo pinocembrina, acacetina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina) en extractos etanólicos de propóleos provenientes de la zona del altiplano mexicano por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 PROPÓLEO.

El propóleo (Figura 1) es un material resinoso recolectado principalmente por las abejas de la especie *Apis mellifera*, a partir de los exudados y los brotes de las plantas. El propóleo (del griego pro= en defensa, y polis= ciudad) es utilizado por las abejas para suavizar las paredes internas, proteger la colonia del medio ambiente y cubrir los cadáveres de los intrusos en el interior de la colmena evitando así su descomposición (Sforcin y Bankova, 2011).

### 2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL PROPÓLEO.

Físicamente, los propóleos son de carácter resinoso, balsámico y gomoso; de consistencia viscosa y color verde pardo, café, rojo o incluso negro; de sabor acre, frecuentemente amargo; de olor agradable y dulce. Cuando se incinera desprende una fragancia de resina aromática (González, 2002). El olor, el color, y la composición de los propóleos no sólo varía de acuerdo con las diferentes fuentes botánicas y el origen geográfico, también debido al método de colecta (Papotti, 2012).



**Figura 1.** Propóleo proveniente de la zona del altiplano mexicano



### 2.3 OBTENCIÓN DE PROPÓLEO.

Las fuentes de obtención de los propóleos, por las abejas, ha sido un tema muy discutido. Muchos autores consideran que estos insectos colectan únicamente las resinas de los árboles ubicados en el entorno de la colmena. No obstante, se ha podido comprobar su capacidad para realizar una selección específica de aquellas resinas que necesitan aunque se encuentren a grandes distancias. Las abejas encargadas de la recolección del propóleo lo hacen durante las horas más cálidas del día (entre las diez y las tres); estas obtienen las resinas que tienden a ser duras y friables en ausencia de calor (Figura 2). Este proceso de recolección se realiza mediante un interesante proceso bioselector. Esto es, sus antenas detectan la fuente vegetal, y enseguida desprenden la resina con sus mandíbulas y la secreción de sus glándulas salivales. Finalmente, maniobran con sus patas hasta colocarla en los cestillos de sus extremidades posteriores. Cuando regresan a la colmena son recibidas en ocasiones por otras abejas, quienes la ayudarán a liberarse del propóleo. Sin embargo, es más común que al penetrar en la colmena se dirijan directamente a la zona donde el propóleo será empleado (González, 2002).



**Figura 2.** Abeja recolectando resinas de árboles.



## 2.4 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS PROPÓLEOS.

El uso del propóleo se encuentra bien documentado desde los tiempos antiguos. Los egipcios se beneficiaron de sus propiedades anti-putrefactantes para embalsar a los muertos. Los médicos griegos y romanos lo utilizaron como agente cicatrizante y antiséptico. Los incas, por su parte, lo emplearon como agente anti-pirético, y en la farmacopea inglesa del siglo XVII, aparece como droga oficial.

Actualmente, continúa siendo un remedio popular y se distribuye en forma pura o combinada con otros productos naturales para la manufactura de cosméticos y alimentos (aditivo). En las últimas décadas los científicos han estado interesados en la investigación de sus componentes y sus propiedades biológicas (Castaldo y Capasso, 2002; Bankova, 2005a; Sforcin, 2007).

Los usos farmacológicos mejor documentados del propóleo son: antibacteriano, antimicótico, antiviral, antiparasitario, antiinflamatorio, cicatrizante, anestésico, antioxidante, e inmunomodulador, entre otros.

### 2.4.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El amplio uso del propóleo en la medicina popular, en la protección de injertos y colmenas, y en la elaboración de productos farmacéuticos radica en sus propiedades antibióticas. Numerosas investigaciones en este campo han permitido identificar a los ácidos aromáticos, a los sesquiterpenoides (particularmente el bisabolol) y a las flavonas (principalmente la galangina) como los principales agentes antimicrobianos. Otras investigaciones consideran también a la pinocembrina, la pinobanksina, el 3-acetato de pinobanksina, el éster bencílico del ácido *p*-cumárico y las mezclas de ésteres del ácido caféico como los compuestos con actividad antibacteriana.

Se ha demostrado que la actividad antibacteriana de los extractos de propóleos debe evaluarse estableciendo la Concentración Mínima Inhibitoria (MCI) y la Concentración Mínima Bactericida (MCB) con relación a una cepa de



*Staphylococcus aureus*. Así, si la relación entre la MCI y la MCB es 1:1; el extracto será de mayor utilidad terapéutica (González, 2002). La literatura farmacológica también describe que existe un sinergismo entre el ciprofloxacino y el propóleo en el tratamiento contra infecciones causadas por *S. aureus*. De igual forma, se ha demostrado sinergismo entre el propóleo y los antibióticos que actúan a nivel del ribosoma, como el cloranfenicol, la tetraciclina y la neomicina. Así mismo, se ha reportado que el propóleo disminuye la resistencia bacteriana a antibióticos tales como la amoxicilina, la ampicilina y la cefalexina (Marcucci, 1995; Sforcin y Bankova, 2011).

En 1995 Cizmarik describió que el ácido ferúlico presente en el propóleo contribuye a la acción bactericida y bacteriostática de este producto debido a su amplio espectro. Este ácido puede provenir directamente de la resina de algunas especies de pino y de abedul, aunque la abeja también puede sintetizarlo a partir de la disociación de los glicósidos vegetales en los que, el ácido ferúlico puede estar presente como aglicona.

Los estudios realizados por Koo y colaboradores en el 2002 demostraron que el propóleo inhibe las enzimas glucosiltransferasas producidas por *Streptococcus mutans*; microorganismo asociado con mayor frecuencia a la producción de caries. La presencia de un antibiótico impide que los exopolisacáridos secretados por las bacterias formen lo que conocemos como placa dentobacteriana o sarro, lo cual ocasiona el deterioro y la pérdida de las piezas dentales. Por esta razón el propóleo se ha incorporado en algunos dentífricos y enjuagues, y en otros productos de higiene bucal.



#### 2.4.2 ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA

En un estudio conducente a evaluar la actividad del extracto alcohólico del propóleo sobre 20 cepas de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Absidio*, *Cladisporium*, *Cunnninghamella*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Paccylomyces*, *Tritirachium* y *Trichoderma*, se demostró que las cepas más sensibles son *Cunninghamella* y *Mucor*. En contraste, los géneros más resistentes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*. Las concentraciones fungistática y fungicida media calculadas fueron de 0,2%, y 2,5%, respectivamente. Posteriormente, al determinar la acción antifúngica del extracto alcohólico del propóleo sobre 24 cepas de levaduras del género *Candida* pertenecientes a las especies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea* y *C. parapsilosis* durante diferentes períodos de exposición se comprobó que los valores de concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos alcohólicos de propóleos disminuyen con el incremento del tiempo de exposición ( Rojas y Lugo, 1988).

#### 2.4.3 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Bojnansky y Koslijarova (1995) estudiaron el efecto inhibitorio de una solución de propóleos al 10%, en alcohol, sobre los virus causantes del mosaico del pepino, de la mancha del tabaco y de la necrosis del tabaco. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la mayor sensibilidad correspondió al virus de la necrosis del tabaco mientras que, para el virus del mosaico del pepino la sensibilidad fue menor. Estos resultados permitieron además establecer que el propóleo no sólo disminuye el número de lesiones en las hojas inoculadas con el virus sino que también inhibe, de manera visible, la reproducción del virus en toda la planta.

Posteriormente, Crisan y colaboradores (1996) estudiaron el efecto del propóleo sobre el herpes *in vitro*. Los resultados obtenidos indicaron que el propóleo disminuye el título infectante del Virus del Herpes Simple tipo 1 (VSH-1) inhibiendo su multiplicación o mediante actividad virulicida.



#### 2.4.4 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

En recientes investigaciones se han registrado numerosos reportes sobre la actividad antiparasitaria del propóleo, destacándose su eficacia sobre *Giardia lamblia*. Hollands y colaboradores (1988) valoraron la actividad de diferentes extractos alcohólicos sobre trofozoítos de *Giardia lamblia*, aislados a nivel de laboratorio, y pudieron constatar un notable efecto de este producto en sólo 24 horas. Observaron, además de la inhibición del crecimiento, la aparición de un gran número de parásitos redondeados e inmóviles. El efecto del propóleo sobre el crecimiento *in vitro* de *Giardia lamblia* fue descrito también por Trespalcios y Torres (1996) luego de evaluar diferentes concentraciones de propóleos en forma de polvos liofilizados a partir de fracciones acuosas y alcohólicas obtenidas a partir de éste. La fracción hidroalcohólica fue la más efectiva ya que, a una concentración de 166 µg/mL inhibió totalmente el crecimiento del parásito mientras que, para lograr efectos similares con la solución acuosa fue necesaria una concentración de 666 µg/mL.

#### 2.4.5 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA, CICATRIZANTE Y ANESTÉSICA

Algunas investigaciones se han realizado en el estudio del proceso de reconstrucción y cicatrización de las heridas, y en la investigación de los aspectos biológicos y bioquímicos que ocurren durante este proceso con el objetivo de acelerar su desarrollo. En este contexto, algunos autores consideran que la capacidad de acelerar la epitelización y la división celular en la curación de heridas, y la prevención y detención del desarrollo de procesos inflamatorios es una de las propiedades más características de los preparados que contienen propóleos. Esta actividad está relacionada con las agliconas libres y los metoxiflavonoides que contienen los propóleos. Se considera que este mecanismo de acción está basado en la intervención de estos compuestos a nivel de los mediadores de la inflamación. Por último, la acción anestésica del propóleo resulta superior a la de los anestésicos normalmente conocidos como cocaína y



novocaína, gracias a los elementos volátiles que contiene como el eugenol, el isoeugenol y el metileugenol (Asis, 1989).

La actividad anti-inflamatoria de propóleos ha sido reportada por varios investigadores utilizando diferentes modelos experimentales. Así, el tratamiento con 200 mg/kg de propóleo brasileño de ratones durante 14 días ocasionó una inhibición en la producción de las interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10 en las células del bazo. Cabe mencionar que estas interleucinas han sido encontradas en los estados crónicos inflamatorios de varias patologías (Missima *et al.*, 2009, 2010).

#### **2.4.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

En el año de 1995, Chopra y colaboradores describieron las propiedades antioxidantes del propóleo utilizando como modelo la cardiomiopatía inducida con doxorubicina en ratas. Esta alteración, debida al estrés oxidativo, está mediada por la producción de radicales libres. Los resultados obtenidos permitieron identificar que en el grupo de animales tratados con una solución de propóleos los valores disminuyeron significativamente. Estas observaciones fueron apoyadas por el examen histopatológico de las secciones de corazón. El efecto protector del propóleo fue comparado con los de la rutina, conocido flavonoide protector del músculo cardíaco, demostrando con esto que, el propóleo es un importante cardioprotector en este tipo de trastorno.

#### **2.4.7 ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA**

Los estudios realizados por Orsatti en el año 2010 permitieron demostrar que el extracto etanólico de propóleo, a una dosis de 200 mg/kg durante tres días, activó en ratones los pasos iniciales de la respuesta inmune mediante la sobreexpresión de los receptores TLR-2, TLR-4 y la producción de citosinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos y las células del bazo. Esta respuesta contribuye al reconocimiento de los microorganismos y a la activación de los linfocitos por las células presentadoras de antígenos.





En un estudio clínico realizado con seres humanos se observó que la administración de cápsulas con 50 mg de propóleo durante 2 semanas indujo un incremento en la capacidad de secreción de citocinas espontáneas e inducidas por LPS (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) y en la secreción de leucocitos periféricos sanguíneos (Sforcin y Bankova, 2011).

## **2.5 USO EN BEBIDAS Y ALIMENTOS**

En los últimos años, el propóleo ha sido ampliamente utilizado en bebidas y alimentos no sólo para mejorar la salud y prevenir enfermedades sino también, como un ingrediente en muchos suplementos dietéticos (Papotti, *et al.* 2012).

### **2.5.1 NUTRACÉUTICOS**

Por definición un nutraceutico es un producto aislado o purificado a partir de alimentos o material biológico que ha demostrado tener beneficios fisiológicos o proporciona protección contra enfermedades crónicas. Así el beneficio de los nutraceuticos está conjugado en dos grandes temas de nuestra sociedad: nutrición y salud.

Durante la última década, se han convertido en una importante tendencia mundial impulsada por el consumidor para atender las necesidades primarias de la salud, prevenir enfermedades, retardar el envejecimiento, mejorar el bienestar y el rendimiento. Esta tendencia va en aumento, y la información científica sobre todos los aspectos de los nutraceuticos es de primordial importancia para el avance de este sector emergente. Considerando la amplia gama de que poseen los propóleos y sus diversos campos de aplicación existe un creciente interés por parte de la industria alimenticia y farmacéutica para incorporarlo en sus productos.

El propóleo, para demanda, se utiliza sólo o en combinación con otros productos natural, no sólo como un suplemento dietético sino también como un antioxidante natural en los alimentos (Papotti *et al.* 2012).



## 2.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química del propóleo varía según el origen vegetal, se ha observado que algunos constituyentes se encuentran en forma constante y pueden utilizarse para caracterizar este producto natural (González, 2002). La variabilidad genética entre las razas de abejas puede también generar diferencias en la composición debido a sus preferencias hacia un tipo de planta. Otro tipo de variación en la composición de propóleos es la reducción en la disponibilidad de las principales fuentes de resinas, por lo que, las abejas comienzan a recolectar el material de otras plantas alternativas (Salatino *et al.*, 2011).

La composición química del propóleo es compleja, depende básicamente de las fuentes vegetales de origen y de la función específica dentro de la colonia (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición básica de los propóleos.

<b>Composición básica de los propóleos</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>%</b>
<b>Resinas y bálsamos</b>	50
<b>Ceras</b>	30
<b>Aceites esenciales</b>	10
<b>Polen</b>	5
<b>Materiales orgánicos y minerales</b>	5

Esta matriz contiene generalmente una variedad de compuestos, tales como compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, estilbenos,  $\beta$ -esteroides, aldehídos aromáticos, y alcoholes (Papotti, 2012). Existe otro grupo de compuestos y elementos minerales que se encuentran como trazas y son de fundamental importancia en la actividad biológica del propóleo y el metabolismo celular; destacan la provitamina A y algunas vitaminas del complejo B, especialmente la vitamina B3 o nicotinamida. También están presentes lactonas, polisacáridos, aminoácidos y otras sustancias aún no identificadas. En la Tabla 2 se resumen algunos compuestos químicos identificados en propóleos.



Tabla 2. Compuestos químicos identificados en propóleos.

Compuesto químico	Observaciones	Ejemplos de compuestos identificados.
<b>Aminoácidos</b>	Los niveles de aminoácidos contenidos en los propóleos son muy bajos aunque se ha reportado la presencia de más de 20. Se considera que la mayoría son aportados por la abeja, al no ser detectados en las yemas vegetales.	Leucina Metionina Ornitina Fenilalanina Prolina Ácido piroglutámico Serina Alanina Arginina Asparagina Ácido aspártico Cistina
<b>Ácidos alifáticos y sus ésteres.</b>	Los compuestos de este tipo son de cadena larga y son aportados por las ceras de las abejas. No obstante, los ácidos alifáticos y los ésteres de cadena corta provienen de los exudados vegetales.	Ácido butírico Ácido 2-metil butírico Ácido succínico Ácido crotonico Ácido fumárico Ácido acético Acetato de bencilo Acetato de isobutilo Ácido palmítico Ácido esteárico Ácido oléico Ácido linoléico Ácido isobutírico
<b>Ácidos aromáticos y sus ésteres.</b>	Proviene de los exudados de las yemas vegetales y muchos de sus componentes han demostrado propiedades antifúngicas y antibacterianas (ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido caféico); fotoinhibidora o antigerminativa (ácido benzoico y ácido <i>p</i> -cumárico); acción hemostática o coagulante (ácido ferúlico). El efecto alergénico en algunos de sus componentes entre ellos, el	Ácido benzoico Benzoato de bencilo Benzoato de etilo Salicilato de metilo Salicilato de bencilo Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico Ácido vainillínico Ácido <i>p</i> -anisico Benzoato de metilo Benzoato de cinamilo Ácido cinámico Ácido caféico Cafeato de 2-metil-2-butenilo Ácido cumárico

Tabla 2. Compuestos químicos identificados en propóleos (Continuación)



Compuesto químico	Observaciones	Ejemplos de compuestos identificados.
<b>Ácidos aromáticos y sus ésteres (continuación)</b>	cafeato de prenilo, es responsable de la alergia del hombre a los propóleos.	Cumarato de bencilo Ácido isoferúlico Isoferulato de bencilo Ferulato de bencilo
<b>Alcoholes</b>	El $\alpha$ y $\beta$ glicerofosfato provienen del metabolismo de la abeja, el glicerol de la cera, y el resto de las yemas vegetales.	$\alpha$ -glicerofosfato $\beta$ -glicerofosfato Hidroquinona Alcohol prenilico Isobutenol Glicerol Fenil etílico
<b>Aldehídos</b>	Tienen su origen en las yemas vegetales.	Benzaldehído p-hidroxibenzaldehído Vainillina Isovainillina Aldehído caproico
<b>Chalconas y dihidrochalconas.</b>	Están relacionadas con las flavononas. Las dihidrochalconas no son comunes en el propóleo por tener su origen en los exudados de plantas poco visitadas por las abejas.	Naringenina chalcona Pinobanksina chalcona 3-acetato chalcona de pinobanksina Pinocebrina chalcona 2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona 2',4',6'-trihidrooxidihidrochalcona
<b>Terpenoides y otros compuestos</b>	Proviene de exudados vegetales. Los terpenoides volátiles tienen un fuerte olor aromático. Son en parte los responsables del olor de propóleos, además de poseer propiedades antimicóticas y anestésicas.	$\alpha$ -Acetoxibutenol $\beta$ -bisabolol 1,8-cineol $\alpha$ -copaeno Cimeno Limoneno Estilbena Estireno

**Tabla 2.** Compuestos químicos identificados en propóleos (Continuación)

Compuesto químico	Observaciones	Ejemplos de compuestos identificados.
<b>Flavonoides</b>	Se consideran los elementos de elevada actividad biológica, con más de 40 funciones terapéuticas reconocidas (antibacteriana, antiparasitaria, antimicótica, antiviral, inmunomoduladora, antiinflamatoria, cicatrizante, antioxidante y protectoras de capilares, entre otras).	Acacetina Alnusitol Alpinetina Apigenina 7-metileter de apigenina Betuletol Crisina Ermanina Galangina 3-metileter de galangina Isoramnetina Izalpinina Kaempferida Kaempferol Naringenina Pectolinaringenina Pinobanksina Pinocebrina Pinostrobinina Quercetina Ramnetina Ramnocitrina Sakuranetina 3-metileter de kaempferol 7-metileter de kaempferol 3-acetato de pinobanksina 3-acetilo de pinobanksina 3-butilato de pinobanksina 3-hexanoato de pinobanksina 3-metileter de pinobanksina 3-pentanoato de pinobanksina 3-pentenoato de pinobanksina 3-propanoato de pinobanksina

(González, 2002)

Recientemente, algunos investigadores han demostrado que, los extractos etanólicos de propóleos, suprimen la toxicidad de las dioxinas ya que se ha estudiado que estos compuestos tienen elevada toxicidad y pueden provocar problemas de reproducción y desarrollo, afectan el sistema inmunitario, interfieren con hormonas y, de este modo, causan cáncer (Park, 2005; Papotti, 2012).



