



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANO DE UN PROPÓLEO RECOLECTADO
EN LA ZONA RURAL DEL DISTRITO FEDERAL.**

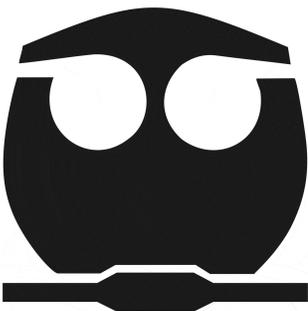
T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Titaux Delgado Gustavo Alfredo.



México D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
Secretario:	Dra. Nuria Esturau Escofet
1er. suplente:	M. en C. Abraham Madariaga Mazon
2do. suplente:	M. en C. José Alberto Rivera Chávez

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111. Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz.

Sustentante

Titax Delgado Gustavo Alfredo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por blindarme la oportunidad de pertenecer a ella y especialmente a la Facultad de Química por forjarme como profesionalista.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al personal técnico de la USAI de la Facultad de Química; a la Dra. Nuria Esturau Escofet y a la Q. Georgina A. Duarte Lisci por el registro y análisis de los espectros utilizados en este proyecto.

A los miembros del jurado por el espacio y el tiempo dedicado durante la realización del presente trabajo y por sus valiosas observaciones para mejorarlo.

A los MVZ. Adriana Correa Benítez y Ángel López Ramírez por la asesoría técnica y proporcionarnos el material vegetal utilizado en este trabajo de investigación.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: PAPIIT IN205709-3 y PICSA 10-27 “Actividad antihipertensiva de plantas y propóleos utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares”.

A mis padres Sandra Delgado Y Alfredo Titau, porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más importantes de mi vida, fruto del inmenso amor y confianza que en mi depositaron.

A los amigos que conocí en el transcurso de esta carrera: Blanca, Diana, Yoselin, Marlen, Verónica, Jazmín, Lalo, Martín, Edgar y tantos otros con los que compartí y aprendí tantas cosas que me llevaré por siempre.

A los profesores que en el transcurso de esta etapa de mi vida compartieron sus conocimientos, en especial a la profesora Rosa María Pérez Vega que me abrió la puerta al mundo de la ciencia, y junto a mi compañero de experimentos Donovan, aprendí las bases de esta hermosa ciencia que es la química.

Por último y no por eso menos importante, a esas personas que paralelamente a mi vida académica tuve la dicha de conocer: Lesly, Pamela, Dany, Betsy, Adara, María, Sneaky, Brenda, Andy, Anita, Lety, Carlos, Daniel y Luis con los cuales he compartido momentos inolvidables llenos de magia que quedarán grabados por siempre en mi corazón con las iniciales HM.





Lista de abreviaturas.....	IX
Lista de gráficas	X
Lista de tablas	X
Lista de diagramas.....	XI
Lista de figuras.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Propóleo.....	3
2.1.1. Definición y generalidades.....	3
2.1.2. Aspectos de la obtención del propóleo.....	5
2.1.2.1. Clima y flora.....	6
2.1.2.2. Raza de la abeja.....	6
2.1.2.3. Método de recolección.....	6
2.1.3. Propiedades biológicas.....	8
2.1.3.1. Capacidad antioxidante.....	8
2.1.3.2. Actividad antimicrobiana.....	9
2.1.3.3. Actividad antiviral.....	10
2.1.3.4. Actividad inmunoestimulante.....	10
2.1.3.5. Otras actividades.....	11
2.1.4. Composición.....	11
2.2. Flavonoides.....	14
2.2.1. Generalidades.....	14
2.2.2. Biosíntesis y estructura química.....	15





2.2.3. Dieta y flavonoides.....	17
2.2.4. Metabolismo y absorción.....	18
2.2.5. Actividades farmacológicas.....	18
2.3. Acción antioxidante.....	19
2.3.1. Estrés oxidante.....	19
2.3.2. Radicales libres.....	19
2.3.3. Antioxidantes.....	21
2.3.3.1. Acción antioxidante de los flavonoides.....	21
2.3.4. Efectos prooxidantes.....	23
2.4. Enfermedades de la cavidad oral.....	24
2.4.1 Caries y <i>Streptococcus mutans</i>	24
3. JUSTIFICACION.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivos generales.....	27
4.2. Objetivos particulares.....	27
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	28
5.1. Procedimientos generales.....	28
5.1.1. Análisis cromatográficos.....	28
5.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	28
5.2. Recolección del propóleo.....	29
5.3. Estudio fitoquímico del propóleo.....	29



5.3.1. Proceso de extracción	29
5.3.2. Fraccionamiento primario.....	29
5.3.3. Cuantificación de fenoles totales.....	30
5.3.4. Fraccionamiento secundario.....	30
5.3.5. Cuantificación de flavonoides.....	31
5.3.6. Obtención y purificación de los flavonoides aislados.....	31
5.3.7. Evaluación de la actividad antioxidante	33
5.3.7.1. Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS•+)	33
5.3.7.2. Actividad inhibidora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	33
5.3.8. Ensayo biológico	34
5.3.8.1. Microorganismo de Prueba	34
5.3.8.2. Determinación de la capacidad mínima inhibitoria (CMI)	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
6.1. Obtención del extracto y fraccionamiento primario	36
6.2. Determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides a partir de las fracciones primarias y secundarias	37
6.3 Aislamiento y caracterización de los compuestos encontrados	40
6.3.1. Elucidación estructural del compuesto I-B	41
6.3.2. Elucidación estructural del compuesto I-C	47
6.3.3. Elucidación estructural del compuesto II-A	53
6.4. Evaluación de la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de los compuestos puros.....	61
6.5 Actividad antimicrobiana.....	66



7. CONCLUSIÓN65

8. PERSPECTIVAS67

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS68





Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
ABTS ⁺	Radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio
AlCl_3	Tricloruro de aluminio
Ca^{2+}	Ión calcio
CAT	Catalasa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO_2	dióxido de carbono
CT	control
Cu^+	Ión cobre (I)
Cu^{2+}	Ión cobre (II)
d	Doblete
dd	Doble doblete
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical libre)
e^-	Electrón
EEP	Extracto etanólico del propóleo
ERO	Especies reactivas del oxígeno
EtOH	Etanol
Fe^{2+}	Ión hierro (II)
Fe^{3+}	Ión hierro (III)
g	Gramos
H^+	Ión hidrógeno
H_2O	Agua
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamiento
L	Litro
MeOH	Metanol



Abreviatura	Significado
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
Na ₂ CO ₃	Bicarbonato de sodio
NOE	Efecto nuclear Overhauser
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
O ₂	Oxígeno molecular
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
rpm	Revoluciones por minuto
TMS	tetrametilsilano
UFC	Unidad Formadora de Colonias
δ	Desplazamiento químico
μg	microgramo
μL	microlitro
μM	micromolar

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales.

Gráfica 2. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales.

Gráfica 3. Cuantificación de flavonoides totales.

Gráfica 4. Curva de calibración de Trolox (ABTS).

Gráfica 5. Curva de calibración de Trolox (DPPH).

Gráfica 6. Gráfica de los resultados del DPPH y ABTS.

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Composición general y componentes mayoritarios del propóleo.

Tabla 2. Compuestos aislados del propóleo.

Tabla 3. Clasificación de los flavonoides.

Tabla 4. Fracciones recolectadas.

Tabla 5. Controles para el ensayo biológico.

Tabla 6. Rendimiento obtenido en el proceso de extracción.

Tabla 7. Rendimientos obtenidos del proceso de partición.

Tabla 8. Cuantificación de fenoles totales.

Tabla 9. Compuestos aislados.

Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para la 4',7-dimetilnaringenina (**I-B**).

Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para la 3, 5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona (**I-C**).

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para la 4',7-dimetilapigenina (**II-A**).

Tabla 13. Resultados de actividad frente al ABTS.

Tabla 14. Resultados de actividad frente a DPPH .

Tabla 15. CIM de las diversas muestras.

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Fraccionamiento del extracto etanólico del propóleo.



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Muestra de propóleo.

Figura 2 .Recolección y deposito del propóleo.

Figura 3. Deposito del propóleo en las malla.

Figura 4. Estructura base de los flavonoides.

Figura 5. Producción del radical hidroxilo.

Figura 6. Estructura de la quercetina.

Figura 7. Estructura química de la 4',7-dimetilnaringenina.

Figura 8. Espectro de RMN-H¹ de la 4',7-dimetilnaringenina (**I-B**).

Figura 9. Espectro de HCQS de la 4',7-dimetilnaringenina (**I-B**).

Figura 10. Espectro 1D-NOESY. A) RMN-H¹ de la 4',7-dimetilnaringenina (**1-B**), efecto NOE observado al irradiar la señal que se encuentra en 3.83 ppm (B) y 3.81 ppm (C).

Figura 11. Estructura química de la 3, 5-dihidroxi- 4',7-dimetoxiflavona.

Figura 12. Espectro de RMN-H¹ de la 3, 5-dihidroxi- 4',7-dimetoxiflavona (**I-C**).

Figura 13. Espectro de RMN-C¹³ de la 3, 5-dihidroxi- 4',7-dimetoxiflavona (**I-C**).

Figura 14. Espectro de HCQS de la 3, 5-dihidroxi- 4',7-dimetoxiflavona (**I-C**).

Figura 15. Estructura química de la 4',7-dimetilapigenina.

Figura 16. Espectro de RMN-H¹ de la 4',7-dimetilapigenina (**II-A**).

Figura 17. Espectro de HCQS de la 4',7-dimetilapigenina (**II-A**).





Figura 18. Espectro 1D-NOESY. A) RMN- H^1 4',7-dimetilapigenina (**II-A**). Efecto NOE observado al irradiar la señal que se encuentra en 3.88 ppm (B) y en 3.89 ppm (C).

Figura 21. Reacción entre el ABTS y el antioxidante.

Figura 22. Reacción entre el DPPH y el antioxidante.

Figura 23. Diferencias estructurales entre los tres compuestos aislados.



1. INTRODUCCIÓN

Desde el surgimiento del ser humano en la Tierra, éste tuvo la necesidad de aprender a cazar, vestirse y curarse para su supervivencia. Es evidente que esta tendencia, inherente al ser humano, ha estado presente en todo momento y en todo lugar donde haya existido alguna sociedad, por primitiva que ésta parezca.

Con el transcurso del tiempo, estas comunidades practicaban de manera empírica y a base de prueba y error procesos que les ayudaban con sus actividades cotidianas, los cuales con su perfeccionamiento dieron origen a muchas de las disciplinas científicas actuales. Fueron *arquitectos* al construir chozas, *físicos* al dominar el fuego y *médicos* al curar los diversos males que les aquejaban. Con el paso de los años y el cambio de las tribus nómadas a sedentarias esos conocimientos adquiridos se consolidaron y el desarrollo de un lenguaje estructurado permitió su difusión con mucha mayor eficacia; en tanto que la jerarquización de labores en las sociedades primitivas hizo posible que algunos integrantes del grupo comenzaran a especializarse en diversas áreas, por ejemplo en el manejo y uso de plantas, animales y minerales con fines curativos. Estos conocimientos fueron considerados en el ámbito mágico-religioso y pasaron generación tras generación, hasta consolidarse como una materia de estudio, que tienen la finalidad de mantener el bienestar del ser humano y obtener materias primas naturales que le proporcionaran una mejor calidad de vida.

Con lo antes mencionado, nos damos cuenta como fue el inicio y el desarrollo de la Farmacognosia hasta llegar a nuestros días como una ciencia consolidada. La Farmacognosia se enfoca particularmente en el estudio de los principios activos de origen vegetal, animal y mineral, así como de los derivados que pudieran tener una aplicación terapéutica, comercial o industrial. En un sentido más amplio, esta ciencia abarca el estudio de la historia, el cultivo, la recolección, la preparación, la preservación, la comercialización, la distribución, la identificación y evaluación de los componentes químicos de origen natural, la farmacología y el uso tradicional

de esos compuestos o sus derivados para mejorar la salud y el bienestar del ser humano (Cortez-Gallard *et al.*, 2004).