En particular, los flavonoides son los responsables de las actividades biológicas y farmacológicas de los propóleos, tales como anticancerígeno, anti-inflamatorio, antimicrobiano, y antioxidante. Actualmente, la calidad de los propóleos se mide por el contenido de flavonoides; pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como rayos ultravioleta, contaminación ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otros. El organismo humano no puede producir estos productos por lo que, deben obtenerse mediante los alimentos o en forma de suplementos. Los flavonoides están ampliamente distribuidos en las plantas, las frutas, las verduras y en diversas bebidas, y son componentes sustanciales del componente no energético de la dieta humana (Martínez-Flores *et al.*, 2002). Así mismo, los flavonoides son altamente valorados en la industria de la cosmetología, donde se usan principalmente en cremas.

## 2.7 FLAVONOIDES

Los flavonoides (del latín *flavus*, “amarillo”) son estructuras del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí, por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la  $\gamma$ -cromona (o benzo- $\gamma$ -pirona) con un fenilo en posición 2. Todos los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C<sub>3</sub> y en el anillo B. Son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático y, por lo tanto, son polifenólicas. Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido siquímico y la ruta de los policétidos (Villa del Fresno, 1999)

Dependiendo del grado de oxidación del anillo piránico central pueden diferenciarse varios tipos:



- **2(3)-fenilbenzopirona:** flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas (isómeros de flavonas con anillo piránico abierto) y auronas (homólogos de flavonas con heterociclo pentagonal).
- **2-fenilbenzopirano:** 3-flavonoles (catequinas), 3,4-flavonodíoles (leucoantocianos).
- **2-fenilbenzopirilo (flavilio):** antocianinas.

### 2.7.1 DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA DE LOS FLAVONOIDES.

Los flavonoides están ampliamente extendidos en todo el reino vegetal constituyendo la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalconas, auronas) o rojos y azules (antocianinas) de flores y algunos frutos. Son particularmente abundantes en las plantas vasculares. Destacan las familias Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbelliferae y Lamiaceae, entre otras, por el contenido y diversidad estructural de los flavonoides que existen en ellas. Salvo algunas excepciones, los antocianósidos están presentes en todas las Angiospermas; en Gimnospermas son característicos los biflavonoides (formas dímeras, con frecuencia, de flavonas y flavanonas) en Cycadales y Coniferales.

Se encuentran sobre todo en partes aéreas (hojas, flores y frutos) donde se acumulan, relativamente a concentraciones elevadas y en las vacuolas de las células epidérmicas. De igual forma están presentes en número elevado en raíces (Villa del Fresno, 1999).

### 2.7.2 ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.

La reacción de la cianidina (magnesio en medio clorhídrico) permite distinguir algunos tipos de flavonoides: coloración naranja con las flavonas, rojo cereza con los flavonoles y violeta con las flavanonas.



Las técnicas cromatográficas, de modo particular la cromatografía en capa fina, es muy utilizada para la caracterización de los flavonoides. El revelado de los cromatofolios se realiza por observación de la fluorescencia al UV (366 nm) con diversos reactivos:

- (i) El examen a la luz UV antes y después de pulverizar con tricloruro de aluminio produce cambios en la fluorescencia de flavonas y flavonoles.
- (ii) Flavonas y flavonoles expuestos a vapores de amoníaco se colorean de amarillo; chalconas y auronas, de naranja a rojo.
- (iii) Reactivo de Neu (solución metanólica al 1% de difenilborato de 2-aminoetilo) detecta la mayoría de los flavonoides.
- (iv) Con ácido sulfúrico concentrado, los flavonoides dan soluciones intensamente amarillas.

Los espectros UV de los flavonoides son muy característicos y precisos para su identificación. Las absorciones correspondientes dependen estrechamente de la naturaleza y la posición de los sustituyentes. Actualmente, se utilizan otras técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN), resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) y la espectrometría de masas (MS).

Los métodos de valoración son preferentemente colorimétricos (con  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 2% (P/V) o con reactivo oxalbórico) o bien cromatográficos. La cuantificación por HPLC se lleva a cabo por medio de una curva de calibración con patrón externo (Villar del Fresno, 1999).





### 2.7.2.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica analítica rápida, sencilla y muy utilizada. Se utiliza para:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto.
- Identificar sustancias
- Comparar muestras.
- Realizar el seguimiento de una reacción.

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son el gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos por ello, se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición

### 2.7.2.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA.

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la más conocida. Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la columna y la composición del eluyente; su utilidad para la separación de especies no volátiles y termolábiles y su aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos presentes en matrices complejas (Rouessac, 2003).



La fase estacionaria de reparto suele estar químicamente unida a un polímero poroso y se halla en el interior de una columna metálica; en general, el diámetro interno de las columnas es de 4 a 10 mm, la longitud de entre 10 y 30 cm y los tamaños de partículas más comunes son de 5 ó 10  $\mu\text{m}$ ; perfectamente rellena, a través de la cual pasa la fase móvil a alta presión. El equipo necesita un sistema de bombeo para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna. El eluyente es una mezcla de disolventes cuyas proporciones permanecen constantes, tratándose de una separación isocrática, o pueden variar en función del tiempo, llamadas separación en gradiente. Los compuestos son detectados a medida que salen de la columna generalmente por medio de un detector, frecuentemente de UV aunque se pueden usar otros (índice de refracción y fluorimétricos, entre otros). El conjunto se completa con un ordenador personal provisto de un programa capaz de analizar la información. El aparato es utilizado para todos los tipos de columna de cromatografía líquida: adsorción, reparto, fase reversa, gel filtración, intercambio iónico y afinidad.

Respecto al material de la fase reversa, éste se consigue por la unión de grupos octil, octadecilsilil-( $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{Si}$ -) u otros a la sílica gel, de tal modo que en el producto final hay numerosos grupos silanol-OH residuales. Durante la separación pueden actuar tanto los fenómenos de adsorción como los de partición (Villar del Fresno, 1999).

## **2.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS PROPÓLEOS.**

El propóleo como materia prima contiene impurezas como madera, ceras, polen e incluso abejas muertas. Por lo tanto, es necesario observar macroscópicamente la muestra y eliminar dichas impurezas antes de preparar los extractos. Un paso determinante en el proceso de separación es la extracción del propóleo. Los disolventes utilizados para su extracción son usualmente alcoholes tales como: metanol y etanol. El disolvente más frecuentemente utilizado es el etanol conteniendo diferentes proporciones de agua; el etanol 70% se ha usado para extraer los componentes más activos del propóleo pero no las ceras (Bankova *et*

---



*al.*, 1992). Debido a que el propóleo está constituido por un 20-30% de ceras, este disolvente es ampliamente utilizado. Los extractos de propóleo son preparados por maceración o en algunos casos (algunos procedimientos con metanol o etanol al 96%) por extracción con Soxhlet. La extracción por ultrasonido proporciona excelentes resultados y acelera espectacularmente el proceso (Thusheva *et al.*, 2007). La extracción asistida por microondas resulta ser menos favorable, especialmente en caso de muestras ricas en compuestos fenólicos. En general, los perfiles metabólicos de los extractos dan una idea de su origen vegetal y permiten la identificación de la mayoría de sus constituyentes e incluso de los compuestos minoritarios dependiendo de la técnica empleada.

Actualmente, técnicas como HPLC-DAD, LC-MS, LC-MS-MS, y GC-MS, por tan sólo mencionar las más importantes, son las más apropiadas para establecer perfiles químicos adecuados del propóleo (Popova *et al.*, 2005; Campo Fernandez *et al.*, 2008; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Hernandez *et al.*, 2010).

## **2.9 PATRONES GEOGRÁFICOS DE LOS TIPOS DE PROPÓLEOS.**

El término “propóleo” no tiene una connotación química a diferencia del nombre científico de una especie vegetal. Una especie de planta es caracterizada por su genoma y este genoma eventualmente determina los metabolitos secundarios sintetizados por las enzimas de las plantas y responsables de sus actividades biológicas. El propóleo contiene metabolitos secundarios pero no son los mismos en todo el mundo (Sforcin y Bankova, 2011). En la Tabla 3 se resumen los diferentes tipos de propóleo de acuerdo con su fuente natural.



Tabla 3. Tipos de propóleos de acuerdo con su fuente natural.

Tipo de propóleo	Origen geográfico	Fuente natural	Principales constituyentes	Autores
<b>Poplar</b>	Europa, Norte América, regiones no tropicales de Asia, Nueva Zelanda	<i>Populus</i> spp., principalmente <i>P. nigra</i> L.	Flavonas, flavanonas, ácidos cinámico y sus ésteres.	Nagy <i>et al.</i> 1986, Greenaway <i>et al.</i> 1988, Markham <i>et al.</i> (1996) Bankova <i>et al.</i> (2000)
<b>Verde (alecrim) Brasileño</b>	Brazil	<i>Baccharis</i> spp., principalmente <i>B. dracunculifolia</i> .	Ácidos <i>p</i> -cumáricos, ácidos diterpénicos	Salatino <i>et al.</i> 2005
<b>Abedul</b>	Rusia	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavonas y flavonoles (diferentes a los del tipo poplar)	Popravko, 1978.
<b>Propóleo rojo</b>	Cuba, Brazil, México	<i>Dalbergaria</i> spp	isoflavonoides (isoflavanos, pterocarpanos)	Lotti <i>et al.</i> 2010; Dausch <i>et al.</i> 2008
<b>Propóleo amarillo</b>	Cuba	Desconocido	Flavonoides polimetoxilados, triterpenoides	Cuesta-Rubio <i>et al.</i> 2002
<b>Mediterráneo</b>	Sicilia, Grecia, Creta, Malta	<i>Cupressaceae</i> (especies no identificadas)	Diterpenos (principalmente ácidos tipo labdano)	Trusheva <i>et al.</i> 2003, Melliou y Chinou 2004, Popova <i>et al.</i> 2010
<b>“Clusia”</b>	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas preniladas	Cuesta-Rubio <i>et al.</i> 2002, Trusheva <i>et al.</i> 2004
<b>“Pacífico”</b>	Región del pacífico (Okinawa, Taiwan, Indonesia)	<i>Macaranga tanarius</i>	C-prenil-flavanonas	Chen <i>et al.</i> 2008, Kumazawa <i>et al.</i> 2008

(Sforcin, Bankova, 2011)

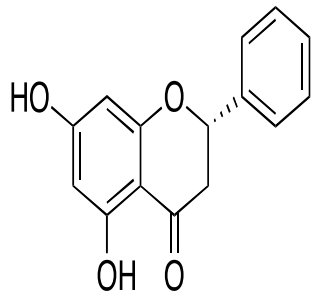


## 2.10 ESTUDIOS REALIZADOS EN MÉXICO.

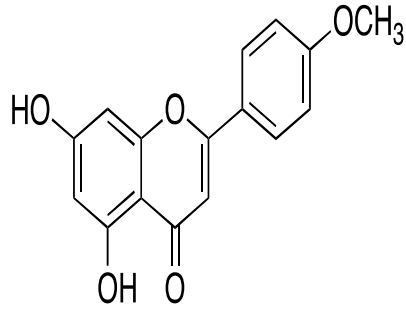
A pesar de las numerosas investigaciones realizadas sobre propóleos colectados en diferentes países con climas templados y tropicales existe un número limitado de publicaciones sobre la composición química y la actividad biológica de propóleos provenientes de regiones áridas o semiáridas del continente americano. En este marco de referencia en el año 2007 Hernández y colaboradores estudiaron tres propóleos del estado de Sonora, México. En esta investigación, los autores identificaron y cuantificaron a la pinocembrina, la crisina y el 3-acetato de la pinobanksina como los metabolitos secundarios mayoritarios en los propóleos estudiados. Los mismos autores describen las propiedades antiproliferativas sobre líneas celulares de cáncer de los extractos y la identificación de 11 flavonoides (entre ellos la galangina, el xantomicrool, la rutina, la naringenina, la hesperetina y la acacetina) y del éster fenil etílico del ácido cafeico (CAPE) utilizando HPLC-MS (Hernández, 2007).

En el año 2010, Lotti y colaboradores describieron la presencia de isoflavonoides, flavanonas y pterocarpanos en una muestra de propóleo rojo recolectada en el estado de Yucatán. Este hallazgo se encuentra en armonía con los perfiles químicos descritos para los propóleos rojos provenientes de Cuba y Brasil. De acuerdo con los resultados obtenidos los autores sugieren que el arizonicanol y los melilotocarpanos A y D podrían representar marcadores taxonómicos apropiados para identificar el propóleo rojo de México.

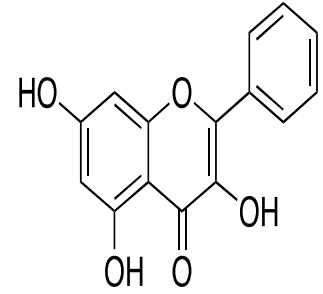
En estudios químicos recientes realizados por el Dr. José Fausto Rivero con diferentes propóleos mexicanos pertenecientes a la región del altiplano fue posible purificar y caracterizar a la pinocembrina, la acacetina, la galangina, la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina como los principales metabolitos. En la Figura 3 se ilustran las estructuras de estos flavonoides.



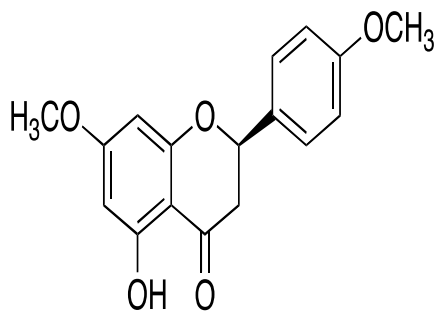
pincembrina



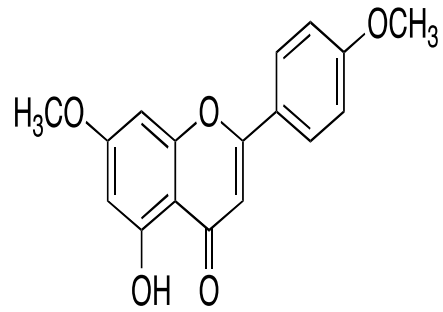
acacetina



galangina



4',7-dimetilnaringenina



4',7-dimetilapigenina

**Figura 3.** Principales metabolitos identificados en la zona del altiplano mexicano.



## **2.11 RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO.**

La cantidad de propóleos que produce una colmena dependerá de la raza de la abeja y de su ubicación. Se ha observado que las colmenas emplazadas en bosques o en áreas cercanas a los ríos con la vegetación abundante contienen más propóleos que las situadas en zonas llanas. Las abejas propolizan durante todo el año, sin embargo, se ha observado que durante el final del verano y el otoño la propolización es mayor, de ahí que el apicultor deba recolectar el propóleo antes del invierno (González, 2002). Para la recolección del propóleo se utilizan los métodos especializados que se describen a continuación.

### **2.11.1 RASPADO**

El propóleo se recoge en bruto de la colmena raspando las paredes con una espátula. También se utilizan rejillas especiales que al introducirse en la colmena, las abejas obreras propolizan. Posteriormente, se extraen y se retira el propóleo. Es un método que resulta bastante engorroso e inconveniente, pues las valiosas propiedades de este producto pueden ser disminuidas (Figura 4a).

### **2.11.2 REJILLAS**

Se colocan debajo de la tapa de la colmena; consisten en una lámina plástica o metálica que contiene ranuras, las cuales son rellenas con propóleo por las abejas, lo que permite su fácil retirada y recolección. Posteriormente, se congelan y una simple presión sobre ellas permite que el propóleo se desprenda fácilmente (Figura 4b)

### **2.11.3 PLACAS PLÁSTICAS**

Son del tamaño y apariencia de un excluidor de reinas, pero con agujeros más pequeños para impedir el paso de una abeja. Se sitúan en la parte alta de la colmena en sustitución de la entretapa; al percibir la pérdida de calor que se produce en esa área, las abejas propolizan rápidamente los agujeros. Para

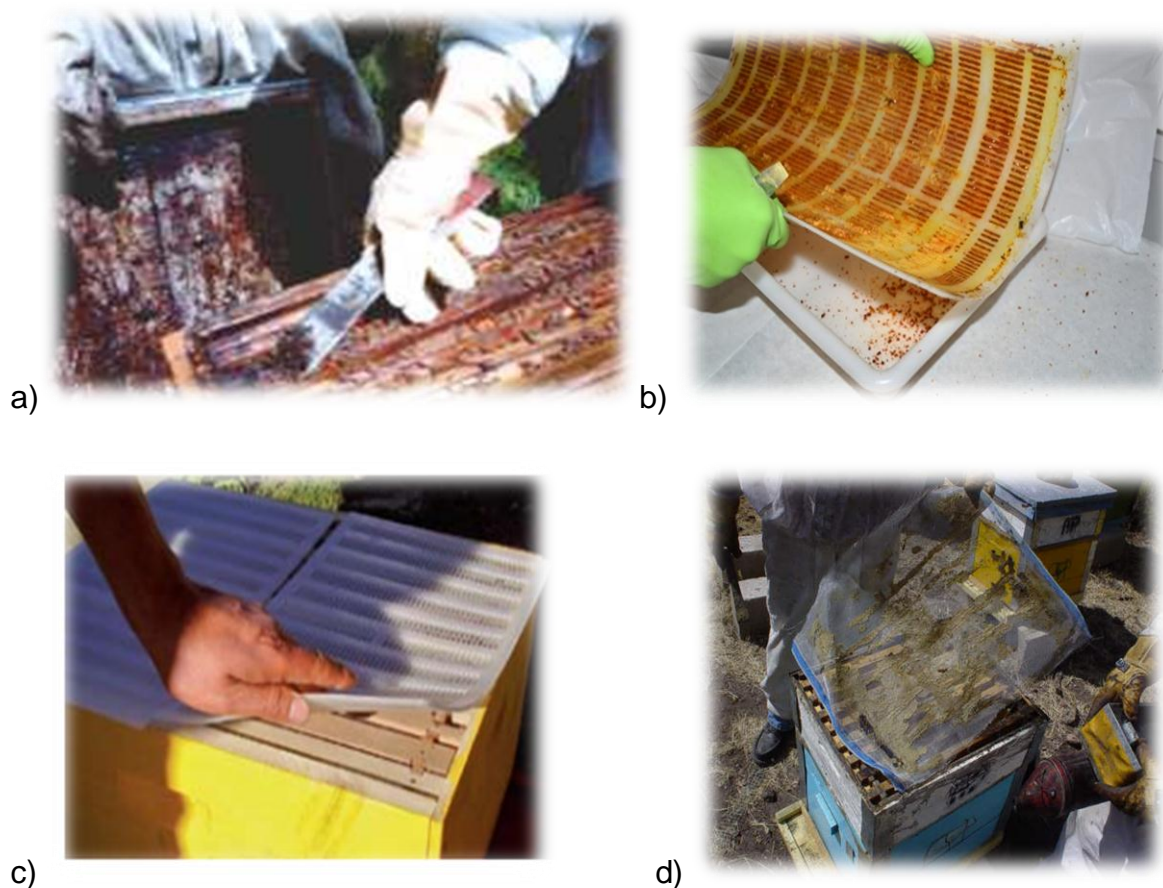
---



cosechar el propóleo, se colocan las placas en el congelador por 3 a 4 horas y luego se flexionan para desprender el producto (Figura 4c).

#### 2.11.4 MALLAS

Este dispositivo puede ser de plástico o metal. El método consiste en cortar secciones de este material del tamaño de la superficie de la colmena, retirándolas y congelándolas. Muchos consideran que es más económica y más duradera, puesto que no se quiebra por los sucesivos cambios de temperatura y manipulación. Además, las superficies libres son mayores, por lo tanto, se recolecta más propóleo en cada extracción (Figura 4d)



**Figura 4.** Métodos de recolección de propóleos a) Método de raspado con espátula b) método de rejillas c) placa plástica recolectora de propóleos. d) empleo de mallas plásticas en la producción de propóleos.





### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Las muestras de propóleo analizadas fueron recolectadas de cinco apiarios de 3 delegaciones del Distrito Federal, y fueron colectadas por el personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Se realizaron 3 colectas en los meses de agosto, octubre y diciembre de 2011. La ubicación de los apiarios estudiados se describe en la Tabla 4:

**Tabla 4.** Ubicación geográfica de los apiarios

Apiario	Ubicación	m.s.n.m.
“Búho”	Paraje del Panteón Tecomic, en San Pablo Oztotepec, delegación Milpa Alta, D.F.	2420
“Nico”	Poblado de Topilejo, delegación Tlalpan, D.F.	2410
“Panteón”:	Poblado de San Pablo Oztotepec, delegación Milpa Alta, D.F	2420
“Trojes”	Poblado de San Antonio Tecomitl, delegación Milpa Alta, D.F	2420
“Acuexcomatl”	Poblado de San Luis Tlaxialtemalco, delegación Xochimilco, D.F.	2420

m.s.n.m.= metros sobre el nivel del mar

Para cada una de las colectas se analizaron dos tipos de malla: la “granizera” (G) que consistió en una malla de poro grande y una malla “sombra” (S) que incluye un poro de tamaño pequeño.

#### 3.2 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina de los estándares empleados en este trabajo, se utilizaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 G<sub>254</sub> Merck). El sistema de elución empleado fue CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt en una proporción 98:2. El cromatofolio se visualizó con luz UV. (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm) y se reveló con solución de vainillina ácida.



### **3.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution. La respuesta utilizada para cuantificar la concentración de cada marcador químico fue el área bajo la curva (ABC).

El análisis para determinar la concentración de los marcadores químicos (pinocebrina, acacetina, galangina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina) se realizó en una columna XBridge C<sub>18</sub> marca Waters, con un tamaño de partícula de 5 µm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). La concentración de la muestra oscila entre 100-1000 µg/mL.

El volumen de inyección fue de 10 µL. La elución se realizó con sistema isocrático que consistió en una mezcla binaria constituida por MeOH:Agua con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en una proporción 55:45. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y la temperatura empleada para dicho análisis fue de 25°C. La longitud de onda empleada para la detección de pinocebrina, galangina, 4,7-dimetilnaringenina y 4,7-dimetilapigenina fue de 290 nm., mientras que para la acacetina fue de 340 nm.

### **3.4 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE TRABAJO**

2 g de propóleo se extrajeron mediante un proceso de maceración con 100 mL de etanol, por tres días a temperatura ambiente. La solución resultante se filtró y se concentró a presión reducida.



Las muestras de propóleo se prepararon pesando 20 mg del extracto etanólico seco y se disolvieron en una mezcla de etanol-acetonitrilo en proporción 50:50. Una vez preparadas las soluciones se filtraron utilizando una membrana de 45  $\mu\text{m}$  marca Millipore. Posteriormente, se analizaron en el cromatógrafo 10  $\mu\text{L}$  y se sometieron a las condiciones descritas en el inciso 3.3. Cabe mencionar que todas las muestras de cada apiarío se trabajaron por triplicado.

### **3.5 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES**

La identificación de los flavonoides en los extractos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y las absorbancias que presentaron cada uno de los estándares con las señales presentes en el cromatograma obtenido con el extracto. Para ello, se prepararon los estándares a una concentración de 1 mg/mL. Todas las muestras se prepararon utilizando como disolvente una mezcla de etanol-acetonitrilo 1:1.

### **3.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES**

Preparación de las soluciones estándar.

- a) 10 mg de 4',7-dimetilnaringenina, acacetina y pinocembrina se disolvieron en 10 mL de la mezcla etanol acetonitrilo 1:1. Estas soluciones contienen 1000  $\mu\text{g/mL}$ .
- b) 5 mg de la 4',7-dimetilapigenina se disolvieron en 25 mL de etanol:acetonitrilo 1:1. Esta solución contiene 200  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **3.6.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA**

A partir de las soluciones estándar se prepararon las diluciones necesarias para llegar a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  y 30  $\mu\text{g/mL}$  de 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina, respectivamente.

Una vez preparadas las soluciones de ensayo se evaluó este parámetro de desempeño, mediante la inyección por quintuplicado de ambas soluciones. En

---



todos los casos se registró: el factor de coleo (T) y el número de platos teóricos (NPT). El criterio de aceptación utilizado establece que el coeficiente de variación (C.V.), obtenido para la respuesta de cada analito debe ser menor al 2.0%. El mismo procedimiento se siguió para la pinocembrina y la acacetina (100 µg/mL).

### 3.6.2 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Las curvas de calibración para cada compuesto se prepararon por pesadas independientes. Para cada curva se prepararon 5 niveles de concentración. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal y se calcularon la ordenada al origen ( $\beta_0$ ), la pendiente de la recta ( $\beta_1$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ).

Los criterios de aceptación establecidos para este parámetro de calidad de la metodología son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ , el Intervalo de Confianza para la pendiente ( $IC\beta_1$ ) no debe incluir el cero; mientras que el de la ordenada al origen incluye el cero.

### 3.7 DISEÑO FACTORIAL $2^3$

En este trabajo los factores y niveles seleccionados para el diseño factorial fueron el apiario (A), el tamaño de la malla (B) y el mes de la colecta (C), con un nivel bajo (-) y un nivel alto (+); descritos en la Tabla 5.

Factor	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
A Apiario	Búho (Del. Milpa Alta)	Nico (Del. Tlalpan)
B Malla	Granizera	Sombra
C Mes de colecta	Primera (agosto)	Tercera (diciembre)

Tabla 5. Factores y niveles seleccionados para el diseño experimental  $2^3$



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recientemente, el propóleo ha sido ampliamente comercializado en la industria como medicina alternativa y como aditivo en alimentos en diversas partes del mundo. Por ello, la composición química es importante ya que es cualitativa y cuantitativamente variable y depende de la época del año, la vegetación, la zona de colecta y la especie de la abeja. En este sentido, las abejas de los géneros *Apis mellifera caucásica* y *Apis mellifera intermissa* son consideradas altamente propolizadoras ya que, forman cortinas de propóleo que bloquean la entrada a la colmena (piquera) permitiendo tan sólo el paso de una abeja. Del mismo modo, la especie *Apis mellifera scutellata*, abeja del interior árido de África, elabora cortinas de propóleo en la piquera, sin embargo, las abejas de la misma especie, que se localizan en la región de la costa, dejan permanentemente la entrada abierta (Asis, 1989). Caso contrario sucede con las abejas italianas (*A.m. lingüística*), las cuales son escasamente propolizadoras. Por otra parte, se menciona que las abejas camiolas (*A. mellifera cárnica*) utilizan poco propóleo, empleando cera en su lugar (Asis, 1989).

Estos factores dificultan la estandarización de los propóleos. Por otro lado, diferentes disolventes como etanol, metanol y agua, han sido utilizados para preparar el extracto, presentando diferentes actividades (Cunha *et al.*, 2004). Una estandarización universal sería difícil. En el 2005, Bankova propone que las propiedades biológicas de los propóleos deben ser relacionadas con una investigación detallada de su composición química y sus orígenes botánicos. A la fecha, la estandarización del propóleo se realiza con base en el contenido total de flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles y fenoles. Estos parámetros proporcionan una idea acerca de la calidad del propóleo sin embargo, no proporcionan información exacta sobre su composición química ni sobre los compuestos responsables de la actividad biológica.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la zona de colecta (apiario), la época y el tamaño de malla se diseñó un protocolo experimental mediante el uso de un

---



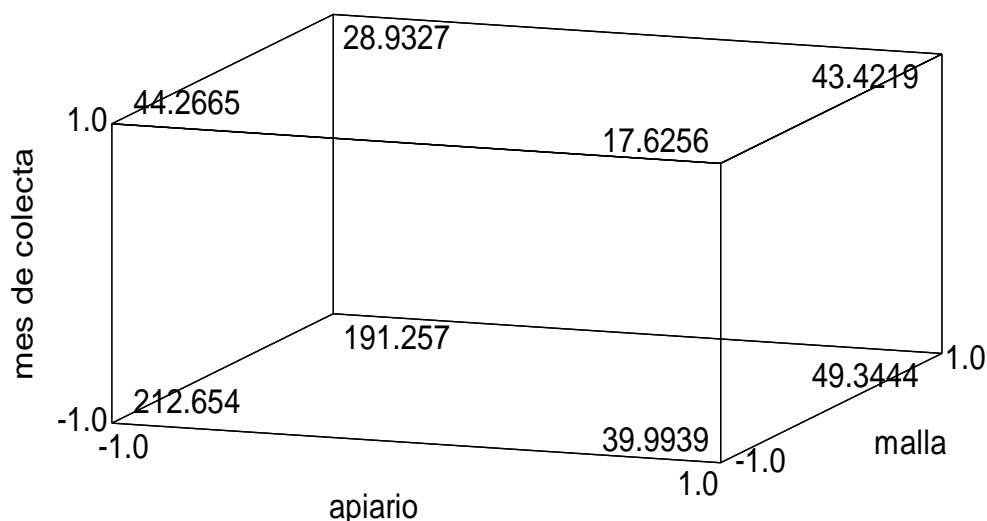
diseño factorial  $2^3$ . Para ello, se prepararon los extractos etanólicos de cada muestra y se analizaron por HPLC utilizando una metodología analítica previamente validada en nuestro laboratorio (Martínez, 2012).

#### 4.1 DISEÑO FACTORIAL $2^3$

Los diseños factoriales se usan ampliamente en experimentos que incluyen varios factores cuando es necesario estudiar el efecto conjunto de los factores sobre una respuesta. El diseño experimental puede aplicarse entonces, para mejorar el desempeño o bien, para obtener procesos robustos a las fuentes de variabilidad externas. El diseño experimental aplicado en las primeras etapas del desarrollo de un proceso tiene las siguientes ventajas: un mejor rendimiento, una variabilidad reducida, un tiempo de desarrollo más corto y la disminución de costos (Montgomery, 2011).

En este marco de referencia, el experimento de caracterización seleccionado se centra en determinar cuáles son las variables que afectan la concentración de cada uno de los flavonoides estudiados (pinocembrina, acacetina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina) en los propóleos provenientes de la región del altiplano mexicano que se estudiaron.

Así, para establecer la concentración óptima se utilizó un diseño experimental  $2^3$ , en que se pueden variar conjuntamente el apiario, la malla utilizada y el mes de colecta. En el diseño factorial seleccionado cada uno de los factores tiene 2 niveles alto (+) y bajo (-), de tal manera que posee 8 combinaciones entre los niveles y los factores. Geométricamente, el diseño es un cubo (Figura 5) y cada una de las 8 corridas forman los vértices del cubo.



**Figura 5.** Representación geométrica del diseño  $2^3$  para el experimento con pinocembrina

En la Tabla 6 se resumen los resultados obtenidos de concentración de pinocembrina en las diferentes condiciones de análisis. Para calcular el modelo factorial se utilizó el programa STATGRAPHICS. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

Concentración del

$$\text{Flavonoide} = \mu + \text{efecto A} + \text{efecto B} + \text{efecto C} + \text{efecto AB} + \text{efecto AC} + \text{efecto BC} + \text{efecto ABC}$$

$$\begin{aligned} \text{Concentración de pinocembrina} = & 78.437 - 40.8405 \cdot \text{apiario} - 0.198101 \cdot \text{malla} - \\ & 44.8753 \cdot \text{mes de colecta} + 8.98481 \cdot \text{apiario} \cdot \text{malla} + 37.8026 \cdot \text{apiario} \cdot \text{mes de} \\ & \text{colecta} + 2.81373 \cdot \text{malla} \cdot \text{mes de colecta} + 1.29771 \cdot \text{apiario} \cdot \text{malla} \cdot \text{mes de colecta}. \end{aligned}$$



**Tabla 6.** Resultados obtenidos de la cuantificación de pinocembrina.

Experimento	Factores del diseño			Concentración de pinocembrina (µg/mL)		
	Apiario	Malla	Colecta	1	2	3
1	Búho	Granizera	Primera	213.278776	206.430175	218.254721
2	Nico	Granizera	Primera	52.255017	37.491814	30.234860
3	Búho	Sombra	Primera	200.356349	181.072080	192.341072
4	Nico	Sombra	Primera	51.692098	47.009701	49.331445
5	Búho	Granizera	Tercera	46.687765	42.833463	43.278264
6	Nico	Granizera	Tercera	15.430884	18.864712	18.581227
7	Búho	Sombra	Tercera	28.834262	29.129667	28.834262
8	Nico	Sombra	Tercera	47.988908	32.825404	49.451411

Resultados obtenidos a partir de tres réplicas independientes para cada experimento.

Por otra parte, en la Tabla 7, se resume el análisis de varianza calculado para el modelo. El valor de P para los factores A, C y las interacciones AB, AC y BC es menor a 0.05, indicando que, con un 95% de confianza ejercen un efecto significativo en la concentración de pinocembrina. Por otra parte, el valor de  $r^2$  indica que el modelo factorial  $2^3$  explica el 99.6% de la variabilidad en los datos.