El estudio de la Farmacognosia ha sido de gran importancia con el paso del tiempo, ya que la mayoría de los fármacos que se utilizan o se han utilizado provienen de fuentes naturales. La gama de productos naturales con la que contamos es extensa y variada, sin embargo no toda ha sido estudiada minuciosamente, especialmente en un país como el nuestro, en el cual contamos con una gran biodiversidad.

Un ejemplo en concreto de esta gama de productos naturales es el **propóleo**, el cual es una sustancia natural elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de las plantas. En estado fresco es resinoso, y cuando ha permanecido durante más de cinco meses en la colmena presenta una estructura quebradiza (Alencar *et al.*, 2007). La coloración es variada y puede poseer tonalidades amarillentas, verdes, rojizas o marrones.

Actualmente, el propóleo esta siendo ampliamente utilizado en la medicina tradicional por sus reconocidas propiedades terapéuticas entre las cuales destacan: la actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante (Kumazawa *et al.*, 2004). Por lo que resulta de suma importancia el estudio de este producto, para comprobar sus actividades farmacológicas y encontrar las moléculas responsables de dichas propiedades.

2.1. Propóleo

2.1.1. Definición y generalidades

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de los exudados de las cortezas y brotes de ciertas plantas. La palabra propóleo proviene del griego **propolis**, palabra que etimológicamente nos deja entrever la función de este, *pro* (en defensa de) y *polis* (ciudad), significado literal defensa de la ciudad (Castaldo y Capasso, 2002).



Figura 1. Muestra de propóleo

Al igual que la miel, el propóleo se conoce desde tiempos remotos y ha sido utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades. Los egipcios conocían sus propiedades anti-putrefactivas por lo que se usaban para embalsamar sus cadáveres. En Grecia y Roma se empleaba como antiséptico, cicatrizante en el tratamiento de heridas y como desinfectante bucal. Las civilizaciones del Nuevo Mundo, también conocieron sus propiedades y se sabe que los Incas emplearon



este material como agente antipirético. Adicionalmente, la farmacopea Inglesa en el siglo XVII, incluyó el propóleo en el listado de medicamentos oficiales (Alencar *et al.*, 2007).

Su producción comienza con la recolección de material vegetal por las abejas recolectoras, éstas, van fragmentando la resina con sus mandíbulas en donde al mismo tiempo se procesa, sujetándolo con sus patas delanteras hasta trasportarla finalmente a un órgano especializado de transporte llamado corbícula (Simone-Finstrom y Spivak, 2010). Una vez que la abeja a recolectado la cantidad suficiente, regresa a su panal y lo deposita en los lugares donde se requiera (**Figura 2**). En ese lugar es recibido por las abejas de cementación, las cuales lo suavizan y le dan el acabado final para obtener lo que nosotros conocemos como propóleo. Durante estos procesos, la mezcla que dará lugar al propóleo es humedecida con saliva y secreciones enzimáticas, a demás de ser mezclado con ceras producidas por sus glándulas céreas. Entre las reacciones catalizadas por las enzimas secretadas, destacan hidrólisis de los glucósidos fenólicos generando las respectivas agliconas y el azúcar correspondiente (Simone-Finstrom y Spivak, 2010).



Figura 2 .Recolección y deposito del propóleo

Las abejas emplean este material para recubrir las paredes de la colmena, reparar paneles, cerrar rendijas, agrietamientos y las fracturas que pueda existir en él. Se cree que las abejas buscan mantener un ambiente hermético que conserve la humedad del interior (Funari y Ferro, 2006). Sin embargo el propóleo no sólo es un material de construcción, también se le pueden atribuir otras funciones tales como:

- Mantener la colmena libre de bacterias y hongos patógenos.
- Regular la temperatura en el interior de la colmena
- Evitar la entrada de otros organismos.
- Adicionalmente, una vez que algún insecto o vertebrado pequeño logra entrar a la colmena, las abejas lo matan y lo momifican con el propóleo ya que no pueden sacarlo de la colmena (Castaldo y Capasso, 2002).

2.1.2. Aspectos de la obtención del propóleo

El éxito obtenido en la calidad y cantidad del propóleo recolectado, depende de varios factores que juegan un papel fundamental en la producción del material, estos factores los podemos agrupar de la siguiente manera:

1. Clima y Flora
2. Raza de la abeja
3. Métodos de recolección.

A continuación se hará una descripción de cada uno de ellos.



2.1.2.1. Clima y Flora

Como ya se menciona, el propóleo es un material elaborado a partir de los tejidos y exudados de diferentes plantas, por lo tanto, su composición química variara dependiendo de la zona geográfica de donde este provenga. Por ejemplo, en los países templados del hemisferio norte, las fuentes para la elaboración del propóleo, son los árboles de abedul, fresno, olmo, bálsamo y especialmente las resinas de los brotes vegetativos de los álamos (*Populus nigra*), Salicaceae (*Populus nigra*) (Popova *et al.*, 2004). En los propóleos Sudamericanos, con climas ecuatoriales, las abejas aprovechan las resinas producidas por las flores de *Clusia minor* en Venezuela, y de *Clusia rosea* en el caso de Cuba. En Brasil se proponen como fuentes *Araucaria heterophylla*, *Clusia major*, *Clusia minor* y algunas especies de *Baccharis*, *Araucaria angustifolia* y *Eucalyptus citriodora* (Popova *et al.*, 2004). En Australia occidental utilizan las especies del género *Xanthorrhoea* (Lu *et al.*, 2005), las cuales son endémicas de este país.

2.1.2.2. Raza de la abeja

La producción del propóleo estará en función de la raza de la abeja, en este ámbito lo más sobresaliente por mencionar es la raza caucásica y los híbridos africanizados de *Apis mellifera*, que tienen una tendencia a propolizar más que otras. Tendencia, que aumenta cuando los apiarios se ubican a más de 1000 m de altitud (Peña, 2008).

2.1.2.3. Métodos de recolección

La forma mas común para la recolección del propóleo, es por medio de trampas en la colmena o raspado de las mismas, siendo el entrampado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación (Stangaciu, 1998).

El comportamiento de las abejas en la colmena es algo fundamental para la recolección. Si se alteran las condiciones dentro de ésta, se puede acelerar la producción y mejorar la calidad de los propóleos, utilizando diferentes dispositivos con estos fines (Giralt, 2001). Al hablar de la técnica de raspado, un método cada vez menos empleado, hablamos literalmente de raspar con una espátula todas las zonas en donde se encuentre el propóleo. Lo que resulta de un método un poco trabajoso en el cual es muy fácil contaminar la muestra con pintura o algún material que se encuentre en la colmena (Asís, 1993). Aunque en muchos lugares se sigue usando este método en la gran mayoría de apiarios, se opta por realizar la recolección en mallas, trampas o rejillas. Método en el cual se coloca una malla con orificios y por instinto la abeja se ve obligada a llenar estos con el propóleo como se ve en la **Figura 3** (Yanucci, 2000). Con este método el apicultor solo tiene que retirar la malla y con ella obtienen todo el propóleo.



Figura 3. Deposito del propóleo en las malla.

Otro punto importante para la recolección del propóleo es la estación del año, generalmente en zonas templadas se realiza antes de la llegada del invierno y en climas tropicales al inicio de la estación lluviosa, donde se observa que la actividad de polinización es más intensa (Krell, 1996).

2.1.3. Propiedades biológicas

Existen una cantidad importante de trabajos relacionados con la actividad biológica y farmacológica del propóleo, concluyendo que dichas propiedades son atribuidas a la gran cantidad de constituyentes que lo conforman y el efecto sinérgico de los mismos; sin embargo, la cantidad de estudios que reportan el aislamiento de compuestos con actividad específica obtenidos de este material es muy reducida, y las aplicaciones son muy diversas y heterogéneas.

A continuación se describirán algunas de las actividades más importantes relacionadas con el propóleo.

2.1.3.1. Capacidad antioxidante

En los últimos años se ha observado que el propóleo es una fuente de compuestos con propiedades antioxidantes, diversos estudios han demostrado que protege a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación (Isla *et al.*, 2001). Se habla que esta actividad se debe a una función antiradicalaria (neutralizando radicales hidroxilo y, en menor grado, superóxido) y al efecto inhibidor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Claus *et al.*, 2000). En los propóleos brasileños y chinos, los extractos acuosos muestran mayor actividad antiradicalaria que los metanólicos y lo contrario ocurre con los de origen holandés o peruano (Banskota *et al.*, 2000).

2.1.3.2. Actividad antimicrobiana

La actividad que se reporta con mayor frecuencia es la antimicrobiana y es quizás la actividad más estudiada. Kalogeropoulos y colaboradores (2009) realizaron estudios donde observaron el efecto de extractos etanólicos de propóleo frente a varias bacterias tales como: *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, y *Listeria monocytogenes*. Esta actividad fue asociada a los compuestos presentes en el propóleo principalmente terpenos, flavonoides, y antraquinonas.

Silici y colaboradores (2005), realizaron estudios de actividad antimicrobiana con muestras de propóleos provenientes de tres razas de *Apis mellifera*, esta evaluación se realizó sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Los resultados mostraron que el propóleo de *Apis mellifera caucásica* es más activo que los de *Apis mellifera anatolica* y *Apismellifera carnica*. Todos los extractos etanólicos mostraron una actividad antibacteriana alta contra cocos Gram positivos, principalmente las cepas de *Staphylococcus aureus*, y actividad baja contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Candida albicans*. Se caracterizaron 48 compuestos mediante GC-MS, de los cuales 32 corresponden a estructuras nuevas en el propóleo.

También se ha encontrado que los extractos de propóleo pueda aumentar el efecto de diversos antibióticos, lo cual se asocia con un efecto de sinergismo sobretodo con antibióticos que actúan a nivel de ribosoma como es el caso del cloranfenicol, las tetraciclinas y la neomicina. Así mismo se observa que el propóleo puede influenciar en la resistencia bacteriana en antibióticos tales como amoxicilina, la ampicilina y la cefalexina (Sforcin y Bankova, 2011).



2.1.3.3. Actividad antiviral

Se ha observado que el propóleo ejerce efectos inhibidores frente a los virus de la influenza, viruela vacuna, la enfermedad de Newcastle, el herpesvirus, la fiebre del Valle de Rift, la influenza aviaria, la infección vírica bursal, el reovirus y el virus de la gripe Hong Kong, por lo que recomiendan utilizar este producto con fines de prevención (Serkedjieva *et al.*, 1992; Amoros *et al.*, 1994). Esta actividad se ha atribuido al alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente ácido cafeico, ésteres de los ácidos cafeico y ferúlico (3-metilbut-2-enil cafeato, 3-metilbutil ferulato) y agliconas flavónicas (luteolina y quercetina), muy activas frente al virus del herpes (Bankova, 2000).

2.1.3.4. Actividad inmunoestimulante

Entre los estudios farmacológicos realizados *in vivo* destacan los realizado por Bratter, en donde comprueba el efecto inmunoestimulante del propóleo determinando los niveles de citoquinas, antes y después de administrar a diez adultos sanos, con una dosis de 500 mg diarios de propóleo, por vía oral durante trece días. En dicho periodo, aunque no se modificaron sus valores plasmáticos, se observando que el nivel en la secreción de citoquinas aumenta significativamente (Bratter *et al.*, 1999). También se han hecho estudios en ratones en donde se observa que con una administraron a una dosis de 200mg/Kg durante tres día, el extracto etanólico de propóleo estimula la inmunidad innata, activando los pasos iniciales de la respuesta inmune sobre todo en la regulación de receptores TLR-2 y TLR-4 y la producción de citosinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos y las células del bazo (Sforcin y Bankova, 2011).

2.1.3.5. Otras actividades

Además de la actividades descritas existen trabajos sobre su actividad antiinflamatoria (Borrelli *et al.*, 2002; Cardile *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005), antiparasitaria (Dantas, 2006), efectos estrogénicos (Song, 2002), anti-VIH (Gekker, 2005) y actividad antituberculosa (Yildirim, 2004) las cuales no se detallan en éste documento.

2.1.4. Composición

Como se mencionó anteriormente, la composición del propóleo dependerá de la zona de recolección y por lo tanto de las especies vegetales predominantes en dicha área. Por lo cual, definir la composición química de éstos materiales es un trabajo arduo, especialmente en muestras de origen tropical (Bankova, 2000). A groso modo se puede decir que en general los propóleos están compuestos por un 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias que incluyen escombros orgánicos (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006), en la **Tabla 1** se muestran los componentes mayoritarios de cada parte del propóleo.