**Tabla 7.** Análisis de varianza del modelo factorial de la pinocembrina.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:apiario	40030.8	1	40030.8	1183.13	0.0000
B:malla	0.941854	1	0.941854	0.03	0.8699
C:mes de colecta	48331.0	1	48331.0	1428.45	0.0000
AB	1937.44	1	1937.44	57.26	0.0000
AC	34296.9	1	34296.9	1013.66	0.0000
BC	190.01	1	190.01	5.62	0.0327
ABC	40.4173	1	40.4173	1.19	0.2929
bloques	233.027	2	116.514	3.44	0.0608
Error total	473.684	14	33.8346		
Total (corr.)	125534.	23			

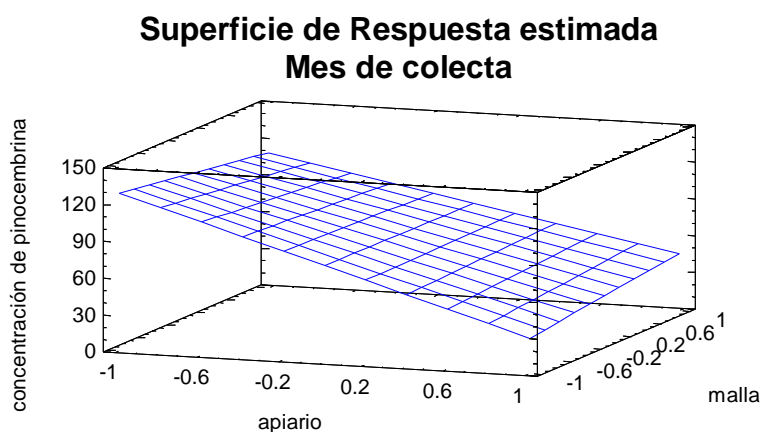
$r^2 = 99.6227$  por ciento

$r^2$  (ajustada por g.l.) = 99.4576 por ciento





En los diseños de experimentos existen dos gráficos de superficie que permiten tener una visualización de los que significa el modelo ajustado. Uno de ellos representa una superficie de respuesta sobre la región experimental, que modela el comportamiento de la concentración de la pinocembrina. En la Gráfica 1 se puede apreciar el plano tridimensional generado por el modelo de regresión lineal, se aprecian visualmente las condiciones necesarias para establecer una respuesta determinada. El mes de colecta se ha mantenido constante es decir, se fija en su nivel inferior.

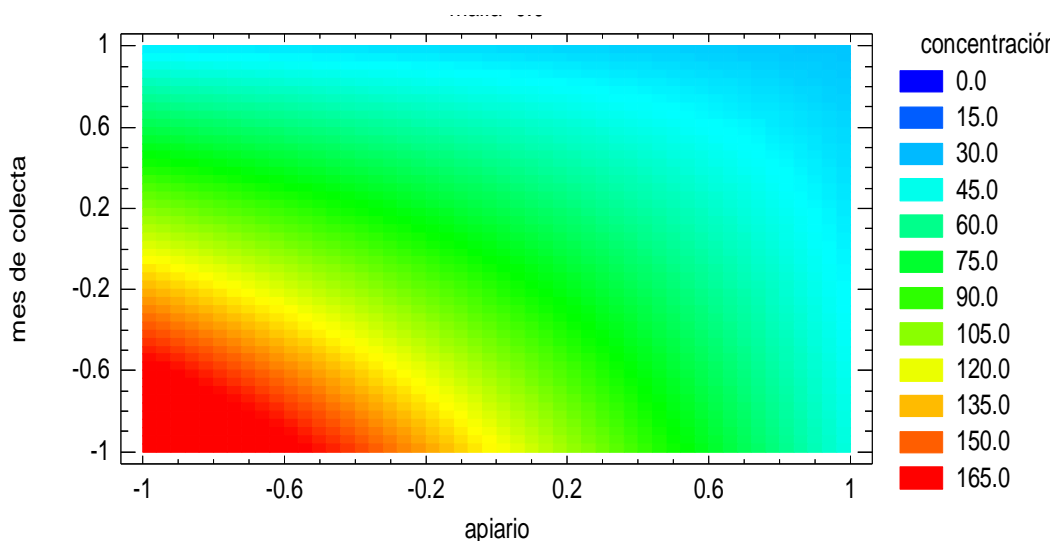


**Gráfica 1.** Superficie de respuesta para concentración de pinocembrina, el factor mes de colecta se ha fijado en su nivel inferior.

Para una mejor visualización, se utiliza la representación de contornos (Gráfica 2) que permite localizar con bastante exactitud las coordenadas del punto con la respuesta deseada. En esta Gráfica, se observa que la mayor concentración de pinocembrina se obtiene cuando el propóleo proviene de la delegación Milpa Alta y la colecta se realiza durante el mes de agosto. En contraste, la menor concentración de pinocembrina se estima cuando el propóleo se recolecta en la zona de Tlalpan durante diciembre.



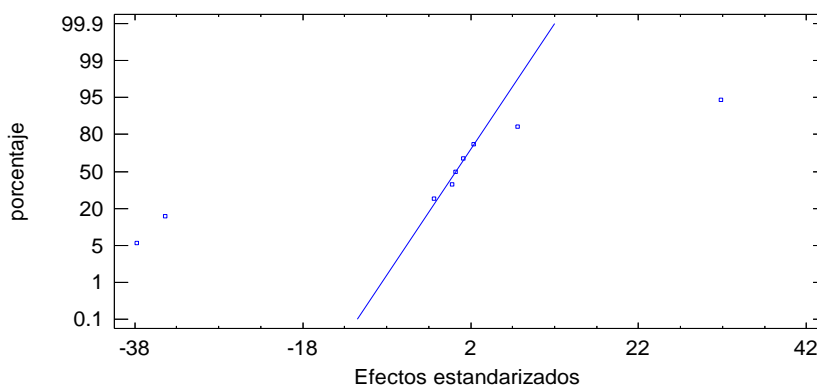
### Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada Factor fijo: malla



**Gráfica 2.** Contornos de respuesta para la concentración de pinocembrina fijando el factor malla.

Por otra parte, en la Gráfica 3 se observa que la mayoría de los datos se localiza sobre la recta indicando con ello que los mismos siguen una distribución normal. Así mismo, se observan que los factores A, B y la interacción AB son significativos ya que se encuentran apartados de la línea recta.

### Gráfico de Probabilidad Normal para la concentración de Pinocembrina

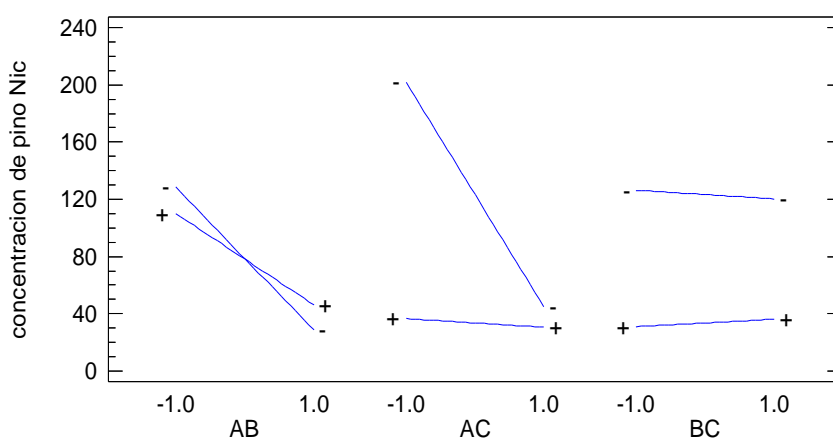


Gráfica 3. Probabilidad Normal para concentración de pinocembrina.



Finalmente, en la Gráfica 4 se observa que la única interacción significativa se presenta entre los factores A y B. Con base en estas evidencias se deduce que la concentración de pinocembrina depende exclusivamente del sitio y del mes de colecta. Con estas consideraciones los efectos de interacción encontrados, se pueden elegir las condiciones ideales para optimizar el contenido total de flavonoides.

### Gráfico de Interacción para la concentración de pinocembrina



**Gráfica 4.** Interacciones para la concentración de pinocembrina.

El mismo procedimiento se siguió para calcular los modelos correspondientes a la acacetina, la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina. En las Tablas 8, 9 y 10 se resumen los modelos calculados, la Gráfica de contorno de superficie y la Gráfica de interacción.



Tabla 8. Modelo factorial, gráfica de contornos y gráfica de interacción para la acetina.

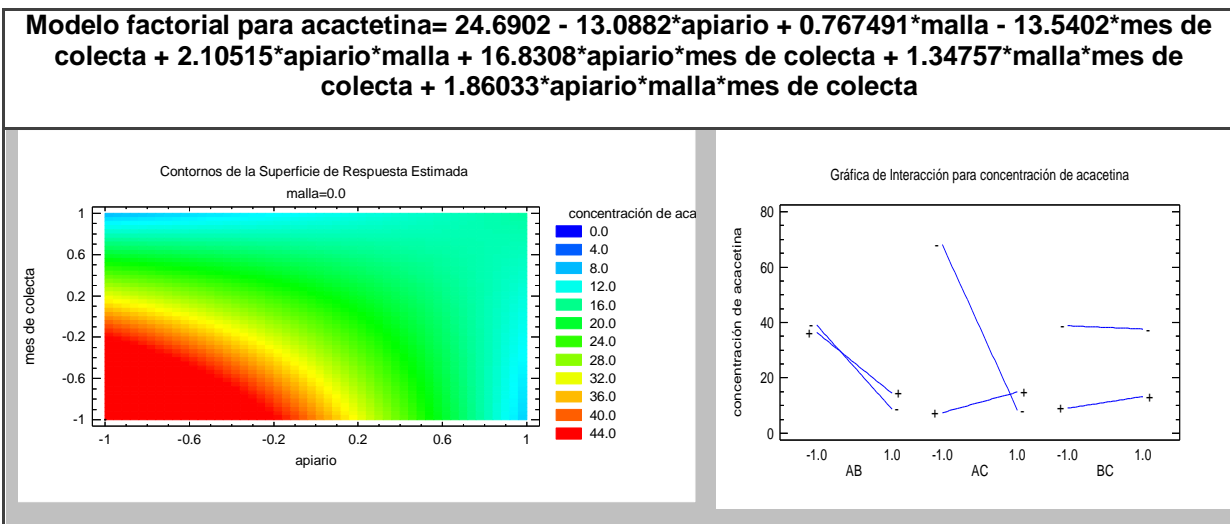


Tabla 9. Modelo factorial, gráfica de contornos y gráfica de interacción para la 4',7-dimetilnaringenina

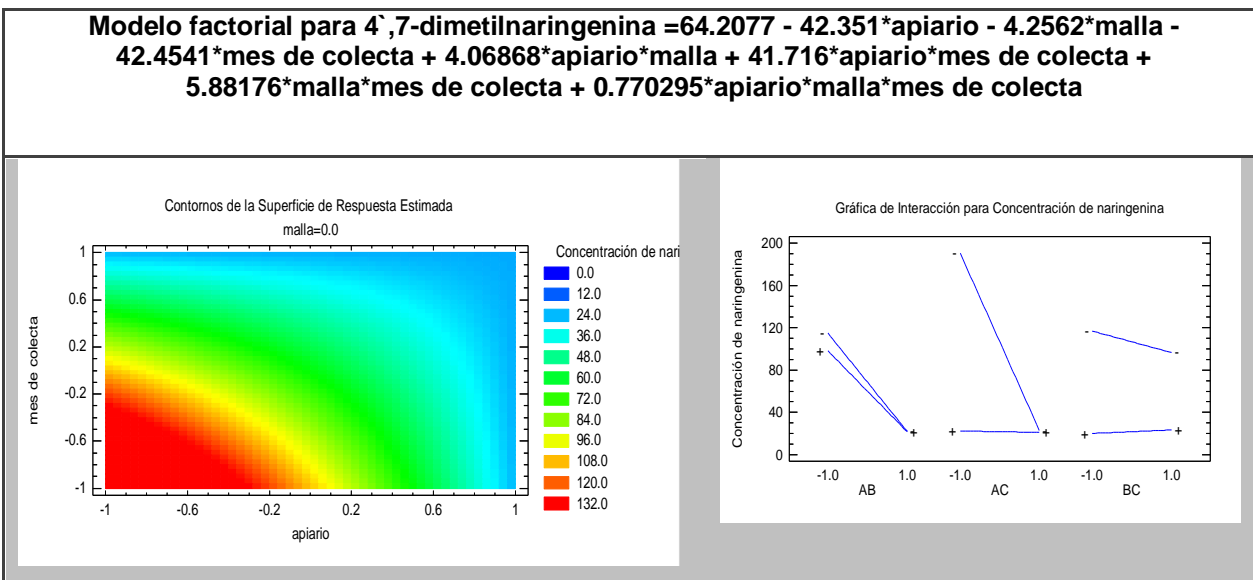
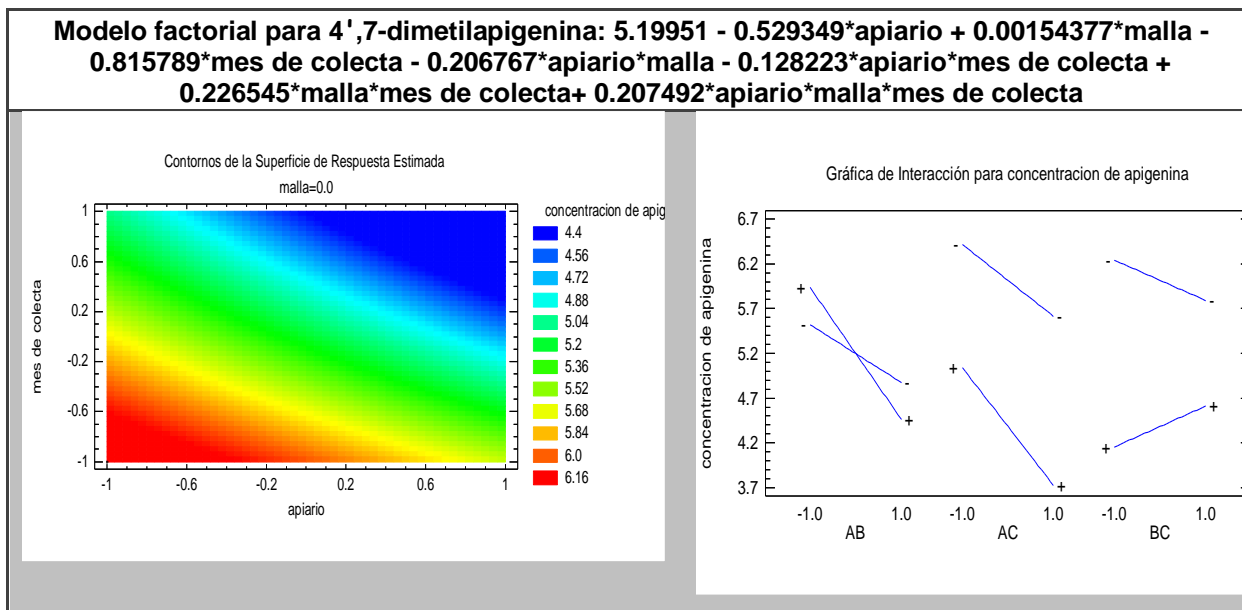




Tabla 10. Modelo factorial, gráfica de contornos y gráfica de interacción para la 4',7-dimetilapigenina.



Con base en los resultados obtenidos es posible concluir que la mayor concentración de todos los flavonoides se obtuvo con el propóleo recolectado en la delegación Milpa Alta durante el mes de agosto. También se puede concluir que en el caso de la acetina y la 4',7-dimetilapigenina la interacción entre los factores A y B es significativa mientras que para la 4',7-dimetilnaringenina, la interacción entre los factores no es significativa. Estos resultados apoyan los hallazgos reportados por González y colaboradores (2002) quienes reportaron que la propolización es mayor durante el fin del verano y el principio del otoño.

## 4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MARCADORES

En las siguientes Figuras se ilustran algunos cromatogramas de los apiarios denominados “El Búho”(I), “Nico” (II), “Panteón” (III), “Trojes” (IV) y “Acuexcomatl” (V), en la primera, segunda y tercera colecta con malla “granizera”. De manera general, se observa en los cromatogramas la presencia de la pinocembrina (a), la acetina (b), la galangina (c), la 4',7-dimetilnaringenina (d) y la 4',7-dimetilapigenina (e). La identificación de los flavonoides en el extracto se realizó



mediante la comparación de los tiempos de retención y las absorbancias que presentaron cada uno de los estándares con las señales presentes en el cromatograma obtenido con el extracto utilizado como referencia. Cabe mencionar que los tiempos de retención son parte de un método validado en el laboratorio de trabajo.

Tabla 11. Tiempos de retención de los marcadores químicos.

Flavonoide:	t <sub>R</sub> (min)
Pinocembrina (a)	7.641
Acacetina (b)	10.606
Galangina (c)	12.807
4',7-dimetilnaringenina (d)	21.340
4',7-dimetilapigenina (e)	31.451

(I)

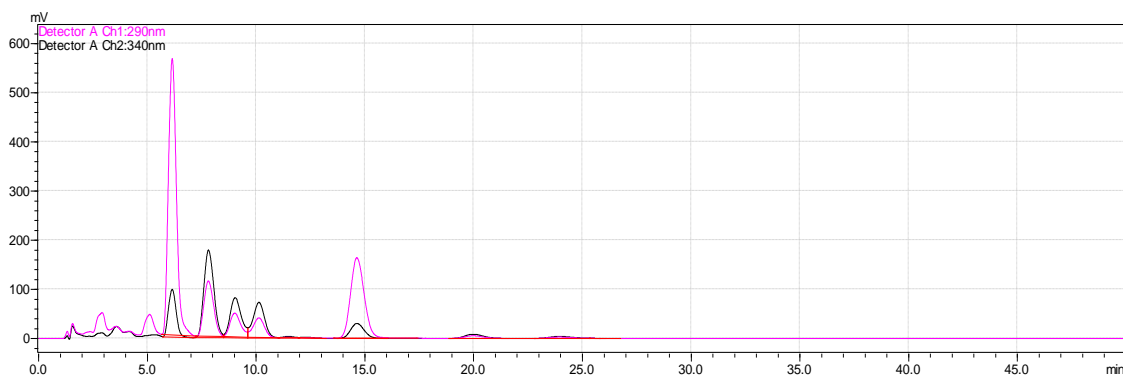
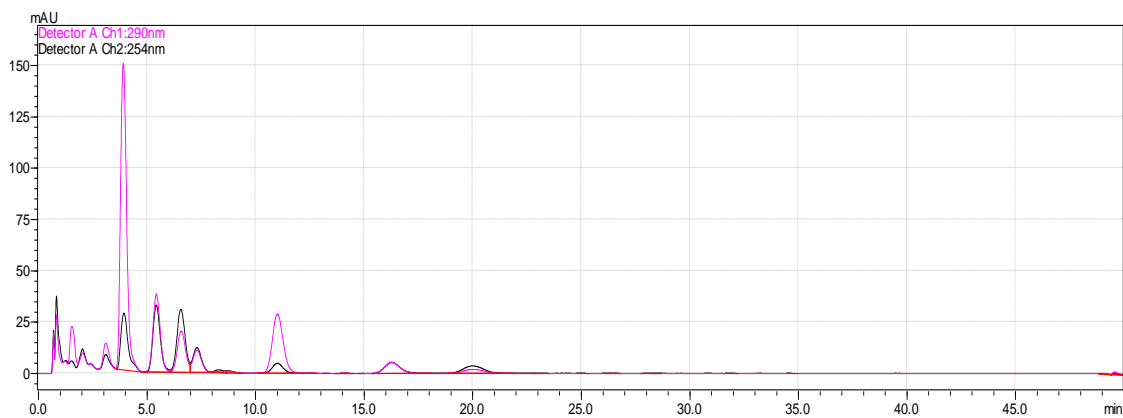


Figura 6 .Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla granizera del apiario "El Búho"

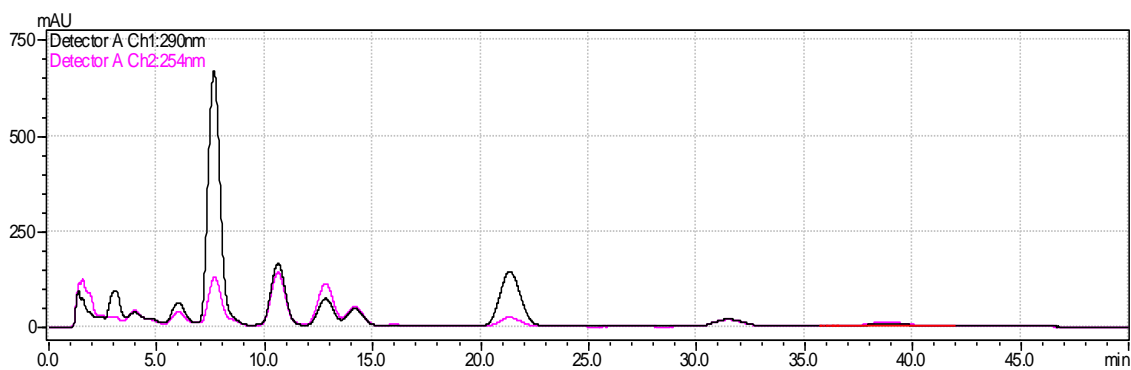


(I)



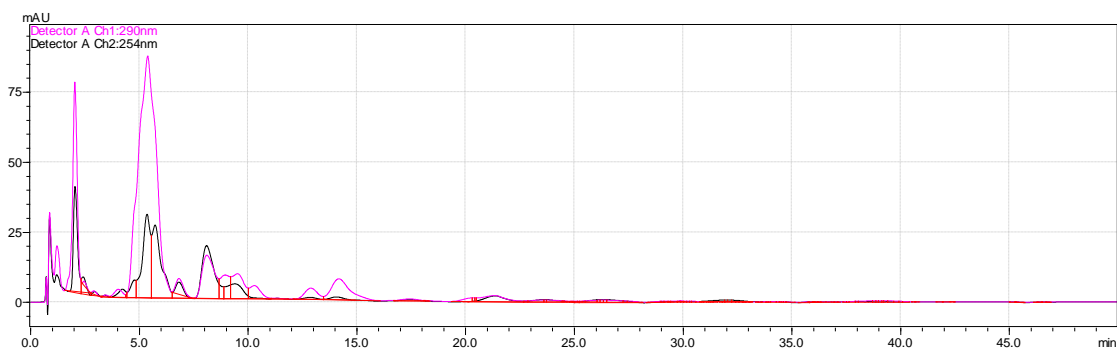
**Figura 7.** Cromatograma del extracto etanólico segunda colecta, malla granizera del apiario “El Búho”

(II)



**Figura 8.** Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Nico”

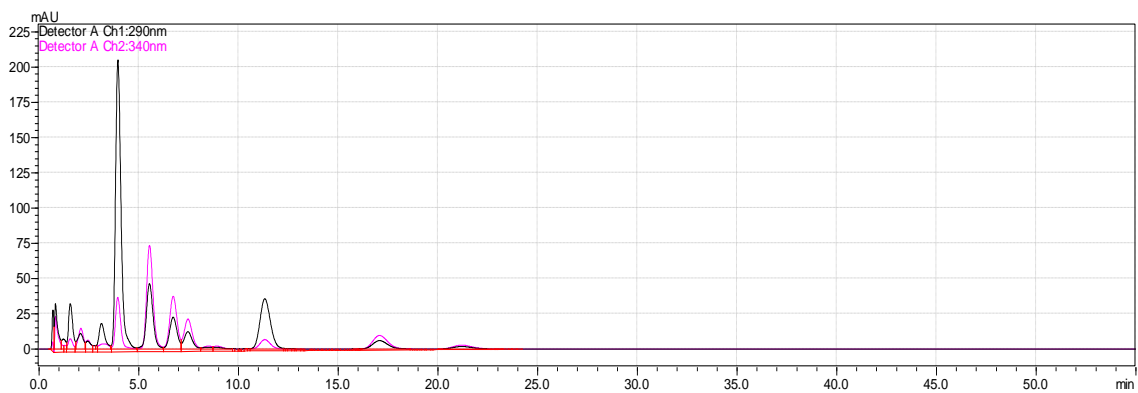
(II)



**Figura 9.** Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla granizera del apiario “Nico”

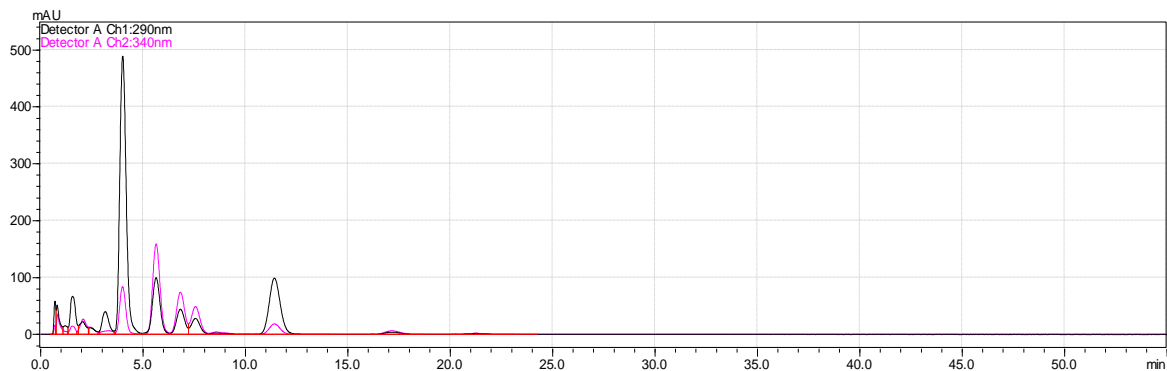


(III)



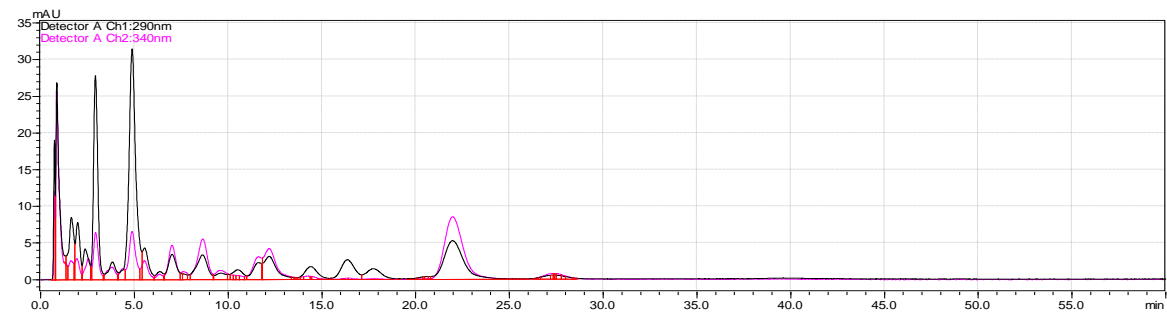
**Figura 10.** Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Panteón”

(III)



**Figura 11.** Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla granizera del apiario “Panteón”

(IV)

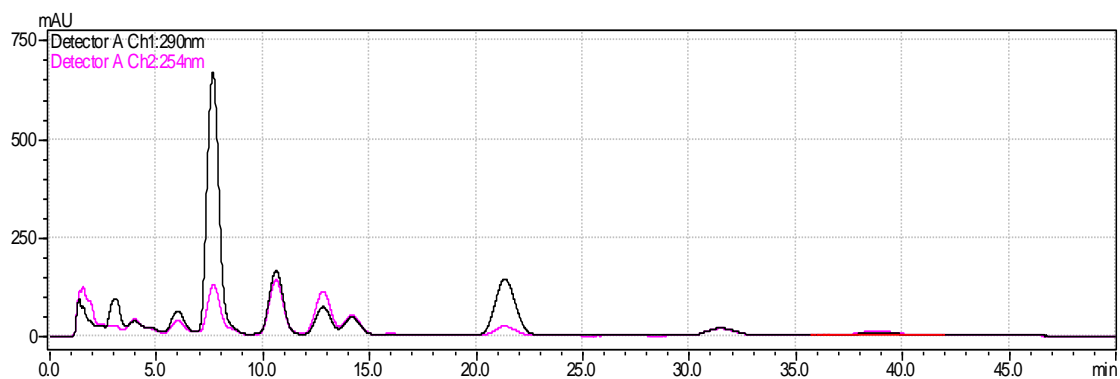


**Figura 12.** Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Trojes”



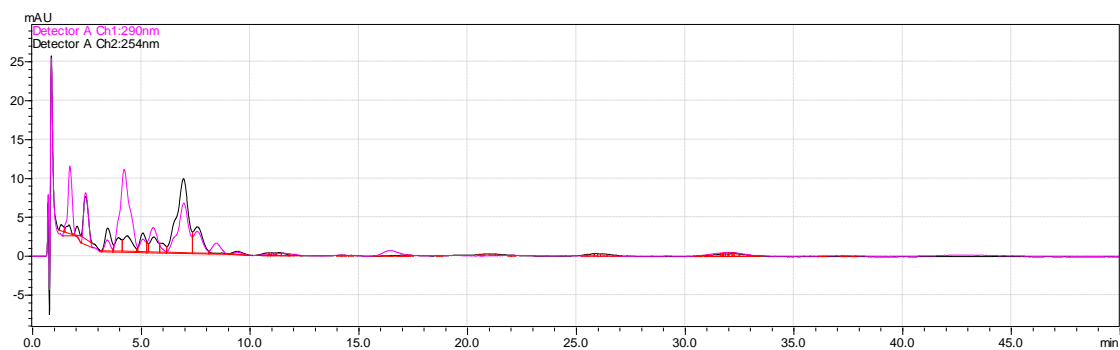


(IV)



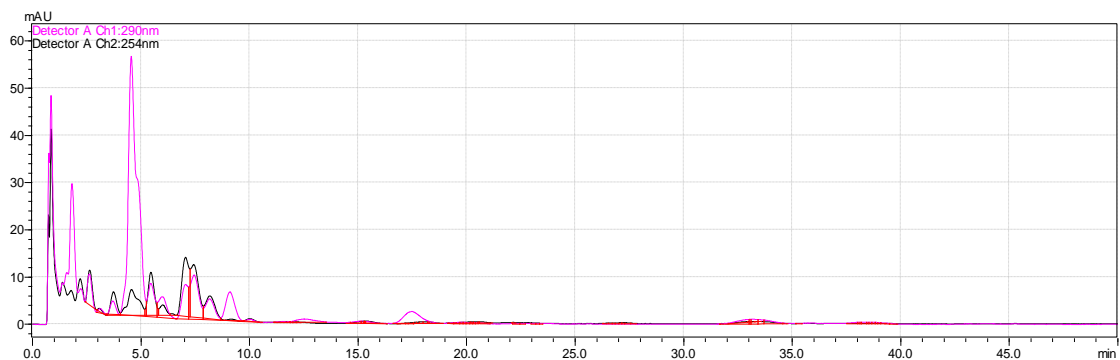
**Figura 13.** Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla granizera del apiario “Trojes”

(V)



**Figura 14.** Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla granizera del apiario “Acuexcomatl”

(V)

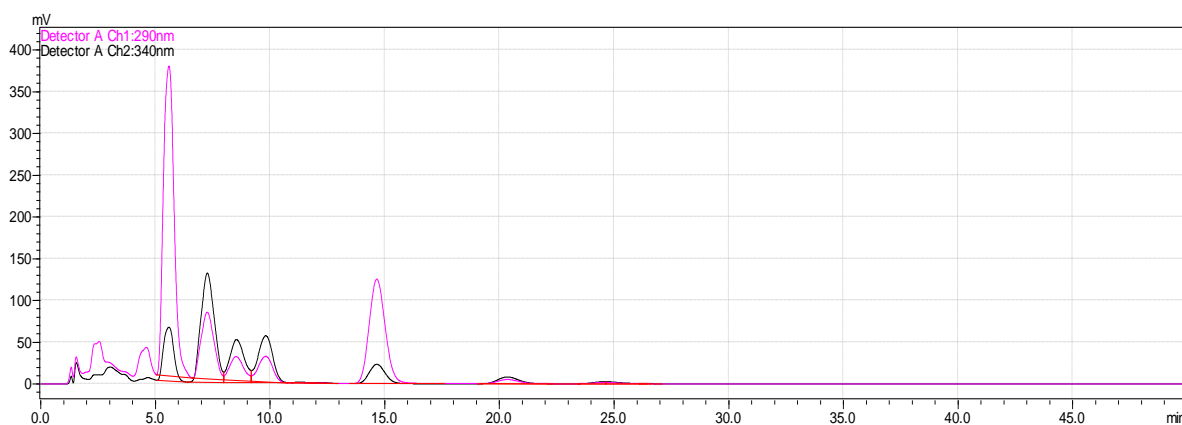


**Figura 15.** Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla granizera del apiario “Acuexcomatl”



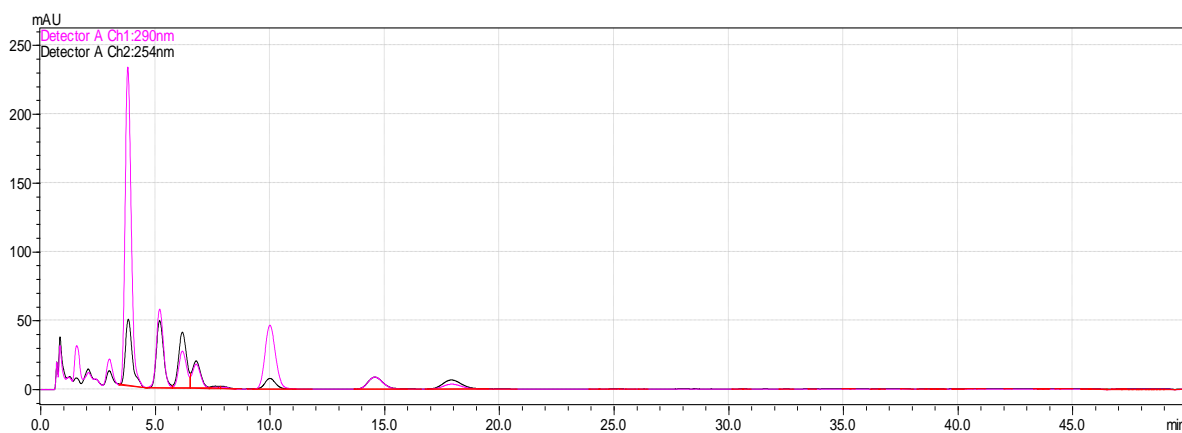
En las Figuras 16-25 se ilustran los cromatogramas obtenidos durante el análisis de los propóleos provenientes de los apiarios “Búho”(I), “Nico” (II), “Panteón” (III), “Trojes” (IV) y “Acuexcomatl” (V), durante la primera, segunda y tercera colecta con malla “sombra” observándose la presencia de los 5 marcadores químicos: pinocembrina (a), acacetina (b), galangina (c), 4',7, dimetilnaringenina (d) y 4',7 dimetilapigenina (e).