Tabla 1. Composición general y componentes mayoritarios del propóleo.

Composición	Porcentaje	Componentes mayoritarios
Resinas	50%	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras de abeja	30%	Ácidos grasos de cadena larga
Aceites esenciales	10%	Compuestos volátiles
Polen	5%	Trazas de minerales y proteínas del polen
Escombros orgánicos	5%	Cetonas, lactonas, quinonas, esteroides, ácido benzoico, vitaminas, azúcares entre otras

(Krell, 1996)

Los análisis de composición química de este producto natural han permitido la identificación de por lo menos 300 compuestos (Castro, 2001), entre los que se incluyen flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, ácidos grasos y sus ésteres, terpenos, esteroides, aminoácidos, polisacáridos, hidrocarburos, alcoholes, y otros compuestos presentes en trazas. Entre los compuestos aislados mas comunes destacan los mencionados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Compuestos aislados del propóleo

Compuestos	Nombre	
Ácidos Aromáticos	Ácido benzoico	Ácido ferúlico
	Ácido caféico	Ácido gálico
	Ácido cinámico	Ácido vainillínico
	Ácido isoferúlico	Ácido hidroxibenzoico
	Ácido salicílico	Ácido hidroxicinámico
Ácidos alifáticos	Ácido azelaico	
	Ácido hexadecanoico	
	Ácido málico	
	Ácido oleico	
	Ácido succínico	
Esteres	Benzoato de etilo	
	Cinamil cafeato	
	Feniletil cafeato (CAPE)	
Antraquinonas	Crisofanol	
	Emodina	
Flavonoides	Quercetina	Galangina
	Pinostrobrina	Apigenina
	Pinocebrina	Kaempferol
	Naringenina	Ramnetina
	Crisina	Pinobanksina
Azucares	D-Fructosa	D-Xilosa
	Sacarosa	D-Glucosa
	Sorbosa	D-Manosa

(Kalogeropoulos *et al.*, 2009)

Se puede clasificar al propóleo en función de su origen geográfico, y aunque los datos relativos a los contenidos de flavonoides y ésteres fenólicos de los propóleos europeos y de América del Norte son incompletos, se ha observado que los producidos a partir del género *Populus spp*, contienen una mezcla de agliconas flavónicas, ácidos hidroxicinámicos y sus esteres, la variedad rusa contiene básicamente agliconas flavónicas y la brasileña derivados del ácido *p*-cumárico (Bankova, 2000).

En el propóleo europeo el contenido total en fenoles, compuestos a los cuales se les atribuye la mayoría de sus propiedades farmacológicas, representa más de la mitad de los 160 compuestos diferentes identificados en él (Bankova, 2000). Sin embargo, algunas muestras suizas e italianas muestran composiciones inusuales con contenidos de bencil *p*-cumarato y de bencil ferulato bastante altos (>5%), relativa escasez de compuestos fenólicos y ausencia de algunos compuestos típicos (pinobanksina y prenil cafeatos) del propóleo procedente del *P.nigra* (Bankova, 2002).

Los propóleos turcos (Sorkun *et al.*, 2001), egipcios (Hegazi *et al.*, 2001), brasileños (Park *et al.*, 2002), de Chile (Muñoz *et al.*, 2001) y de Cuba (Cuesta-Rubio *et al.*, 2002) de procedencias botánicas distintas muestran composiciones variadas, y en algunos casos compuestos característicos que podrían ser de utilidad para la identificación de su origen, siendo una especie de marcadores de dichos propóleos.

Un grupo de compuestos presentes en todos los propóleos del mundo son los flavonoides, los cuales se encuentran dentro de los compuesto fenólicos, constituyentes principales de la parte resinosa del propóleo, a la cual se le atribuye las actividades farmacológicas descritas con anterioridad, y su estudio ha ido en desarrollo desde su descubrimiento.



2.2. Flavonoides

2.2.1. Generalidades

Con el paso del tiempo, se ha incrementado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas regresando al estudio de productos fitoquímicos, entre los cuales, destacan los compuestos polifenólicos. Estos compuestos se pueden agrupar en tres grandes grupos: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo este último, el grupo más común con más de 4000 compuestos identificados (Schieber *et al.*, 2001). Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos (Duthie y Crozier, 2000).

Los flavonoides fueron descubiertos en 1930 por el premio Nobel Szent-György, quien aisló una sustancia denominada citrina de la cáscara del limón, compuesto que estaba relacionado con la permeabilidad capilar. Con este descubrimiento los flavonoides se empezaron a denominar vitamina P y vitamina C2 por su relación con la permeabilidad y sus propiedades semejantes a la vitamina C (Martínez-Flórez *et al.*, 2002) Sin embargo, con el tiempo se observó que los flavonoides no se podían agrupar con las vitaminas y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.

El organismo humano no puede producir estas sustancias por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. La mayoría de estos compuestos se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en algunas bebidas como la cerveza y el vino.



2.2.2. Biosíntesis y estructura química

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina así como también de unidades de acetato (Das, 1994).

Los flavonoides son compuestos con un peso molecular bajo que comparten un esqueleto común de difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos a los cuales se les signan las letras A y B, ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' como se observa en la **Figura 4** (Kühnau, 1976).

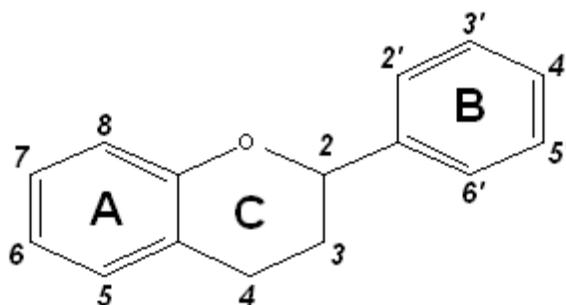
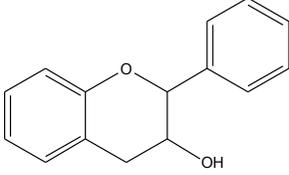
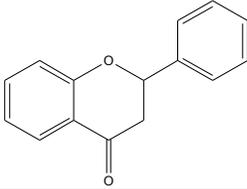
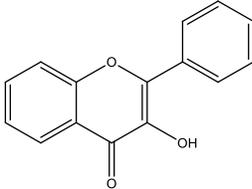
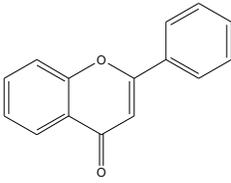
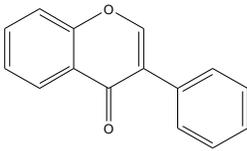
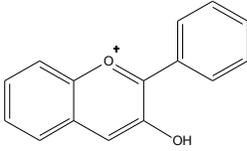


Figura 4. Estructura base de los flavonoides.

Los dos anillos tienen diferentes orígenes biosintéticos, el anillo A proviene de la vía del acetato y el anillo B del ácido Shikímico. La unidad iniciadora es la *p*-cumaril-CoA, que se incorpora intacta para posteriormente incorporar secuencialmente tres unidades de malonil-CoA, dando lugar a la estructura de la chalcona, en donde posteriormente ocurre la ciclación, subsiguientes hidroxilaciones y diversas modificaciones para dar origen a las diferentes clases de flavonoides, las cuales se clasifican como se observa en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Clasificación de los flavonoides

Clasificación	Descripción	Estructura	Ejemplos
Flavanol	Tiene un grupo -OH en C-3		catequina, epicatequina y galocatequina
Flavonona	Tienen un grupo carbonilo en C-4		naringenina, hesperidina y isoxantoumol
Flavonol	Tienen carbonilo en C-4 y un grupo -OH en C-3		quercetina, miricetina y kaempferol
Flavona	Tienen un carbonilo en C-4 y carecen del grupo hidroxilo en C-3		sinensetina, apigenina, diosmina y luteolina
Isoflavona	El anillo B esta unido en C-3		genisteina, daidzeina y gliciteina
Antocianidina	Tienen unido el grupo -OH en C-3, pero además poseen un doble enlace entre C-3 y C-4		cianidina, pelargonidina, delphinidina y peonidina

(Robards *et al.*, 1999)



En la naturaleza se han observado también flavonoides unidos a azúcares, especialmente los flavonoles y flavonas, en donde se observa la unión preferentemente en la posición 3 y en algunos casos en la 7. Estos compuestos se encuentran como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico, generalmente a la parte sin azúcares de la molécula se le denomina aglicona. Esta modificación que presentan los flavonoides, mejora su solubilidad en agua pero se ha observado que reduce su reactividad frente a los radicales libres comparándolos con sus agliconas o flavonoides respectivos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

2.2.3. Dieta y flavonoides

Aunque existe una gran variabilidad en los hábitos alimenticios dependiendo la zona geográfica, en términos generales podemos hablar que el valor medio de La ingesta de flavonoides se estima en 23 mg/día (Hertog *et al.*, 1996). Las principales fuentes de estos compuestos son: El té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra que contiene cerca de 4 g/kg de quercetina y las bebidas alcohólicas como vino y cerveza. El té es una de las fuentes principales de quercetina en Japón y los Países Bajos, así como el vino tinto lo es en Italia y las cebollas en los Estados Unidos. La ingesta promedio de flavonoles y flavonas se sitúa entre los 20 y 26 mg/día la cual excede por tanto, a la de otros antioxidantes comunes en la dieta cotidiana, tales como el beta-caroteno (2-3 mg/día) y la vitamina E (7-10 mg/día) y es igual aproximadamente a un tercio de la vitamina C (70-100 mg/día). En este contexto nos damos cuenta que los flavonoides representan, una parte importante del potencial antioxidante de la dieta humana (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

2.2.4. Metabolismo y absorción

El metabolismo de los flavonoides es intenso y la mayor parte de estos se excreta por la orina. Las transformaciones de los flavonoides tienen lugar principalmente en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I como oxidoreducciones e hidrólisis aunque también se observa la conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos o glicina en reacciones de fase II para los flavonoides y sus metabolitos (Rowland y Tozer 1995).

Cuando se estudian los efectos biológicos de los flavonoides, algo importante que se tiene que considerar es la biodisponibilidad. En general los polifenoles sufren varias modificaciones en el metabolismo del primer paso, de manera que las moléculas que llegan a circulación sistémica ya no son iguales a las que se ingirieron originalmente en los alimentos. Entre las moléculas resultantes destacan los glucuronatos y sulfatos que pueden o no tener metilaciones en el grupo catecol. Los flavonoides que logran ser absorbidos se distribuyen por el organismo fijados a proteínas plasmáticas como la albúmina (Boulton *et al.*, 1998). Consiguen una distribución homogénea en todos los tejidos corporales, incluso logran atravesar la barrera hematoencefálica permitiendo mayor paso, por supuesto, a los flavonoides más lipofílicos (Youdim *et al.*, 2004).

2.2.5. Actividades farmacológicas

La mayor parte de las propiedades farmacológicas que presentan los flavonoides están relacionadas con su capacidad de unión a macromoléculas biológicas, tales como enzimas, transportadores de hormonas y ADN así como, quelar iones metálicos transitorios como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Por tal razón se han descrito efectos protectores en diversas patologías como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

2.3. Acción antioxidante

2.3.1. Estrés oxidante

Los procesos de oxidación pueden dar inicio por factores físicos o químicos y continuar indefinidamente en presencia de un sustrato adecuado hasta que un mecanismo de defensa bloquee el proceso. Generalmente las moléculas responsables son los radicales libres y cuando estos se encuentran en concentraciones elevadas en los organismos o los mecanismos antioxidantes son ineficientes ocurre lo que se denomina como estrés oxidante (Sayre *et al.*, 2008).

En los sistemas biológicos las moléculas más afectadas son: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (DNA). Siendo la lipoperoxidación, la consecuencia más importante del estrés oxidante, esta consiste en la interacción de las especies reactivas con lípidos poliinsaturados que se encuentran en la membrana celular, disminuyendo la permeabilidad, dañando a proteínas membranales e inactivando receptores lo que puede conducir a la muerte celular (Fatokun *et al.*, 2008; Grassi *et al.*, 2010; Refsgaard *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2002).