(I)



**Figura 16.** Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “El Búho”

(I)



**Figura 17.** Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla sombra del apiario “El Búho”



(II)

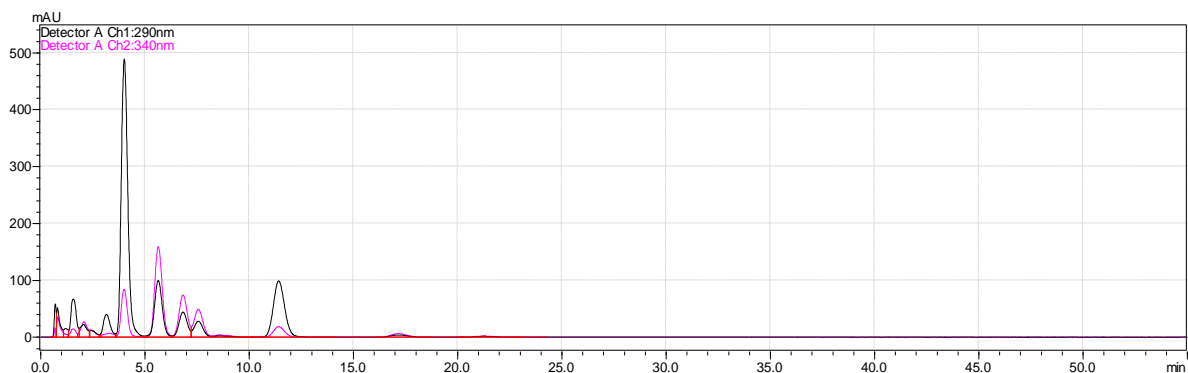


Figura 18. Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “Nico”

(II)

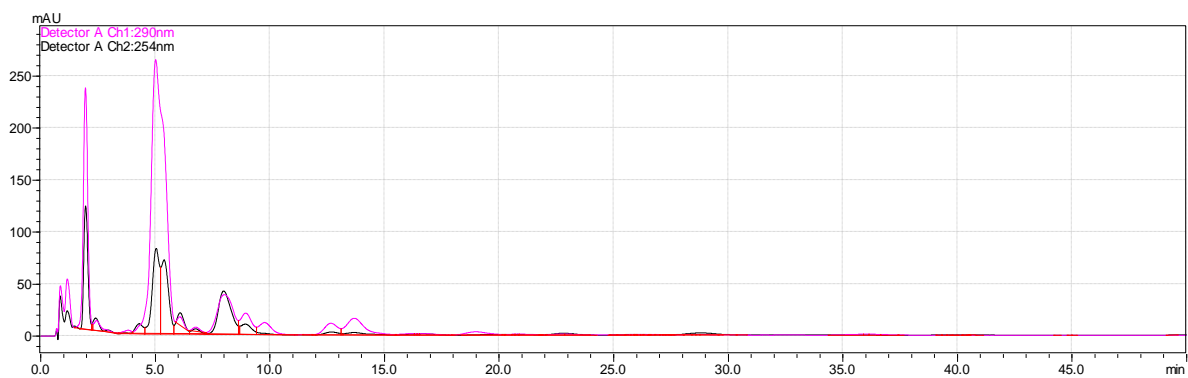


Figura 19. Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla sombra del apiario “Nico”

(III)

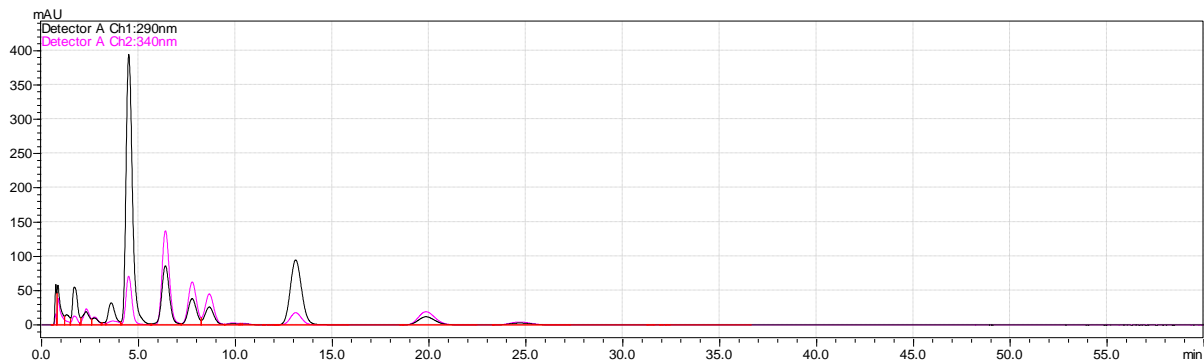
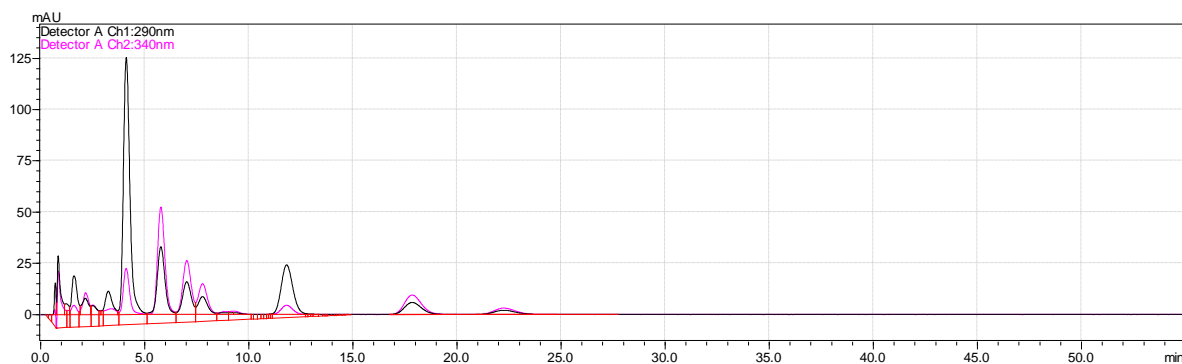


Figura 20. Cromatograma del extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “Panteón”

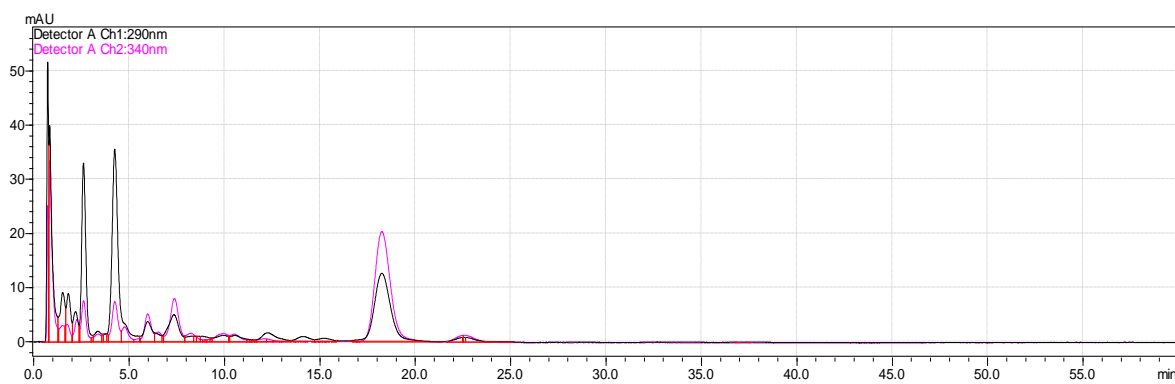


(III)



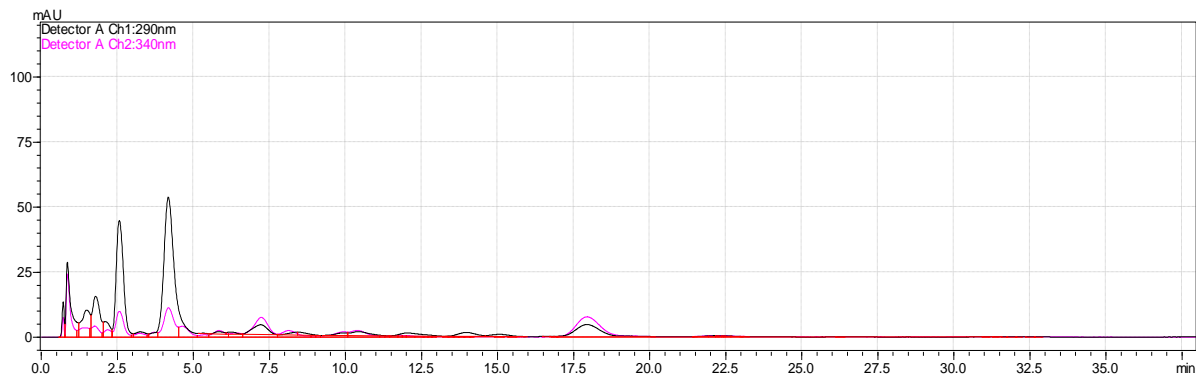
**Figura 21.** Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla sombra del apiario “Panteón”

(IV)



**Figura 22.** Cromatograma del extracto etanólico, segunda colecta, malla sombra del apiario “Trojes”

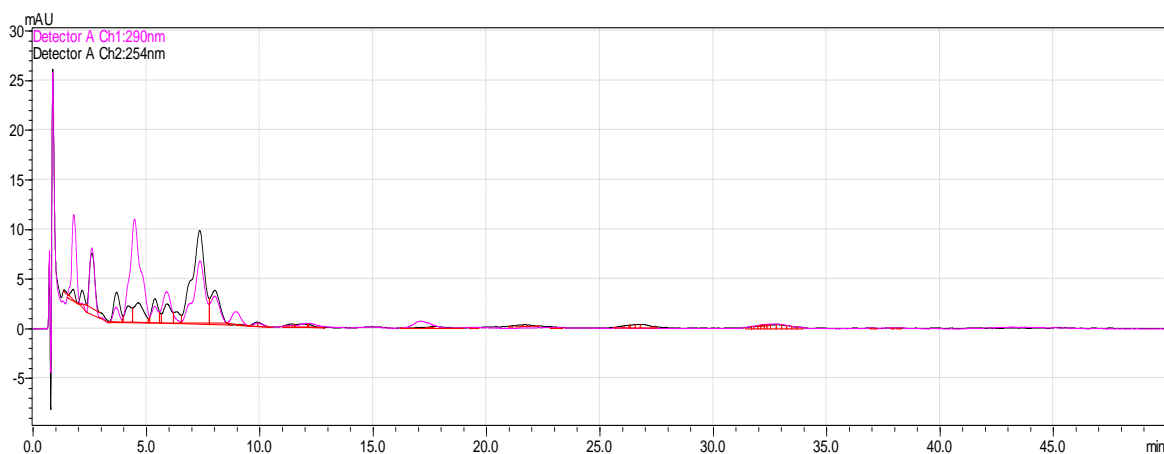
(IV)



**Figura 23.** Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla sombra del apiario “Trojes”

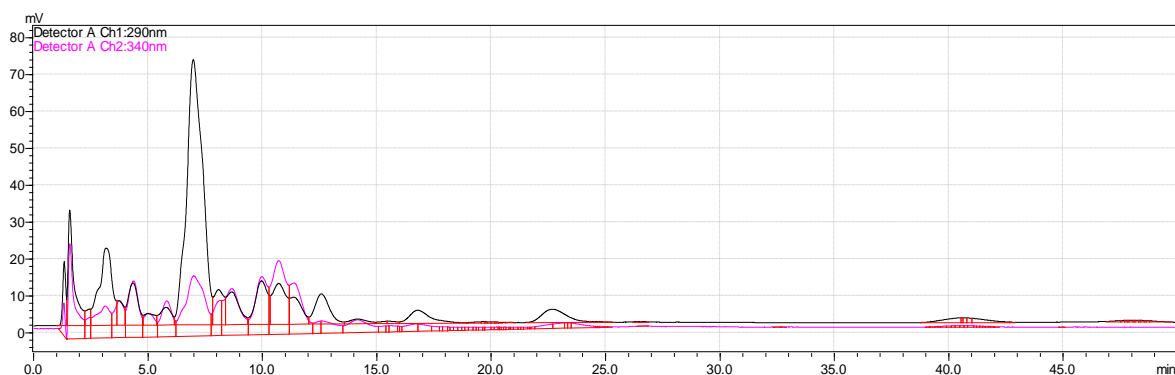


(V)



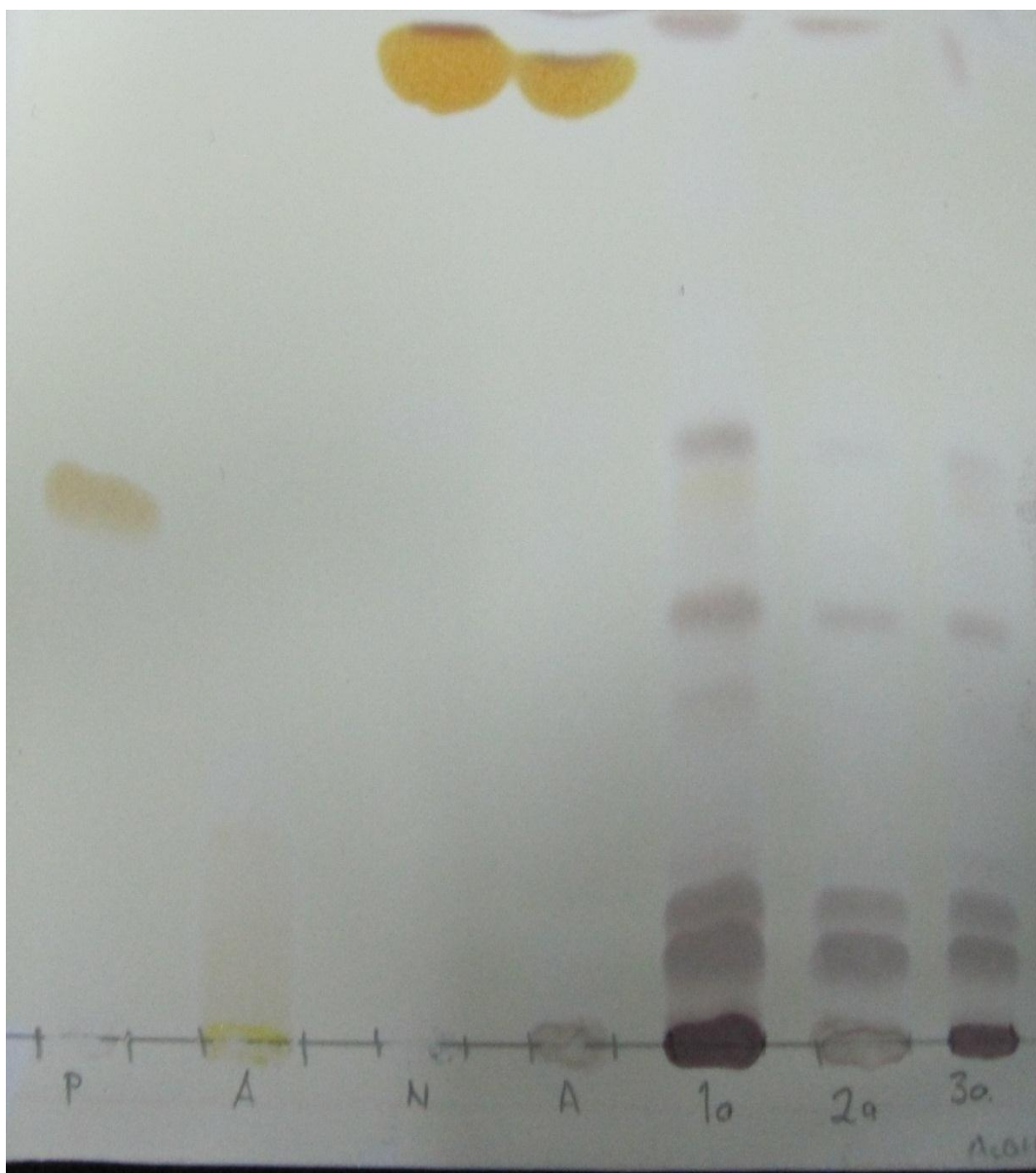
**Figura 24.** Cromatograma de extracto etanólico, primera colecta, malla sombra del apiario “Acuexcomatl”

(V)



**Figura 25.** Cromatograma del extracto etanólico, tercera colecta, malla sombra del apiario “Acuexcomatl”

Como se puede observar en las Figuras 14, 15, 24 y 25 en los extractos preparados con el propóleo proveniente del apiario “Acuexcomatl” no fue posible identificar de forma clara a los flavonoides utilizados como marcadores. Para ello se optó por realizar la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) usando estándares de pinocembrina, acacetina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina para realizar dicha identificación. En la Figura 26 se ilustra la cromatoplaca obtenida.



**Figura 26.** Cromatoplaqueta del extracto de propóleo y compuestos identificados. Carriles **P**: pinocembrina; **A**: acacetina; **N**: 4',7-dimetilnaringenina; **A'**: 4',7-dimetilapigenina. **1a**: Primera colecta del apiario "Acuexcomatl", **2a**: Segunda colecta del apiario "Acuexcomatl" **3a**: Tercera colecta del apiario "Acuexcomatl"

Como puede apreciarse en la Figura anterior, en las colectas del apiario "Acuexcomatl" sólo se identificó la presencia de pinocembrina.



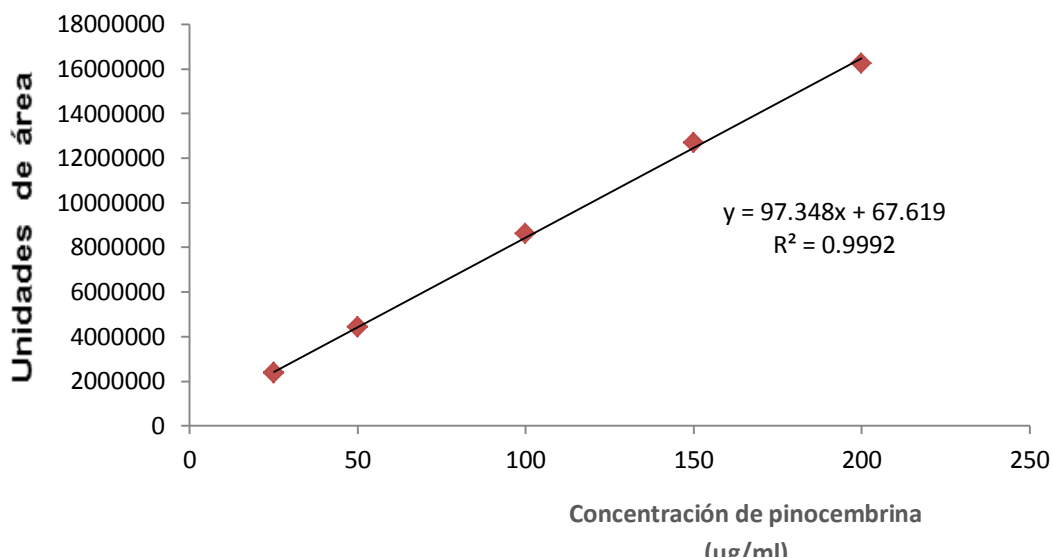
## 5.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MARCADORES

Para cuantificar la concentración de cada flavonoide en los extractos se prepararon 4 curvas de calibración con 5 niveles de concentración.