2.3.2. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas con un electrón menos de lo normal, ocasionando que aumente su reactividad química lo que les permite secuestrar electrones o átomos de hidrógeno de moléculas vecinas, convirtiéndolas a su vez en radicales libres. Esto provoca reacciones en cadena y conduce así a daño oxidativo (Fatokun *et al.*, 2008).

Entre los radicales libres más comunes que se pueden encontrar en el organismo, destacan los derivados de oxígeno, denominados especies reactivas de oxígeno (ERO). Entre estas se encuentran al radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual genera peróxido de hidrógeno mediante la intervención de la enzima superóxido



dismutasa (SOD). El H_2O_2 formado a su vez se descompone en moléculas de agua por la intervención de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa. Aunque esta conversión es muy rápida, si por alguna razón se alterara el funcionamiento de estas enzimas, entonces, el peróxido de hidrógeno podría producir el radical hidroxilo mediante los pasos descritos por la reacción de Fenton, como se aprecia en la **Figura 5** (Fatokun *et al.*, 2008; Reiter *et al.*, 2002).

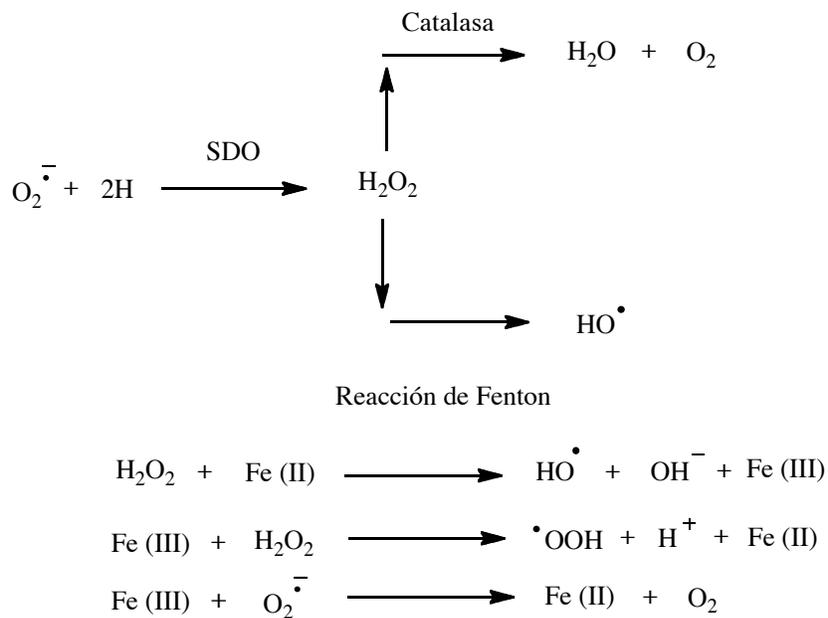


Figura 5. Producción del radical hidroxilo

Dado que el $O_2^{\cdot-}$ ni el H_2O_2 son lo suficientemente reactivos para causar daño al organismo, el radical $\cdot OH$ es considerado una de las especies oxidantes más dañinas con una gran afinidad con las biomoléculas, siendo el más tóxico de las ERO. Se estima que alrededor del 50% del daño oxidativo producido por las ERO es causado por el $\cdot OH$ (Fatokun *et al.*, 2008).



Como se observa en la **Figura 5**, la generación de este radical se ve favorecida por la presencia de metales de transición. Debido a la alta reactividad del radical hidroxilo generalmente reacciona con biomoléculas que se encuentren cercanas a su sitio de formación. Esto constituye un aspecto importante del daño oxidativo, el cual en cierta forma está determinado por la localización de los metales de transición (Hierro, cobre, etc) en la célula.

2.3.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que, cuando están presentes en concentraciones menores comparadas con un sustrato oxidable, detienen o previenen significativamente la oxidación de dicho sustrato. El término de sustrato oxidable se refiere a cualquier tipo de sustancia endógena. Generalmente los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar del sustrato oxidable protegiendo las células contra el daño de los radicales libres en consideraciones biológicas, por lo que los antioxidantes desempeñan un papel fundamental en la protección de estructuras celulares que pudiesen ser dañadas en reacciones que involucren radicales libres (Reiter *et al.*, 2002).

2.3.3.1. Acción antioxidante de los flavonoides

Los antioxidantes naturales más conocidos son las vitaminas C, E y los carotenoides, sin embargo, se ha demostrado que los flavonoides también actúan como antioxidantes, dependiendo de su estructura molecular y de la cantidad y posición de sus grupos hidroxilos (Miranda, 2003)

Entre las características que se han establecido para que un flavonoide presente una actividad antioxidante destacan las siguientes tres:

1. La presencia de un grupo hidroxilo en las posiciones C-3' y C-4' del anillo B, lo cual confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
2. Doble enlace entre las posiciones C-2 y C-3, además del grupo carbonilo en la posición C-4, responsable de la deslocalización de electrones desde el anillo B.
3. Presencia de un grupo hidroxilo en posición C-3 y C-5 junto con un doble enlace entre los carbonos C-2 y C-3 del anillo C.

Siguiendo estos criterios, se puede observar que el flavonoide quercetina, cumple con las tres características para ejercer una efectiva función antioxidante. En ensayos realizados se ha demostrado dicha capacidad la cual sobrepasa de las vitaminas E y C (Merck, 2000).

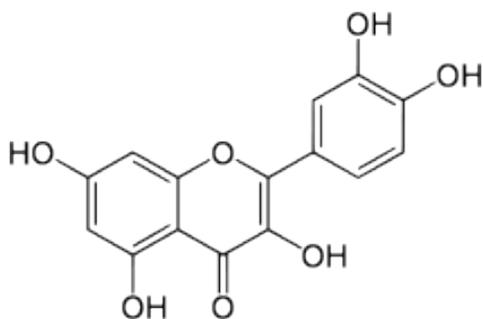


Figura 6. Estructura de la quercetina.

Los flavonoides con las características descritas anteriormente, pueden neutralizar las especies reactivas de oxígeno especialmente las que se encuentran en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. Para ello, se transfiere un átomo de hidrógeno del flavonoide al radical potencialmente lesivo originándose otro radical libre pero ahora en el flavonoide, el cual es mucho más estable que el radical que lo genera. De esta forma bloquean

la acción nociva de dichas sustancias sobre la célula.

Diversos estudios han demostrado la eficiencia de los flavonoides para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoléico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (Ursini *et al.*, 1994). Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Hirano *et al.*, 2001; Terao *et al.*, 2001).

Otro factor importante para hablar de función antioxidante en los flavonoides, es su capacidad de eliminar el hierro, se ha observado en los últimos años en ensayos con células U937 tratadas con el agente tóxico terbutilhidroperóxido que aun a muy bajas concentraciones son capaces de evitar la ruptura y la oxidación del ADN y que esta función protectora esta íntimamente relacionada con su lipofilicidad (Sestili *et al.*, 2002).

2.3.4. Efectos prooxidantes

Las mismas características que le confieren la función antioxidante a los flavonoides determinan que puedan presentar efectos prooxidantes. Los mecanismos implicados se basan en la formación del radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide-hierro. En el primer caso, cuando se autooxida el radical aroxilo se genera un anión superóxido (O_2^-) que a su vez da lugar al radical hidroxilo (HO^-), lo cual podría estar asociado a las acciones citotóxicas descritas a altas concentraciones (Hodnick *et al.*, 1988; da Silva *et al.*, 2002).

Lo que determina el carácter antioxidante o prooxidante es la estabilidad/labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original, y las acciones prooxidantes sólo parecen producirse cuando las dosis de los flavonoides son demasiado altas (da Silva *et al.*, 2002).

2.4. Enfermedades de la cavidad oral

En los últimos tiempos se ha observado un incremento significativo en las enfermedades de la cavidad oral, entre las cuales se encuentran aquellas relacionadas con las principales enfermedades crónicas como son: las cardiovasculares, cáncer, VIH, afecciones respiratorias crónicas y diabetes. Además de otros factores como una dieta alta en carbohidratos, uso de tabaco, consumo de bebidas alcohólicas y de sobremanera la falta de higiene bucodental (OMS, 2007).

Datos revelados por la organización mundial de la salud, mencionan que las caries dentales y las enfermedades periodontales son dos de las afecciones con mayor incidencia en la población mundial a nivel de padecimientos bucodentales. Estudios previos revelan que entre 60 y 90% de los niños en edad escolar presentan caries y que de un 5 a un 20% de los adultos de edad mediana presentan enfermedades periodontales que les ocasionan la pérdida de los dientes (OMS, 2007).

2.4.1 Caries y *Streptococcus mutans*

La caries dental es una de las enfermedades crónicas infecciosas más comunes que afectan a toda la población mundial, la cual tiene como resultado la disfunción dental y en ocasiones termina en la pérdida de los dientes (Aas et al., 2008). Uno de los factores determinantes para el desarrollo de la caries es la formación de la placa dentobacteriana, la cual se forma en dos etapas: primero ocurre la adhesión reversible de diversas bacterias orales a la superficie dental, seguida de la acción de las glucosiltransferasas (GTF's), las cuales forman una capa de polímeros de glucosa insolubles a partir de la sacarosa, que promueven la adhesión irreversible de las bacterias. Posteriormente microorganismos acidogénicos producen ácido láctico por medio de la fermentación de azúcares como fructosa, lo que conduce finalmente al ataque del esmalte y a la formación de la caries dental (Chung *et al.*, 2006).

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo el cual es considerado como uno de los principales agentes causales de la caries dental en humanos, normalmente presenta una morfología en pares o cadenas, es catalasa negativo y aerobio facultativo. Tiene la capacidad de fermentar carbohidratos, con los que produce ácido láctico principalmente. Tiene una capacidad especial para adherirse a superficies lisas y uno de sus principales factores de virulencia es su habilidad para formar biocapas en la placa dental (Yoshida *et al.*, 2005).

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

Con el paso del tiempo se han descubierto y desarrollado diversos agentes efectivos para eliminar a *S. mutans* de la microflora oral. Antibióticos como ampicilina, clorhexidina, eritromicina, penicilina, tetraciclina y vancomicina han resultado muy efectivos para prevenir las caries, sin embargo, se observa efectos secundarios con el uso excesivo de estos compuestos el cual puede generar un desbalance en la flora oral e intestinal y causar susceptibilidad a microorganismos, vómito, diarrea y pueden manchar el esmalte dental (Chung *et al.*, 2006).



3. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios en todo el mundo, han demostrado que el propóleo es un producto natural con diversas actividades farmacológicas, por lo que éste, es considerado como una fuente potencial de un gran número de compuestos los cuales en un futuro puedan tener utilidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades o padecimientos que afectan a los seres humanos hoy en día. Lamentablemente por su forma de producción, sabemos que la composición de este, no es constante en todo el mundo, y la mayoría de los estudios realizados a la fecha se enfocan en el estudio de muestras de propóleos europeos, asiáticos o de regiones de América como Cuba, Brasil o Colombia, los cuales no son aplicables para los propóleos producidos en nuestro país. Con base en los antecedentes descritos anteriormente se planteó el presente proyecto de investigación, el cual consiste en determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico derivado del propóleo y observar el efecto de éste sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans*.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales

Con base en las consideraciones ya mencionadas los objetivos generales del presente proyecto de investigación consisten: 1) aislar los componentes mayoritarios presentes en la muestra de propóleo seleccionada; 2) evaluar el potencial antioxidante del extracto etanólico preparado y 3) determinar la actividad sobre el crecimiento bacteriano del extracto preparado.

4.2. Objetivos particulares

Para cumplir con los objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Obtener el extracto etanólico del propóleo utilizando un método de extracción continua (Soxhlet).
- Determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico del propóleo, mediante técnicas espectrofotométricas.
- Realizar un fraccionamiento del extracto etanólico derivado del propóleo, empleando para ello, métodos cromatográficos convencionales y procesos de partición.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas alguno de los compuestos mayoritarios presentes en los propóleos y que posiblemente estén relacionados con la actividad antioxidante y antimicrobiana.
- Analizar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico así como de los metabolitos aislados utilizando los ensayos de DPPH y ABTS.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y los metabólicos aislados sobre una cepa de *Streptococcus mutans*.
- Determinar la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.

5.1. Procedimientos generales

5.1.1. Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 1% seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa de los compuestos. En cuanto a las cromatografías en columna abierta (CCA) se realizaron sobre gel de sílice Kiesel gel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM empacado en columna de vidrio (5 × 30 cm) y utilizando diversos sistemas de elución (CH₂Cl₂-acetona y MeOH).

5.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear para protón (RMN-¹H, 400 MHz) y carbono 13 (RMN-¹³C, 100 MHz) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMRS. Estos espectros de RMN se realizaron utilizando CD₃Cl como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia, reportando los desplazamientos químicos en ppm. Los espectros de masas se determinaron en un equipo Thermo Electron DFS (DoubleFocus Sector) mediante introducción directa y como métodos de ionización el impacto electrónico (EM/IE) a 70 eV y el bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB).

5.2. Recolección del propóleo

El propóleo utilizado en este estudio fue recolectado en el apiario de “Las Trojes” ubicado en el Ejido de San Antonio Tecómitl en la Delegación Milpa Alta del Distrito Federal. Una muestra de referencia de esta resina se guarda en el Laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

5.3. Estudio fitoquímico del propóleo

5.3.1. Proceso de extracción

Una porción de la muestra de propóleo recolectada (230 g) se extrajo utilizando un método continuo (Soxhlet) y 3.0 L de etanol como disolvente por un período de tres horas. Este proceso permitió la obtención de un extracto etanólico, el cual se concentró al vacío en un rotavaporador obteniendo el extracto seco de color oscuro y apariencia pegajosa (E001). Este mismo propóleo se sometió a una segunda extracción siguiendo la metodología descrita anteriormente y diclorometano como disolvente de extracción. Al finalizar el proceso y después de evaporar el disolvente se obtuvo un extracto con apariencia de cera denominado bálsamo de propóleo (E002).

5.3.2. Fraccionamiento primario

El extracto etanólico total (E001) se suspendió en una mezcla de metanol y agua (10:1) y posteriormente se sometió a un fraccionamiento primario por partición utilizando hexano como disolvente (400 × 3). El proceso permitió la obtención de dos fracciones primarias que se denominaron F001(metanol) y F002 (hexano).



5.3.3. Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles presentes en las fracciones F001, F002 y el extracto E002 se realizó utilizando el método colorimétrico descrito por Singleton (1965) con modificaciones. A continuación se describe brevemente la metodología utilizada. En el tubo de ensayo se adicionaron 50 μL de solución metanólica de las fracciones a analizar (1 mg/mL), 800 μL de agua y 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (1:1). Se agitó y se dejó en reposo por 8 minutos. Posteriormente, se adicionaron 50 μL de Na_2CO_3 al 20%. Por último, la mezcla de reacción se dejó en reposo por un período de 1 hora en ausencia de luz y una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman Coulter(D4® 530 Lifesciences UV/VIS).

5.3.4. Fraccionamiento secundario

La fracción F001 se sometió a un fraccionamiento secundario mediante columna abierta usando sílica gel como fase estacionaria y CH_2Cl_2 :acetona en un gradiente de concentración como fase móvil. Se obtuvieron un total de 80 fracciones de 500 ml cada una, las cuales se concentraron al vacío por separado. El fraccionamiento fue monitoreado por CCF y las fracciones que presentaban similitud cromatográfica fueron mezcladas, obteniéndose finalmente 11 fracciones tal y como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Fracciones recolectadas

Sistema de elución	Fracciones reunidas	Clave asignada
100% CH_2Cl_2	F1	F-I
CH_2Cl_2 -acetona	F2-F5	F-II
	F6-F11	F-III
	98:2	F-IV
	95:5	F-V
	90:10	F-VI
	85:15	F-VII
	80:20	F-VIII
	70:30	F-IX
	50:50	F-X
	30:70	F-XI
100% acetona	F78-F80	F-XII

5.3.5. Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides totales al la fracción F001 y las fracciones derivadas del fraccionamiento secundario fueron analizadas utilizando el método colorimétrico descrito por Kumazawa (2004) con modificaciones. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos. Se colocaron 100 μ L de solución de cada muestra a probar (1 mg/ml) a sus respectivos pozos y se le adicionó a cada uno 100 μ L de solución etanólica de $AlCl_3$ al 2%. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 420 nm en un espectro Lector de Elisa para microplaca Lab system Multiskan® MCC/340.

Para poder expresar los resultados como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/g de extracto o fracciones) se realizó una curva de calibración con este reactivo (grado analítico, Sigma-Aldrich). Esta curva de calibración se trabajó en un intervalo de concentración de 10-60 μ g/ml por triplicado.

5.3.6. Obtención y purificación de los flavonoides aislados

La fracción I se sometió a un fraccionamiento terciario utilizando una columna abierta de Sephadex-LH 20 como fase estacionaria y metanol como fase móvil, se obtuvieron 24 fracciones de 10 ml que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica (CCF), obteniendo finalmente tres fracciones I-A, I-B y I-C, de las cuales las dos últimas se encontraban puras.

A la fracción II se le realizó un proceso de cristalización disolviéndola en cuatro ml de una mezcla CH_2Cl_2 - Acetona 1:1 en caliente, y dejándola reposar a temperatura ambiente para después enfriarla en un baño de hielo agua. Los cristales obtenidos fueron decantados y secados, este proceso se repitió 3 veces del cual se obtuvo el compuesto denominado II-A.

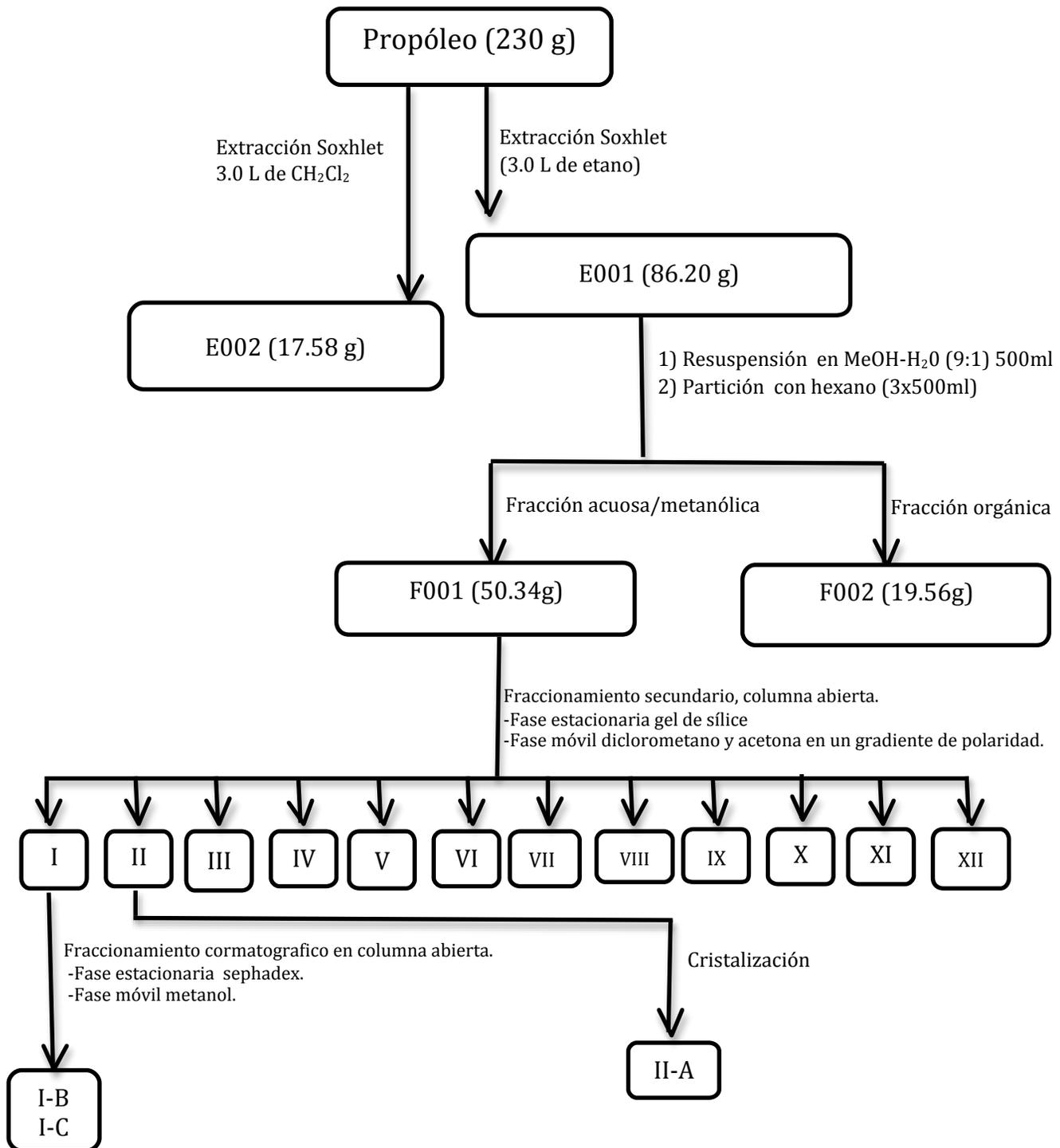


Diagrama 1. Fraccionamiento del extracto etanólico del propóleo

5.3.7. Evaluación de la actividad antioxidante

5.3.7.1. Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS•+)

Se midió la capacidad atrapadora del radical ABTS•+ de las muestras a probar empleando el método propuesto por Pérez (2008) con modificaciones. El radical se generó por una reacción de oxidación de una solución 7mM ABTS (Sigma-Aldrich Chem. Co. USA) con una solución 2.45 mM persulfato de potasio, la solución resultante se conservó en ausencia de luz por 12 horas antes de su uso. La solución de ABTS•+ se diluyó con MeOH hasta una absorbancia de 0.7 a 734 nm. Se colocaron 20 μ L de la solución a probar en los respectivos pozos y se le adicionó a cada uno 180 μ L de solución acuosa de ABTS•+. La absorbancia fue medida a 700 nm después de un minuto en un espectro Lector de Elisa .

5.3.7.2. Actividad inhibidora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad antioxidante de la fracción F001 y de los compuestos aislados se evaluaron midiendo la capacidad atrapadora del radical DPPH• utilizando la metodología descrita por Zhihong (Zhihong *et al.*, 2006) con modificaciones. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos. Se colocaron 100 μ L de las soluciones a probar y se les adicionó 100 μ L de solución etanólica de DPPH• 0.208 mM (Sigma-Aldrich Chem. Co. USA). La absorbancia fue medida después de 20 minutos de incubación a 490 nm en un espectro Lector de Elisa .

Para poder tener un margen de comparación se realizó una curva con Trolox (antioxidante de referencia, grado analítico, Sigma-Aldrich) en un rango de concentraciones de 0 a 60 μ M para el DPPH y de 0 a 500 μ M en el caso de ABTS.



En ambos métodos las concentraciones a probar fueron ajustadas para que quedaran dentro de sus respectivas curvas y todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5.3.8. Ensayo biológico

5.3.8.1. Microorganismo de Prueba

El microorganismo de prueba utilizado para determinar la actividad bacteriana del extracto etanólico del propóleo, y de los compuestos aislados, fue *Streptococcus mutans* (ATCC 700611).

Para el crecimiento óptimo de dicha bacteria, se utilizó como medio de cultivo el caldo de la infusión de cerebro-corazón (BHI) y soya tripticaseína suplementado con clorhidrato de cisteína (0.05%), menadiona (0.02 µg/mL), hemina (5 µg/mL) y nitrato de potasio (0.02%).

5.3.8.2. Determinación de la capacidad mínima inhibitoria (CMI)

La actividad bacteriana se determinó con base en un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos. Se incubaron los cultivos de las bacterias por 24 h., posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm x 10 min, se lavaron con buffer de fosfatos 0.05M (PBS, pH 6.8) dos veces y finalmente se resuspendieron. La suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro y el estándar de McFarland1. En cada pozo se colocaron: el medio de cultivo, 5×10^5 UFC/mL de *S. mutans* y el compuesto de prueba en diluciones seriadas. Las muestras se realizaron por triplicado para cada concentración de prueba con una concentración inicial de 2 mg/ml, utilizando diferentes controles como se muestra en la Tabla 5 . Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora Labnet 211DS.