El manejo de los datos se realizó por medio de una regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados fueron la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el intervalo de confianza para la pendiente [IC ( $\beta_1$ )] y el intervalo de confianza para la ordenada al origen [IC ( $\beta_0$ )]. La linealidad del sistema se evaluó de manera independiente para cada flavonoide. El análisis estadístico de los datos permitió estimar el siguiente modelo para la pinocebrina:

$$\text{Área} = 67.619 - 97.348 * \text{Concentración}$$

En este caso, el coeficiente de determinación calculado indicó que el 99.9% de la variabilidad total en la respuesta obtenida es explicada por el modelo propuesto (Tabla 12 y Gráfica 5). El valor negativo y positivo de los límites inferior y superior del intervalo de confianza para la ordenada al origen indica la inclusión del cero en contraste, con el intervalo de confianza para la pendiente. Por lo tanto, el modelo cumple con las especificaciones de linealidad y puede emplearse para calcular la concentración de la pinocebrina.



Gráfica 5. Relación lineal entre las variables para la pinocembrina

<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	<b>67.619</b>	
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	<b>97.348</b>	
<b>Coefficiente de correlación (r)</b>	<b>0.9992</b>	
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	<b>0.9985</b>	
<b>INTERVALOS DE CONFIANZA</b>		
	<b>LIMITE INFERIOR</b>	<b>LIMITE SUPERIOR</b>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	-748992	844334
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	81331.7	83926.7

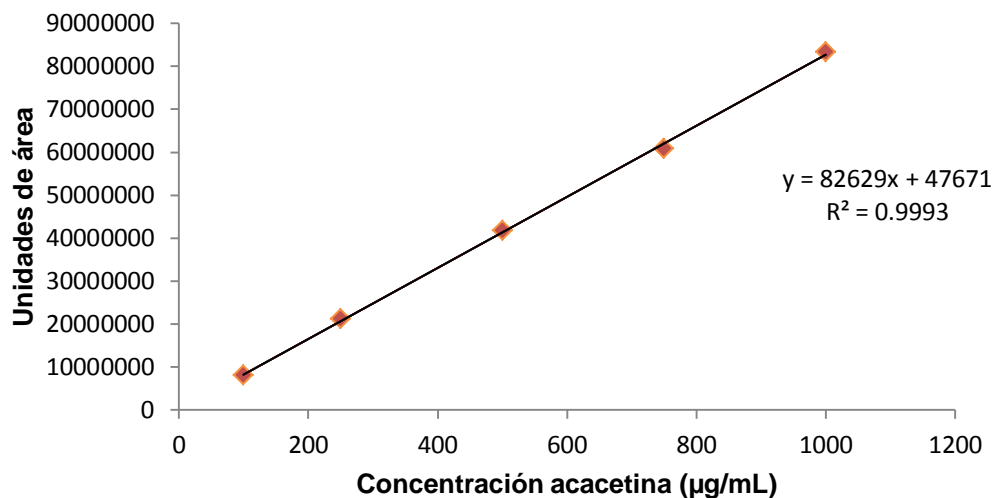
Tabla 12. Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la pinocembrina

Por otra parte, el análisis estadístico de los datos permitió estimar el siguiente modelo para la acetina:

$$\text{Área} = 47671 + 82629 * \text{Concentración}$$

En este caso, el coeficiente de determinación calculado indica que el 99.9% de la variabilidad total en la respuesta obtenida es explicada por el modelo propuesto (Tabla 13 y Gráfica 6). De nueva cuenta el valor negativo y positivo de los límites inferior y superior del intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye el cero en contraste, con el intervalo de confianza para la pendiente. Por lo tanto, el modelo cumple con las especificaciones de linealidad y puede emplearse para calcular la concentración de la acetina.





Gráfica 6. Relación lineal entre las variables para la acetina.

Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	47671.3	
Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	82629.3	
Coefficiente de correlación (r)	0.9996	
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9993	
<b>INTERVALOS DE CONFIANZA</b>		
	<b>LIMITE INFERIOR</b>	<b>LIMITE SUPERIOR</b>
Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	-748992	844334
Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	81331.7	83926.7

Tabla 13. Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la acetina.

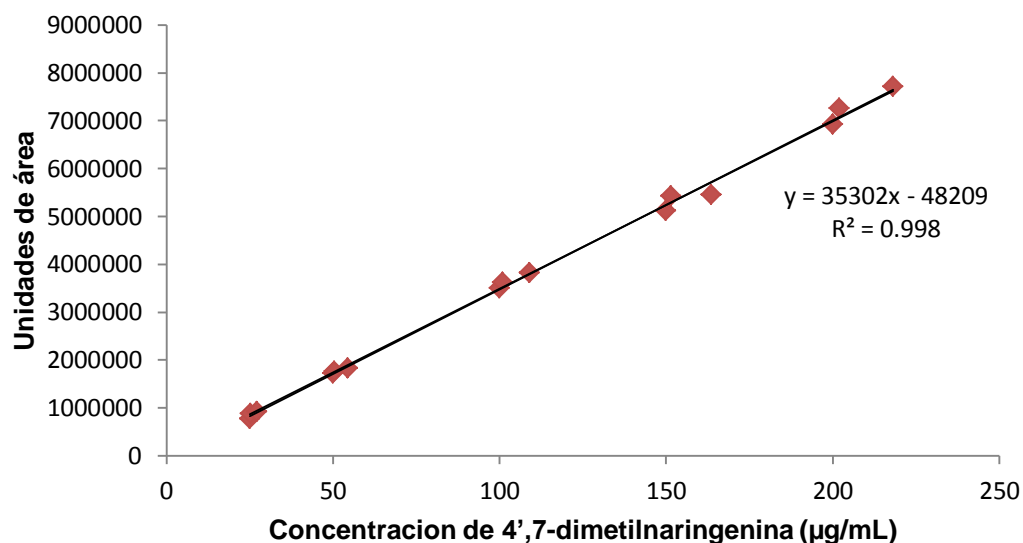
El análisis estadístico de los datos permitió estimar el siguiente modelo para la 4',7-dimetilnaringenina:

$$\text{Área} = -48208.6 + 35302.3 * \text{Concentración}$$

En la Tabla 14 y en la Gráfica 7 se resumen los parámetros estadísticos del modelo. El valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) permite establecer que el 99.8% de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por dicho modelo. Aún más, el intervalo de confianza obtenidos con un 95 % de confianza para la ordenada al origen incluye el cero mientras que para la pendiente no está incluido. Por lo tanto, la curva de calibración cumple con las especificaciones para la



linealidad del sistema y se puede utilizar para calcular la concentración de la 4',7-dimetilnaringenina.



Gráfica 7. relación lineal entre las variables para la 4',7-dimetilnaringenina.

Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	<b>-48208.6</b>	
Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	35302.3	
Coefficiente de correlación (r)	0.9989	
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9979	
<b>INTERVALOS DE CONFIANZA</b>		
	<b>LIMITE INFERIOR</b>	<b>LIMITE SUPERIOR</b>
Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	-169916.7	73499.5
Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	34345.3	36259.2

Tabla 14. Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la 4',7-dimetilnaringenina.

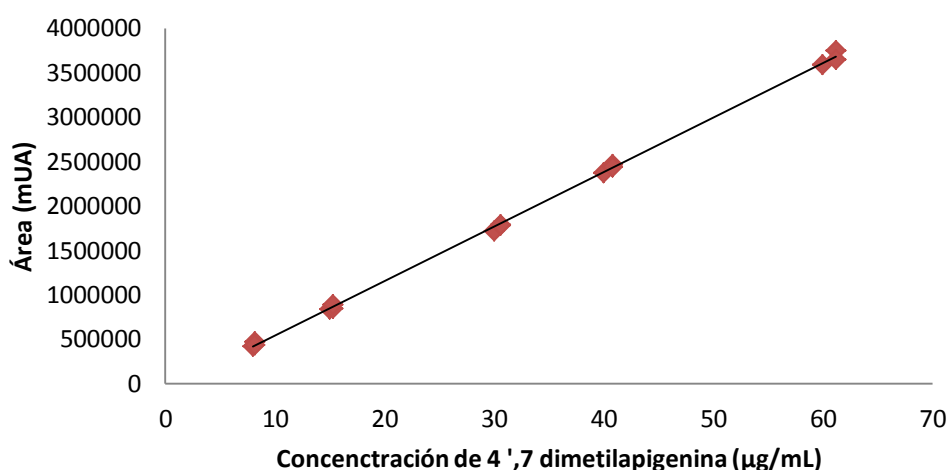
Con respecto a la 4',7-dimetilapigenina, el modelo de regresión lineal calculado para evaluar este parámetro fue:

$$\text{Área} = -72453.17 + 61281.34 * \text{Concentración}$$

En la Gráfica 8 se puede observar la tendencia lineal entre los datos obtenidos. En este caso, el coeficiente de determinación calculado indica que el 99.9% de la variabilidad total en la respuesta (área bajo la curva) obtenida es explicada por el



modelo propuesto. El valor negativo y positivo de los límites inferior y superior del intervalo de confianza (IC) para la ordenada al origen indican la inclusión del cero en contraste con el IC para la pendiente (Tabla 15). Por lo tanto, el modelo cumple con todos los criterios de aceptación establecidos para la linealidad del sistema empleando a la 4',7-dimetilapigenina como analito.



Gráfica 8. Relación lineal entre las variables para la 4',7-dimetilapigenina.

<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	<b>-72453.1724</b>	
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	<b>61281.3437</b>	
<b>Coefficiente de correlación (r)</b>	<b>0.999645</b>	
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	<b>0.999289</b>	
<b>INTERVALOS DE CONFIANZA</b>		
	<b>LIMITE INFERIOR</b>	<b>LIMITE SUPERIOR</b>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	<b>-107925.0420</b>	<b>-36981.3030</b>
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	<b>60302.1209</b>	<b>62260.5665</b>

Tabla 15. Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la 4',7-dimetilapigenina

Una vez obtenidas las ecuaciones de regresión lineal para cada flavonoide se calculó su concentración en cada extracto. Los resultados se resumen en las Tablas 16-19 y en las Gráficas 9-12.

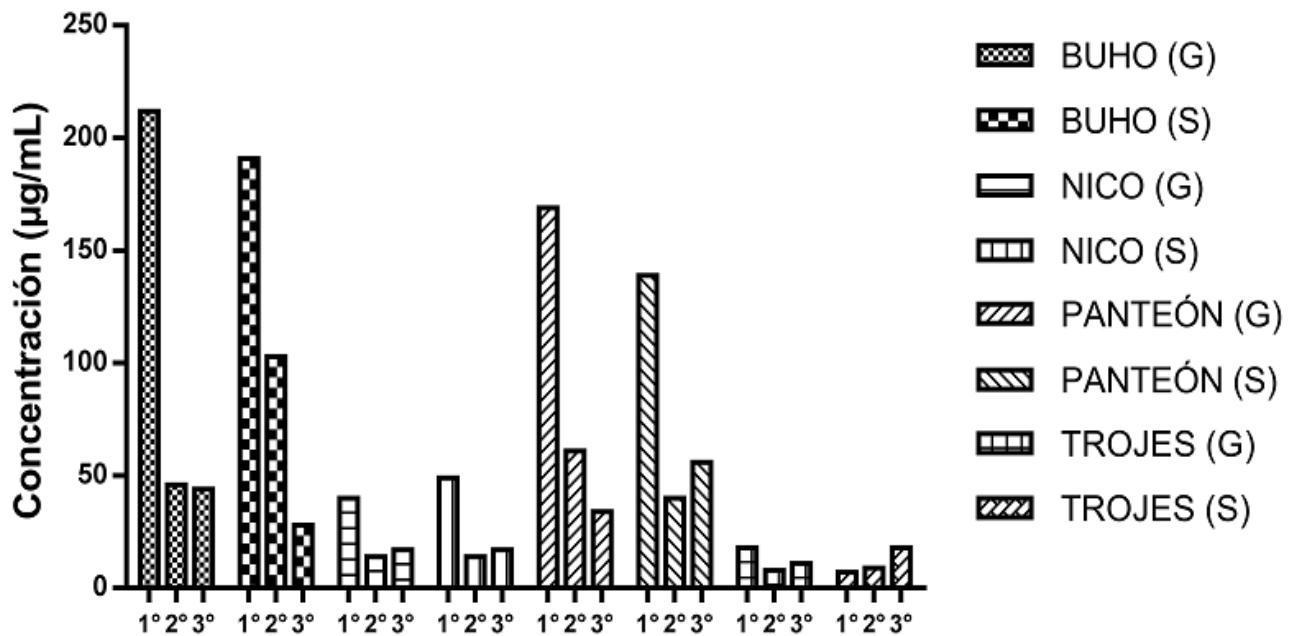


### PINOCEMBRINA

Apiario	Concentración (µg/ml) 1ª colecta	Concentración (µg/ml) 2ª colecta	Concentración (µg/ml) 3ª colecta	Concentración (µg/ml) 1ª colecta	Concentración (µg/ml) 2ª colecta	Concentración (µg/ml) 3ª colecta
	G R A N I Z E R A			S O M B R A		
Búho	212.7+5.9	46.8+0.6	44.2+2.1	191.2+9.6	103.7+66.9	28.9+0.1
Nico	33.9+11.2	13.9+0.7	17.6+1.9	49.3+2.3	13.9+0.7	17.6+9.2
Panteón	168.9+25.9	61.8+3.0	34.1+1.1	139.2+7.8	40.0+1.4	55.9+2.9
Trojes	18.7+0.9	8.8+0.7	11.8+0.7	7.3+0.6	9.0+0.3	18.7+1.1

Tabla 16. Cuantificación de Pinocebrina (SD).

### PINOCEMBRINA



Gráfica 9. Relación entre la concentración de pinocembrina (µg/mL) y recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).

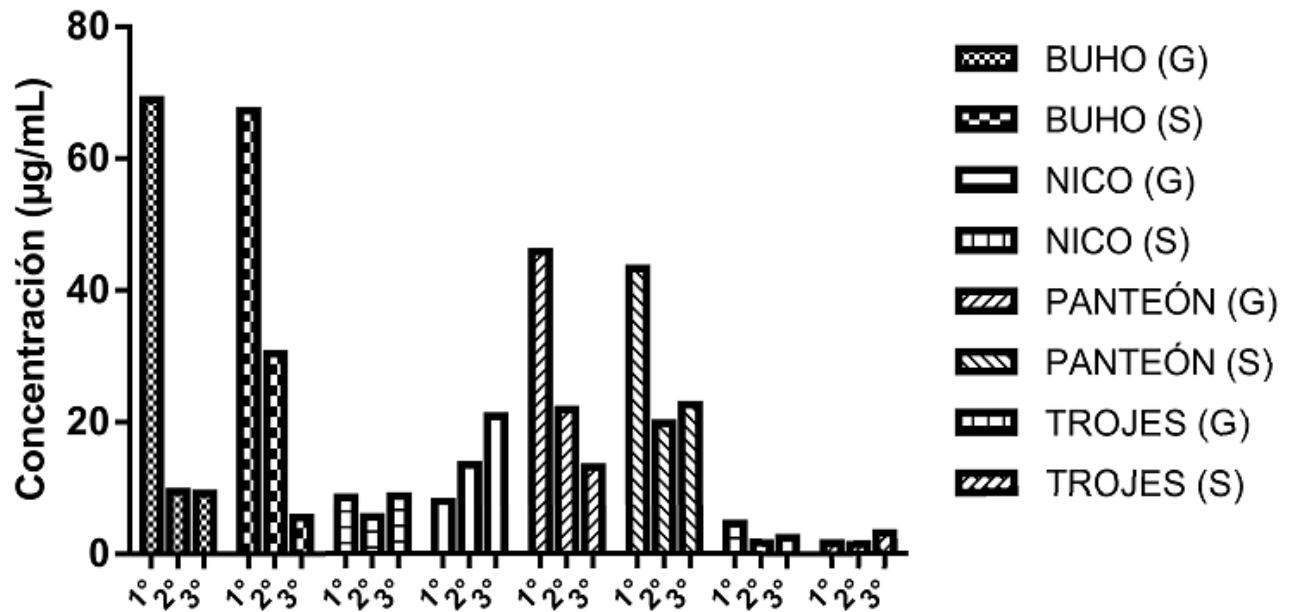


### ACACETINA

Apiario	Concentración (µg/ml) 1ª colecta	Concentración (µg/ml) 2ª colecta	Concentración (µg/ml) 3ª colecta	Concentración (µg/ml) 1ª colecta	Concentración (µg/ml) 2ª colecta	Concentración (µg/ml) 3ª colecta
G R A N I Z E R A			S O M B R A			
Búho	68.9±1.2	9.4±0.1	9.2±0.4	67.3±2.4	30.4±29.9	5.5±0.2
Nico	8.6±1.9	5.5±2.3	8.8±1.0	7.9±9.8	13.5±8.7	20.9±1.4
Panteón	45.8±15.7	21.9±0.9	13.2±0.5	43.3±0.8	19.8±0.4	22.7±0.3
Trojes	4.5±0.2	1.7±0.1	2.5±0.1	1.6±0.2	1.4±0.1	3.2±0.2

Tabla 17. Cuantificación de Acacetina (SD).