Tabla 5. Controles para el ensayo biológico

	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control negativo	Con inóculo	Disolvente	37°C
Blanco	Sin inóculo	Disolvente	37°C
Control positivo	Con inóculo	Gluconato de Clorhexidina (CHX)	37°C

La bacteria *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente ($A_{660\text{nm}}$) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas.

El valor de CMI para cada microorganismo utilizado se determinó midiendo la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de $0.05 A_{660\text{nm}}$. Comparándolo con un control positivo que fue CHX (**Tabla 5**).



6. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 Obtención del extracto y fraccionamiento primario.

El material vegetal objeto de estudio fue seleccionado con base en los usos reportados en la medicina tradicional y los resultados obtenidos en los ensayos de selección. Con la finalidad de obtener un mejor rendimiento en el proceso de extracción, el proceso se repitió utilizando como disolventes, en primer término, etanol y posteriormente, diclorometano. Los rendimientos de ambos extractos se muestran en la **Tabla 6**. Es importante mencionar que el rendimiento obtenido en la extracción de esta resina es un parámetro que se correlaciona en cierta medida con la calidad del propóleo, debido a que en la fracción soluble en etanol es donde se han encontrado la mayor concentración de compuestos biológicamente activos (Castro, 2001).

Tabla 6. Rendimiento obtenido en el proceso de extracción.

Extracto	E001	E002
Peso (g)	86.21	17.58
Rendimiento %	37.48	7.64

Por otra parte, con respecto a la apariencia física del extracto E001, este presentaba una apariencia cerosa, lo hizo evidente la presencia de residuos de ceras. Por esta razón se tomó la decisión de realizar un fraccionamiento primario por partición utilizando hexano. Este proceso permitió fraccionar al extracto original en dos grandes grupos de compuestos, aquellos de menor polaridad (ceras) y los compuestos solubles en metanol-agua. En la **Tabla 7** se muestran el porcentaje del E001 soluble en hexano (F002) y en metanol acuoso (F001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

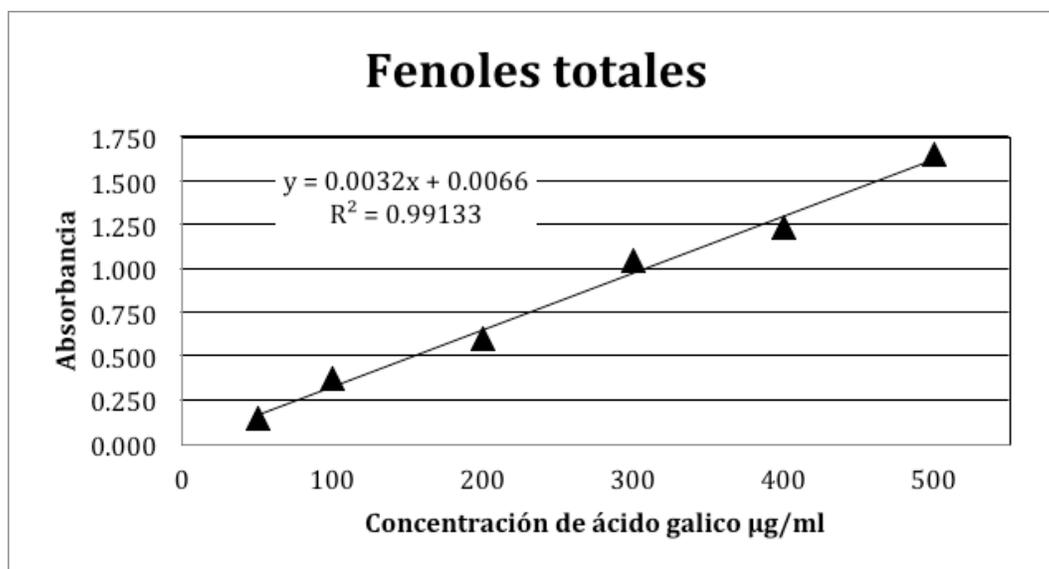
Tabla 7. Rendimientos obtenidos del proceso de partición.

Fracciones	Peso (g)	Porcentaje
F001 (metanol/lagua)	50.34	72.01%
F002 (hexano)	19.56	27.98%

6.2. Determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides a partir de las fracciones primarias y secundarias.

El fraccionamiento secundario se realizó utilizando como criterio de selección la cantidad de compuestos fenólicos y de flavonoides.

La concentración de fenoles totales se realizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (ver sección 5.3.3.). La cantidad de fenoles se expresa en equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de muestra). En la **Gráfica 1** se ilustra la curva de calibración con este reactivo construida para esta determinación.

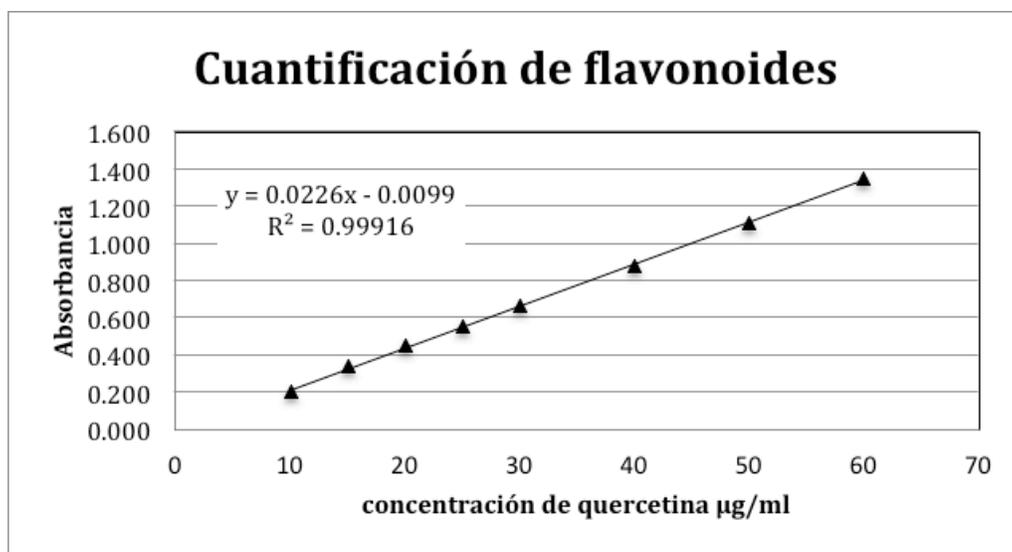


Gráfica 1. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la **Gráfica 1** se observa que en el rango de concentraciones utilizadas se obtiene la ecuación que se adecúa a una recta con un coeficiente de correlación lineal ($R^2=0.9913$). La cuantificación de fenoles totales para cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se muestran como el promedio de las determinaciones en la **Tabla 8**.

Por otra parte, se realizó la determinación de la cantidad de flavonoides totales para cada fracción. Esta determinación se realizó siguiendo la metodología descrita previamente por Kumazawa y colaboradores (2004). Los resultados de las determinaciones se expresan como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/g de muestra). La curva de calibración realizada fue lineal en un intervalo de concentración de 10-60 $\mu\text{g/ml}$. El contenido de flavonoides totales para cada muestra se realizó por triplicado para cada concentración.



Gráfica 2. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales

En la **Gráfica 2** se encuentra la curva de calibración que se adecúa a la ecuación de una recta, con un coeficiente de correlación lineal ($R^2=0.9991$).

Tabla 8. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

Muestra	Contenido de fenoles totales ^a	Flavonoides totales ^b
E002	25.11	N.D.
F001	80.33	39.55
F002	21	N.D.

^amg eq. ácido gálico /g muestra.

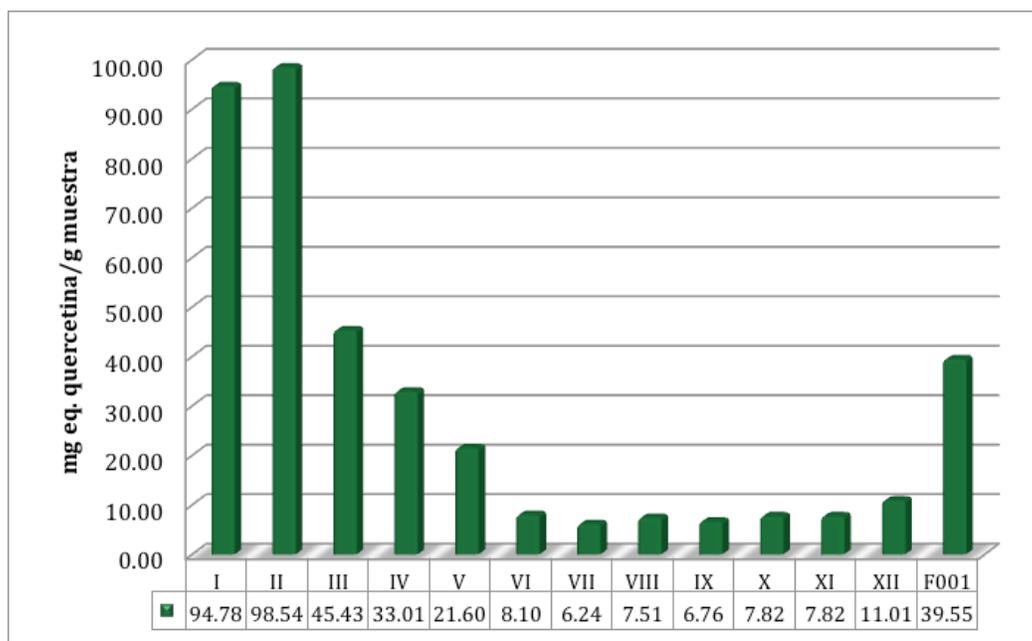
^bmg eq. de quercetina /g de muestra

N.D.= no determinado

A partir de los resultados obtenidos en las determinaciones de fenoles y flavonoides totales se decidió continuar el estudio con la fracción F001. El fraccionamiento de F001 permitió la obtención de 80 fracciones secundarias, las cuales se analizaron mediante cromatografía en capa fina y se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica. Como resultado de este proceso se obtuvieron 12 fracciones combinadas.

Posteriormente, a cada fracción secundaria se le cuantificó el contenido de flavonoides totales. Los datos resumidos en la **Gráfica 3** muestran que las fracciones F-I y F-II contienen la mayor cantidad de flavonoides totales, por lo que se procedió a aislar los componentes de dichas fracciones.





Gráfica 3. Cuantificación de flavonoides totales

6.3 Aislamiento y caracterización de los compuestos encontrados

La resolución de la fracción F-I se realizó utilizando cromatografía en columna abierta, Sephadex LH-20 y metanol como fase móvil la cual permitió el aislamiento de los compuestos **I-B** y **I-C**.

Por otra parte, con la finalidad de separar el compuesto mayoritario presente en la fracción F-II, esta se sometió a un proceso de cristalización el cual permitió la obtención del compuesto **II-A**. En la **Tabla 9** se resumen los compuestos aislados y el peso de cada uno de ellos.

Tabla 9. Compuestos aislados

Compuesto	Peso (mg)
I-B	11.1
I-C	15.3
II-A	32.4

6.3.1. Elucidación estructural del compuesto I-B

El compuesto **I-B**, se aisló como un sólido cristalino de color amarillo pálido soluble en diclorometano. La fórmula molecular del compuesto se estableció como $C_{17}H_{16}O_5$ con base en el espectro de espectrometría de masas, en el cual el ión molecular se encuentra en una relación masa carga de m/z 300.