### ACACETINA

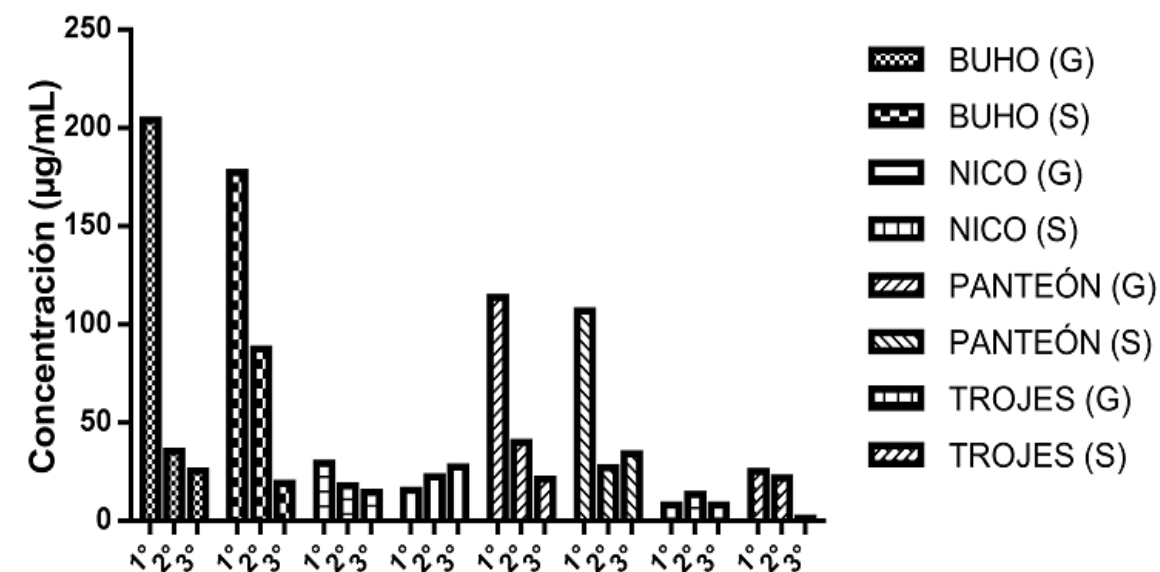


Gráfica 10. Relación entre la concentración de acacetina (µg/mL) y recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).

**4',7 DIMETILNARINGENINA**

Apiario	Concentración (µg/ml) 1ª colecta	Concentración (µg/ml) 2ª colecta	Concentración (µg/ml) 3ª colecta	Concentración (µg/ml) 1ª colecta	Concentración (µg/ml) 2ª colecta	Concentración (µg/ml) 3ª colecta
	G R A N I Z E R A			S O M B R A		
Búho	204.1±0.4	35.4±8.5	25.6±0.6	177.2±3.1	87.7±76.8	19.1±0.1
Nico	29.4±5.2	17.9±5.5	14.6±1.1	15.7±8.0	22.7±8.2	27.5±3.6
Panteón	113.9±17.1	40.1±1.9	21.4±0.7	106.8±8.9	27.1±0.8	34.1±1.8
Trojes	8.3±1.5	13.7±1.1	8.2±0.9	25.3±2.5	21.8±1.1	1.5±0.1

Tabla 18. Cuantificación de 4',7-dimetilnaringenina (SD).

**4'-7-DIMETILNARINGENINA**

Gráfica 11. Relación entre la concentración de 4,7-dimetilnaringenina (µg/mL) y recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).

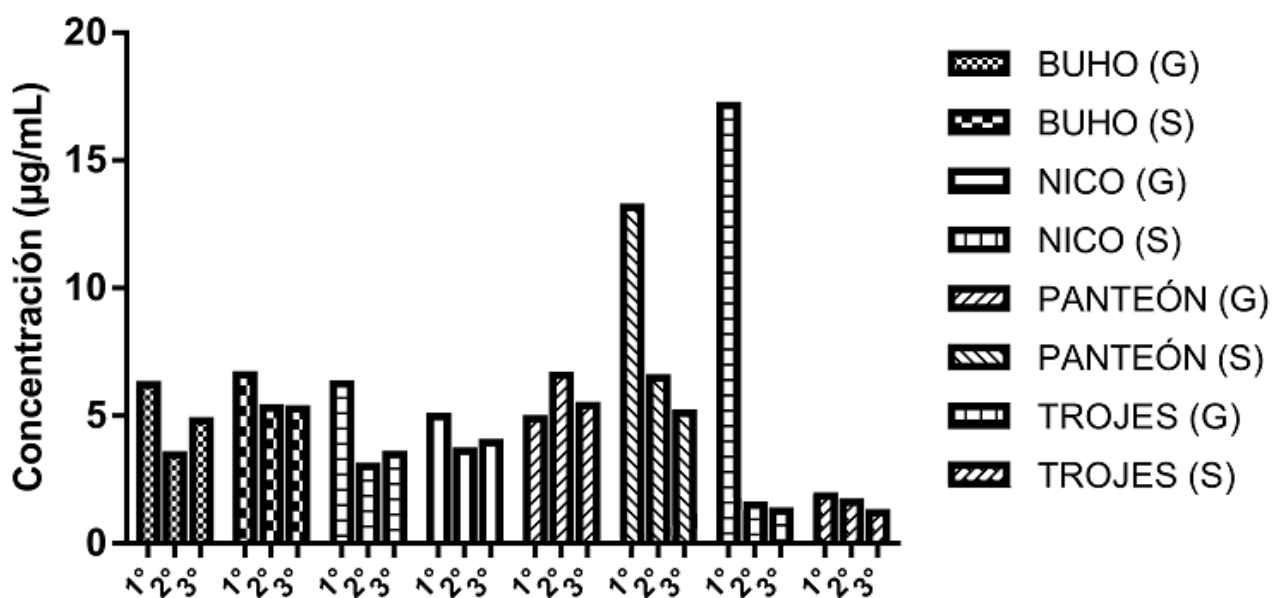


## 4',7 DIMETILAPIGENINA

Apiario	Concentración (µg/ml) 1 <sup>a</sup> colecta	Concentración (µg/ml) 2 <sup>a</sup> colecta	Concentración (µg/ml) 3 <sup>a</sup> colecta	Concentración (µg/ml) 1 <sup>a</sup> colecta	Concentración (µg/ml) 2 <sup>a</sup> colecta	Concentración (µg/ml) 3 <sup>a</sup> colecta
	G R A N I Z E R A			S O M B R A		
Búho	6.2±0.04	3.4±0.03	4.8±0.1	6.6±0.02	5.3±1.1	5.2±0.3
Nico	6.2±2.2	3.0±1.6	3.4±0.4	4.9±0.5	3.6±2.1	3.9±1.1
Panteón	4.8±0.5	6.5±0.3	5.4±0.1	13.1±0.3	6.4±0.1	5.1±0.2
Trojes	17.1±1.7	1.5±0.06	1.2±0.02	1.8±0.07	1.6±0.02	1.2±0.04

Tabla 19. Cuantificación de 4',7-dimetilapigenina (SD).

## 4'7-DIMETILAPIGENINA



Gráfica 12. Relación entre la concentración de 4,7-dimetilapigenina (µg/mL) Vs. Recolecta de cada apiario en malla granizera (G) y malla sombra (S).



De manera general, la mayor concentración de pinocembrina, acacetina y 4',7-dimetilnaringenina se cuantificó en los propóleos del apiario “El búho” durante en la primera colecta. En contraste la mayor concentración de 4',7-dimetilapigenina se encontró en el apiario “Trojes” durante el mes de agosto.





## 5. CONCLUSIONES

- ▶ Mediante el empleo de un diseño factorial se estableció que la mayor concentración de todos los flavonoides se obtuvo con el propóleo recolectado del apiario “El búho” ubicado en la delegación Milpa Alta durante el mes de agosto, en contraste con el apiario “Nico” ubicado en la delegación Tlalpan.
- ▶ Para el caso de la pinocembrina, acacetina y la 4',7-dimetilapigenina la interacción entre los factores A (apiario) y B (tipo de malla) es significativa, mientras que para la 4',7-dimetilnaringenina, la interacción entre los factores es independiente.
- ▶ El análisis del extracto por HPLC permitió identificar a la acacetina, la 4',7 dimetilapigenina, la galangina, la 4',7 dimetilnaringenina y la pinocembrina como los constituyentes mayoritarios del propóleo perteneciente a la región del altiplano en México.
- ▶ El análisis por CCF para el apiario “Acuexcomatl” permitió observar la presencia de pinocembrina y otros compuestos aun no identificados.
- ▶ Al cuantificar los flavonoides se pudo determinar que la mayor concentración de pinocembrina, acacetina y 4',7-dimetilnaringenina se cuantificó en los propóleos del apiario “El búho” durante en la primera colecta. En contraste la mayor concentración de 4',7-dimetilapigenina se encontró en el apiario las Trojes durante el mes de agosto.



## 6. PERSPECTIVAS

- ▶ Aplicar el diseño factorial para evaluar otros factores en la producción de marcadores químicos de propóleos en los apiarios no estudiados de la zona del altiplano mexicano. De este modo asegurar los factores determinantes para el control de calidad de este producto natural.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Asis, M. Los productos de la colmena. Ed. CIDA, La Habana, Cuba, 1989.
2. Bankova, V., Christov, R., Stoev, G., Popov, S., Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 1992, 607, 150-153.
3. Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005a, 100, 114-117.
4. Bankova, V., Recent trends and important developments in propolis research. *Recent trends in propolis research*, 2005b, 2, 29-32.
5. Bojnansky, V., V. Kolsjarova. Efectos inhibitorios del propóleo en algunos virus de las plantas en propóleos. Ed. Apimondia, Rumania, 1995, 54-59.
6. Burdock, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food Chemical Toxicology*, 1998, 36, 347-363.
7. Campo, M., Cuesta, O., Rosado, A., Montes de Oca, R., Márquez, I., Piccinelli, A., Rastrelli, L. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 9927-9932.
8. Castaldo, S. y Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002, 73 (1), S1-S6.
9. Chen, Y.W., Wu, S.W., Ho, K.K., Lin, S.B., Huang, C.Y., Chen, C.N., Characterization of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 74, 412-419.
10. Chopra, S., Pillai, K., Husain S., Propolis protects against doxorubicin-induced Myocardiopathy in Rats, en *Exp-Mol-Pathol*, 62/3, 1995, 190-198.



11. Cizmarik, J. Acción del propóleo sobre levaduras, XXV Congreso Internacional de Apicultura de Apimondia, 1995, 221-223
12. Crisan, I., Mutiu A. Acción del propóleos en virus herpético *in vitro*. II simposio Internacional de Apoterapia, Bucarest, Ed. Apimondia, Rumania, 1996, 196-202.
13. Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B.A., Ramirez-Apan, T., Cárdenas, J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 2002, 57, 372-378.
14. Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C. Drezza. F.T., Pobia. Factors that influence the yield and composition of Brazilian Propolis extracts. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2004, 15, 964-970.
15. Dausch, A., Moraes, C.S., Fort, P., Park, Y.K., Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *Evidence based Complementary and Alternative Medicine*, 2008, 5, 435-441.
16. Echazarreta, C., Quezada-Euan J.J.G., Beekeeping in the Yucatán Península. *Bee World*, 1997, 78 (3): 115-127
17. Giral, T., Guzmán G., Estudio preliminar de la actividad antiviral de un extracto acuoso de propóleo rojo. Trabajo presentado en IV simposio de Propóleos y III de Apiterapia, La Habana, Cuba, 1996.
18. González A.R. y R. Bernal. 2002. Propóleos: Un camino hacia la salud. Ed. Pablo de la Torre. La Habana, Cuba. 7-132
19. Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., Composition of propolis of Oxfordshire, UK, and its relation to poplar bud exudate. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 1988, 43, 301-304.



20. Hernández, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, 2007, 73, 1469-1474.
21. Hernández, I., Cuesta, O., Fernández, M., Pérez, A. Studies of the constituents of yellow Cuban propolis: GS-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 4725-4730.
22. Hollands I., Torres, D., Control de la calidad de la propolisina utilizada como anti-giardiasico. Memorias del I Simposio sobre los Efectos del Propóleo en la Salud Humana y Animal, Varadero, 1988.
23. Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 2009, 116, 452-461.
24. Koo, H., P.L. Rosalen, J.A. Cury, Bowen W. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 2002, 46, 1302-1309.
25. Kumazawa, S., Nakamura, J., Murase, M., Miyagawa, M., Ahn, M., Fukumoto, S. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften*, 2008, 95, 781-786.
26. Lotti, C., Campo-Fernández, M., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Márquez-Hernández, I., Rastrelli, L. Chemical constituents of red mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 2209-2213.
27. Marcucci, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, 1995, 26, 83-99.



28. Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis, 1996, 42, 205-211.
29. Martinez C. Diana. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar la 4',7'-dimetilapigenina en propóleos mexicanos. 2012. Tesis de licenciatura.
30. Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 2002,17, 271-278.
31. Melliou, E., Chinou, I. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta médica*. 2004, 70, 515-519.
32. Missima, F. Pagliarone, A.C., Orsatti, C.L., Sforcin, J.M. The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2009, 1, 11-15.
33. Missima, F. Pagliarone, A.C., Orsatti, C.L. Araújo Jr., Sforcin, J.M. Propolis effect on TH1/TH2 cytokines expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phytotherapy Research*, 2010, 24, 1501-1507.
34. Montgomery, D. Diseño y análisis de experimentos, Limusa Wiley, 2ª. edición, 2011, 228-246.
35. Naggy, E., Papay, V., Litkei, G., Dinya, Z. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. *Studies in Organic Chemistry (Amsterdam)*, 1986, 23, 223-232.
36. Orsatti, C. I., Missima, F., Pagliarone, A. C., Bachiega, T. F., Búfalo, M.C., Araújo Jr., J. P., Sforcin, J.M., Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, 2010, 24,1141-1146.



37. Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., Plessi, M. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 60, 2852–2862.
38. Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., Plessi, M. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. *Int. Journal of Food Science Technology*, 2010, 45, 1610–1618.
39. Park, Y. K.; Fukuda, I.; Ashida, H.; Nishiumi, S.; Yoshida, K.; Dausch, A.; Sato, H. H.; Pastore, G. M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 10306–10309.
40. Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, G.A., Marcazzan, G.L., Bogdanov, S. Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochemical Analysis*, 2004, 15(4), 235–240.
41. Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., Bankova, V., Antimicrobial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 2005, 12, 221-228.
42. Popova, M., Graikou, I., Chinou, I., Bankova, V. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 3167-3176.
43. Popravko, S.A., Chemical composition of propolis, its origin and standardization in a remarkable hive product, *Apimondia Publishing House, Bucharest*, 1978, 15-18.
44. Rojas, N., Lugo, S., Efecto antifúngico del propóleo sobre cepas del género *Candida*. Memorias del I Simposio sobre los Efectos del Propóleo en la Salud Humana y Animal, Varadero, 1988, 42-53.



45. Rouessac, A. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. Análisis Químico. *Mc Graw Hill*, Madrid, 2003. 9-79.
46. Salatino, A., Fernandez-Silva, C., Righi, A., Salatino, L. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Products Reports*, 2011, 28, 925-936.
47. Sforcin, J.M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 113, 1–14.
48. Sforcin, J.M., Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 133(2), 253–260.
49. Trespalcios, L., Torres, D., Efecto del propóleo sobre el crecimiento in vitro de la *Giardia lamblia*. Trabajo presentado en el IV Simposio del propóleos y III de Apiterapia, La Habana, Cuba, 1996.
50. Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Naydensky, C., Sabatini, A.G. A new type of European propolis, containing bioactive labdanes, *Rivista Italiana*, 2003, 36, 3-7.
51. Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 2007, 7, 1-13.
52. Villar del Fresno, A., Farmacognosia general. Ed. Síntesis, Madrid, 1999. 87-93; 209-217





## 8. ANEXOS

## ANEXO I.

**Tabla 20.** Análisis de Varianza para concentración de acetina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:apiario	4111.2	1	4111.2	298.16	0.0000
B:malla	14.137	1	14.137	1.03	0.3285
C:mes de colecta	4400.09	1	4400.09	319.11	0.0000
AB	106.36	1	106.36	7.71	0.0148
AC	6798.64	1	6798.64	493.06	0.0000
BC	43.5824	1	43.5824	3.16	0.0971
ABC	83.0599	1	83.0599	6.02	0.0278
Bloques	28.5541	2	14.277	1.04	0.3807
Error total	193.042	14	13.7887		
Total (corr.)	15778.7	23			

$$r^2 = 98.7766 \%$$

$$r^2 = (\text{ajustada por g.l.}) = 98.2413 \%$$

**Tabla 21.** Análisis de Varianza para concentración de 4',7-dimetilnaringenina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:apiario	54950.4	1	54950.4	20499.45	0.0000
B:malla	198.379	1	198.379	74.01	0.0000
C:mes de colecta	48762.7	1	48762.7	18191.11	0.0000
AB	712.82	1	712.82	265.92	0.0000
AC	36681.8	1	36681.8	13684.30	0.0000
BC	4.07992	1	4.07992	1.52	0.2376
ABC	732.29	1	732.29	273.18	0.0000
Bloques	0.113197	2	0.0565986	0.02	0.9791
Error total	37.5281	14	2.68058		
Total (corr.)	142080.	23			

$$r^2 = 99.9736 \%$$

$$r^2 = (\text{ajustada por g.l.}) = 99.962 \%$$

**Tabla 22.** Análisis de Varianza para concentración de 4',7-dimetilapigenina

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:apiario	6.72505	1	6.72505	7.83	0.0142
B:malla	0.0000571973	1	0.0000571973	0.00	0.9936
C:mes de colecta	15.9723	1	15.9723	18.59	0.0007
AB	1.02607	1	1.02607	1.19	0.2929
AC	0.39459	1	0.39459	0.46	0.5090
BC	1.23174	1	1.23174	1.43	0.2510
ABC	1.03327	1	1.03327	1.20	0.2913
Bloques	1.95564	2	0.97782	1.14	0.3483
Error total	12.0272	14	0.859085		
Total (corr.)	40.3659	23			

 $r^2 = 70.2046 \%$  $r^2$  (ajustada por g.l.) = 57.1691 %