El espectro de RMN- H^1 se muestra en la **Figura 8**, en ella se observa que el compuesto presenta el perfil típico para los compuestos de tipo flavonona (Rossi *et al.*, 1997). Las características más importantes encontradas en los espectros del compuesto **I-B** son:

- En δ_H 12.0 un singulete asignable al proton de un grupo hidroxilo quelatado ubicado en la posición C-5.
- En la región aromática del espectro de RMN- H^1 , se observa un sistema A_2B_2 [δ_H 7.39 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz, H-2' y H-6'), 6.96 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz, H-3' y H-5')] y dos dobletes en δ_H 6.06 (1H, d, $J= 4.0$ Hz, H-6) y δ_H 6.05 (1H, d, $J= 4.0$ Hz, H-8). Estas señales son asignables a los hidrógenos de los anillos B y A del flavonoide. Las señales del sistema A_2B_2 correlacionan con las señales en δ_C 128.5 (C-2' y C-6') y 115.0 (C-3' y C-5') en el espectro de HSQC, en tanto que los dobletes correspondientes a los protones del anillo A correlacionaron con las señales en δ_C 96.0 (C-6) y 98.4 (C-8) (**Figura 9**).
- En δ_H 5.37 se observa un doble de dobles ($J= 12.0, 4.0$ Hz, H-2) asignable al protón del anillo C del flavonoide. Este doble de dobles correlaciona con la señal ubicada en δ_C 79.0 (C-2) en el espectro de HSQC.
- En δ_H 3.83 y δ_H 3.81 se observan dos singuletes asignables a dos grupos metoxilos. Estos singuletes correlacionan con las señales ubicadas en δ_C 55.3 y 55.7 en el espectro HSQC (**Figura 9**). Uno de los grupos metoxilo se ubicó en la posición C-4' con base en los resultados obtenidos en el

espectro de 1D-NOESY (**Figura 10**). En este espectro se observa claramente que al irradiar el singulete centrado en δ_H 3.83 se observa efecto NOE en el doblete asignable a los hidrógenos H-3' y H-5'. Por otra parte, el segundo metoxilo (δ_H 3.81) se ubicó en la posición C-7 con base en análisis del espectro 1D-NOESY (**Figura 10**). En este espectro se observa que al irradiar el singulete en δ_H 3.81 se observa efecto NOE en las señales ubicadas en δ_H 6.07 y 6.05 asignables a los protones H-6 y H-8, respectivamente.

- e) En δ_H 3.10 se encuentra un doble de dobles ($J= 16.0, 12.0, H-3b$) y en 2.79 un segundo doble de dobles ($J= 16.0, 4.0, H-3a$). Ambas señales correlacionan con la señal en δ_C 43.0 en el espectro HSQC.

Los desplazamientos de los carbonos cuaternarios, se presentan en la **Tabla 10** y son los reportados por Rossi y colaboradores (1997).

Con base en las evidencias, el compuesto **I-B** se identificó como la 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavonona la cual es conocida con el nombre trivial de 4',7-dimetilnaringenina. Este compuesto a sido aislado a partir de *Piper mollicomun* (hojas) y *Piper hotzkyunm* (*Piperaceae*) (Lago *et al.*, 2007), así mismo se encontró como uno de los principales componentes en especies del género *Arnica* (Schmidt y Willum, 2000). Existen diversos estudios de este compuesto los cuales describen actividad contra el carcinoma de laringe utilizando la línea celular Hep₂, carcinoma mucoepidermoide pulmonar con la línea celular H₂₉₂ encontrando también propiedades citotóxicas y anticancerígenas (Garcez *et al*, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

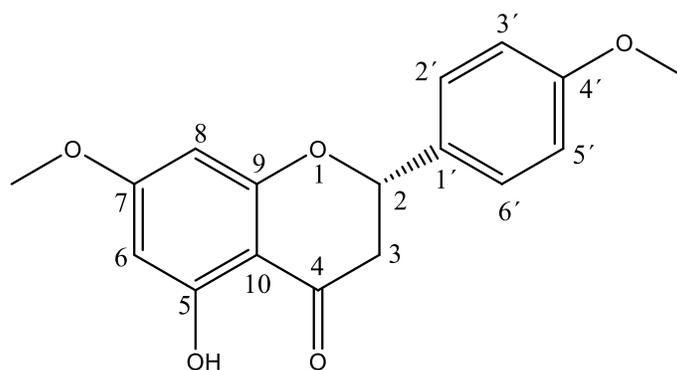


Figura 7. Estructura química de la 4',7-dimetilnaringenina.

Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para la 4',7-dimetilnaringenina (**I-B**).

Posición	^1H (δ) ^a	^{13}C (δ) ^a
1	-	-
2	5.37 (1H, dd, $J= 12.0, 4.0$ Hz)	79.0
3	3a, 2.79 (1H, dd, $J=16.0, 4.0$ Hz) 3b, 3.11 (1H, dd, $J=16.0, 12.0$ Hz)	43.0
4	-	196.0
5	-	164.1
6	6.05 (1H, d, $J=4.0$ Hz)	96.0
7	-	167.9
8	6.07 (1H, d, $J=4.0$ Hz)	98.4
9	-	162.9
10	-	-
1'	-	130.0
2', 6'	7.39 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz)	128.5
3', 5'	6.96 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz)	115.0
4'	-	160.0
-OCH ₃	3.81 (3H, s)	55.7
-OCH ₃	3.83 (3H, s)	55.4
-5-OH	12.0 (1H)	-

^a400 MHz, CDCl₃.

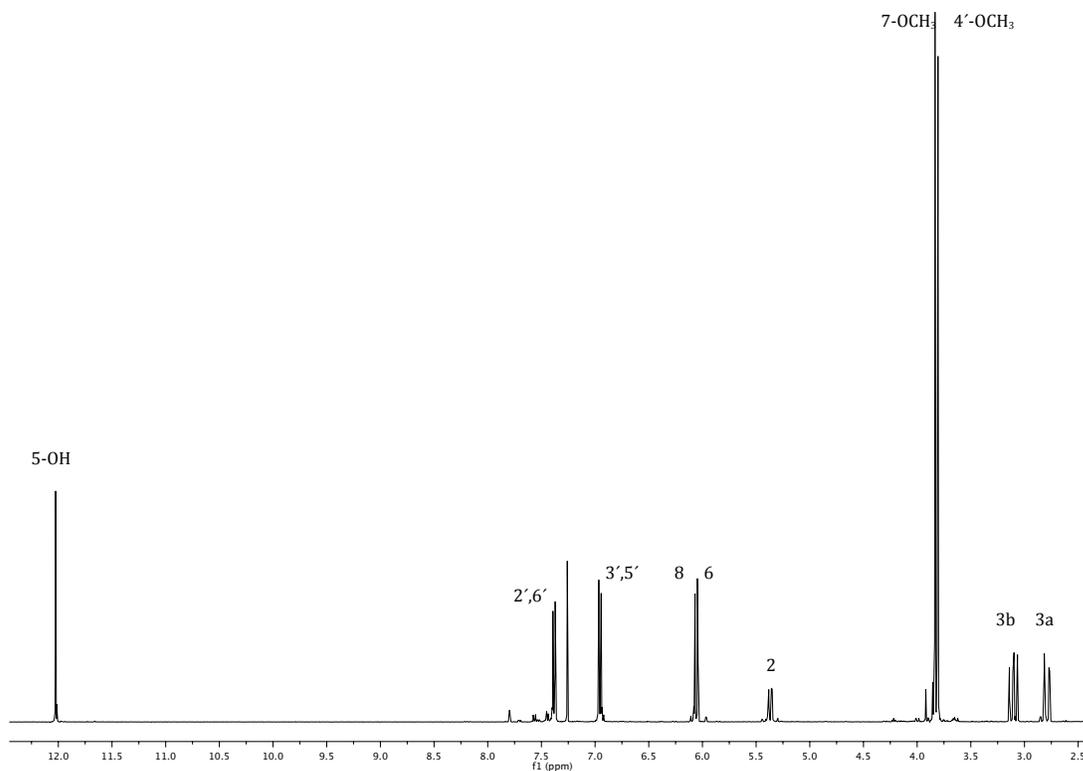


Figura 8. Espectro de RMN- H^1 de la 4',7-dimetilnaringenina (I-B)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

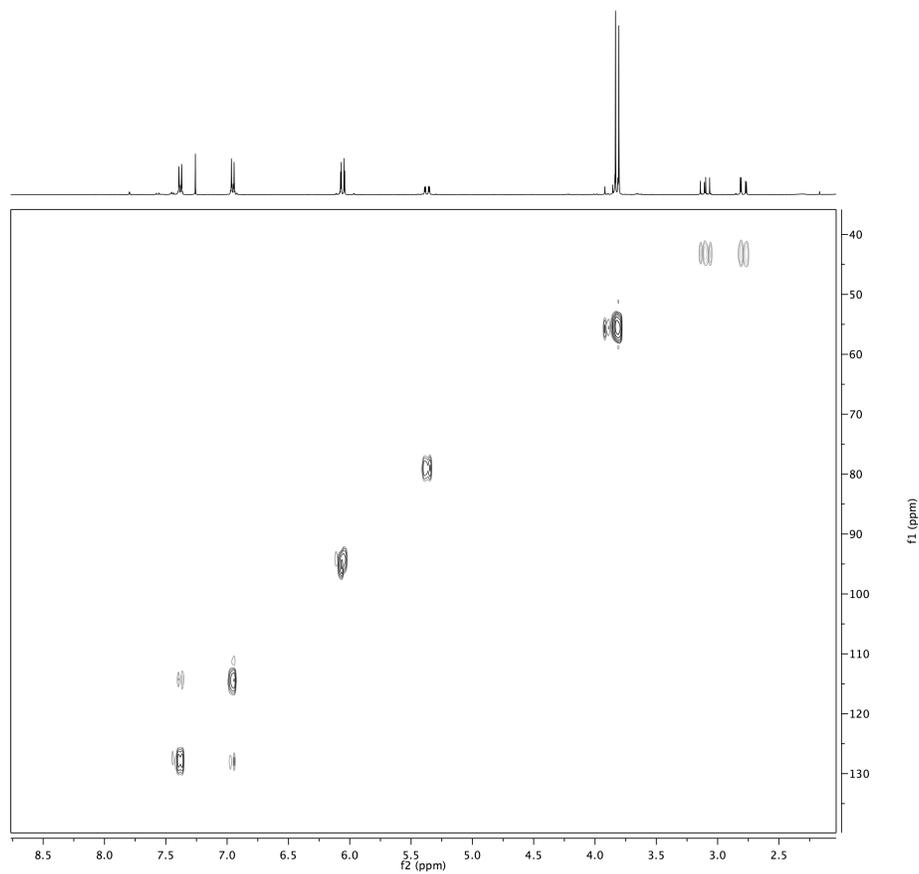


Figura 9. Espectro de HCQS de la 4',7-dimetilnaringenina (**I-B**)

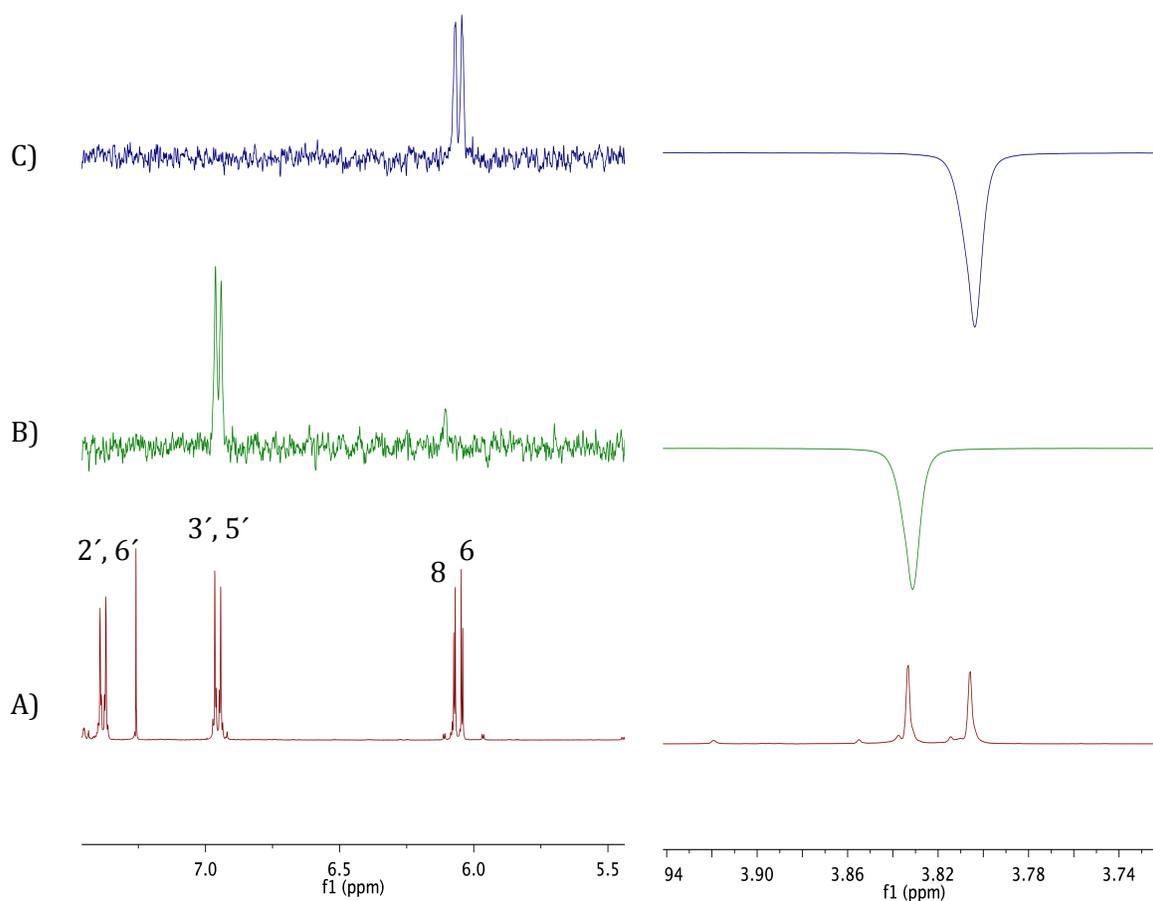


Figura 10. Espectro 1D-NOESY. A) RMN- H^1 de la 4',7-dimetilnaringenina (**1-B**), efecto NOE observado al irradiar la señal que se encuentra en 3.83 ppm (B) y 3.81 ppm (C).

6.3.2. Elucidación estructural del compuesto I-C

El compuesto **I-C**, se aisló como un sólido cristalino color amarillo, soluble en diclorometano. La fórmula molecular del compuesto se estableció como $C_{17}H_{14}O_6$ con base en el espectro de espectrometría de masas, en donde el ión molecular se encuentra en una relación masa carga de m/z 314.

El espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C que se muestran en las **Figuras 12 y 13**, presentan el perfil típico para los compuestos de tipo flavona (Rossi *et al.*, 1997). Las características del espectro registrado para el compuesto **I-C** se describen a continuación:

- a) En δ_H 11.73 un singulete asignable al proton de un grupo hidroxilo quelatado ubicado en la posición C-5 .
- b) En la región aromática del espectro de RMN- 1H , se observa un sistema A_2B_2 [δ_H 8.17 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz, H-2' y H-6'), 7.03 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz, H-3' y H-5')] y dos dobletes en δ_H 6.48 (1H, d, $J= 4.0$ Hz, H-6) y δ_H 6.37 (1H, d, $J= 4.0$ Hz, H-8). Estos pares de señales son asignables a los hidrógenos de los anillos B y A del flavonoide, respectivamente. Las señales del sistema A_2B_2 correlacionan con las absorciones en δ_C 129.35 (C-2' y C-6') y 114.06 (C-3' y C-5') en el espectro de HSQC, en tanto que los dobletes correspondientes a los protones del anillo A correlacionan con las señales en δ_C 97.86 (C-6) y 103.91 (C-8) (**Figura 14**).
- c) En δ_H 6.60 se observa un singulete el cual no correlaciona con ninguna señal en el HSQC por lo que se asigna a un hidrogeno de -OH en la posición C-3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- d) En δ_H 3.89 y δ_H 3.88 se observan dos singuletes asignables a dos grupos metoxilos. Estos singuletes correlacionan con las señales ubicadas en δ_C 55.4 y δ_C 55.8 en el espectro HSQC (**Figura 14**).
- e) Con base en las evidencias presentadas, el compuesto **I-C** se identificó como la 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona.

La asignación de los carbonos cuaternarios se realizó en base a su desplazamiento químico y se encuentran en la **Tabla 11**

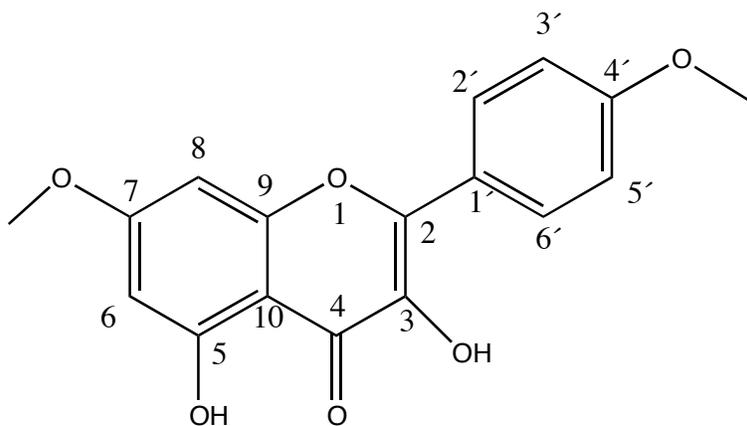


Figura 11. Estructura química de la 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para la 3, 5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona (**I-C**)

Posición	^1H (δ) ^a	^{13}C (δ) ^a
1	-	-
2	-	145.7
3	-	135.6
4	-	175.1
5	-	161.1
6	6.37 (1H, d, $J= 4.0$ Hz)	97.9
7	-	165.7
8	6.48 (1H, d, $J= 4.0$ Hz)	92.1
9	-	156.8
10	-	103.9
1'	-	123.2
2', 6'	8.17 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz)	129.3
3', 5'	7.03 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$ Hz)	114.1
4'	-	160.8
-OCH ₃	3.88 (3H, s)	55.8
-OCH ₃	3.89 (3H, s)	55.4
-5-OH	11.73 (1H)	-
-3-OH	6,60 (1H)	-

^a400 MHz, CDCl₃.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

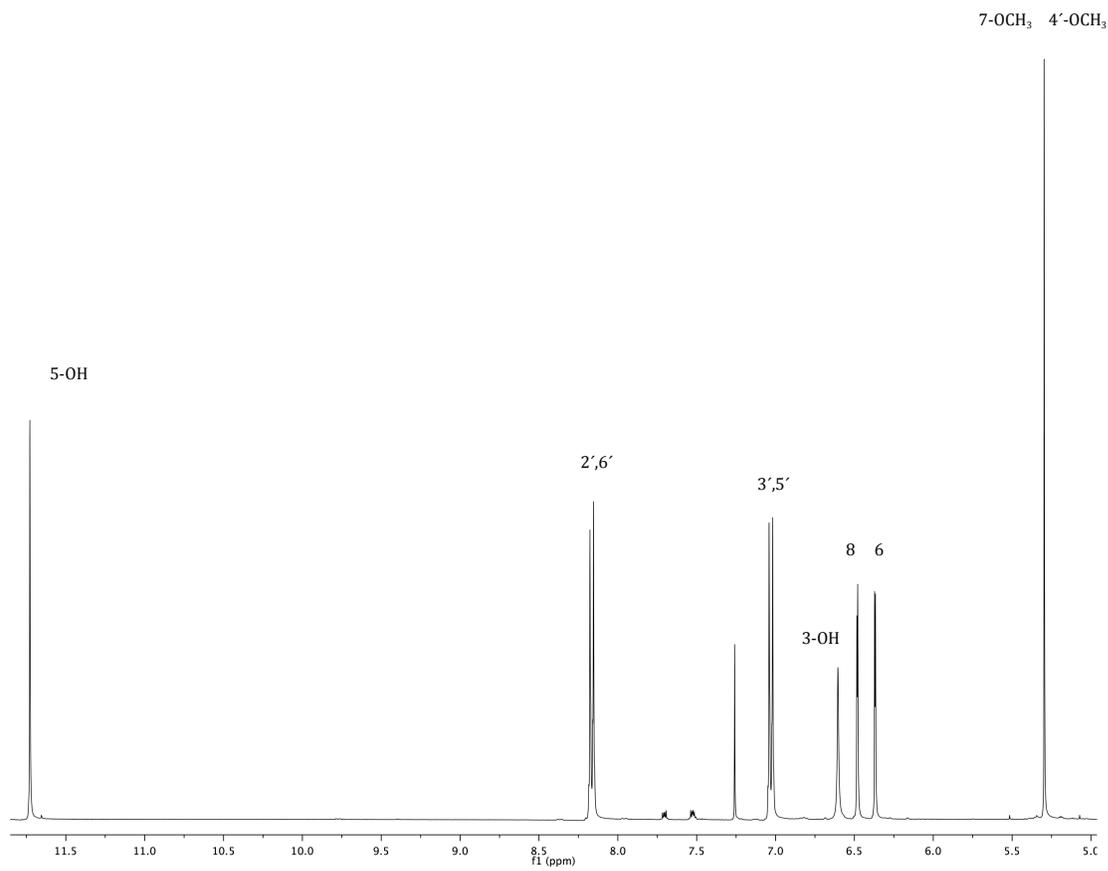


Figura 12. Espectro de RMN- H^1 de la 3, 5-dihidroxi- 4',7-dimetoxiflavona (I-C)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

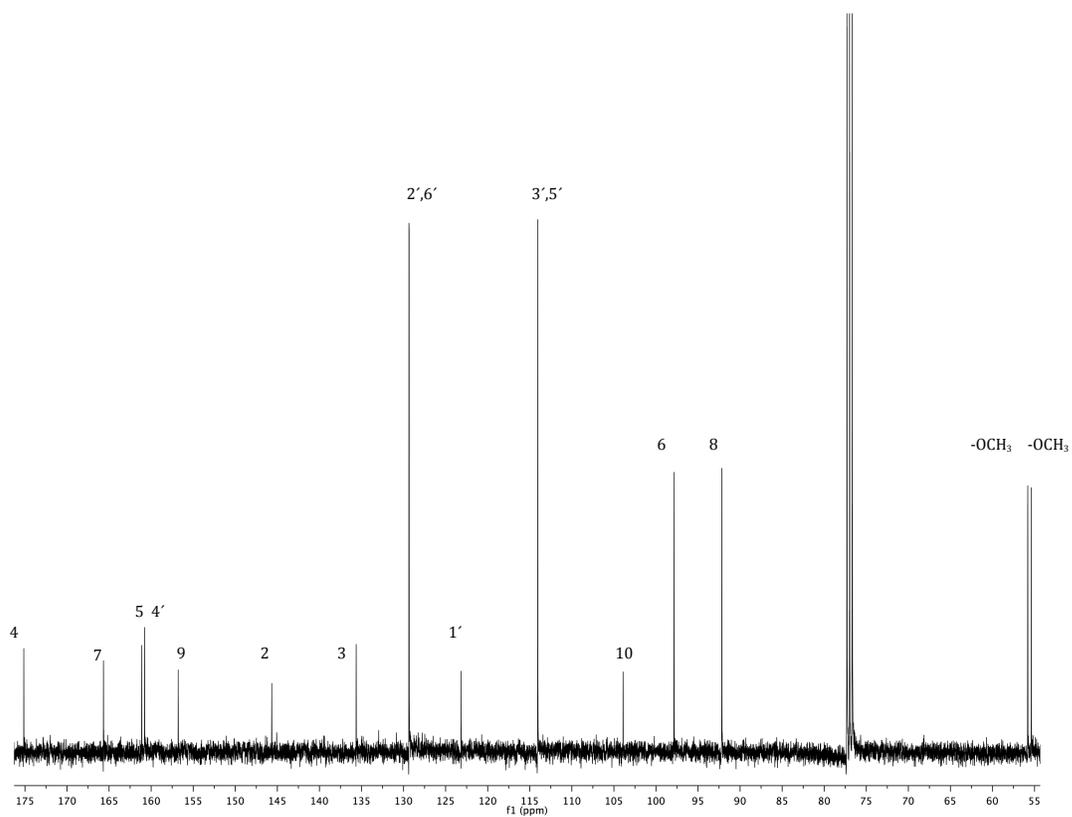


Figura 13. Espectro de RMN- C^{13} de la 3, 5-dihidroxi- 4',7-dimetoxiflavona (I-C)

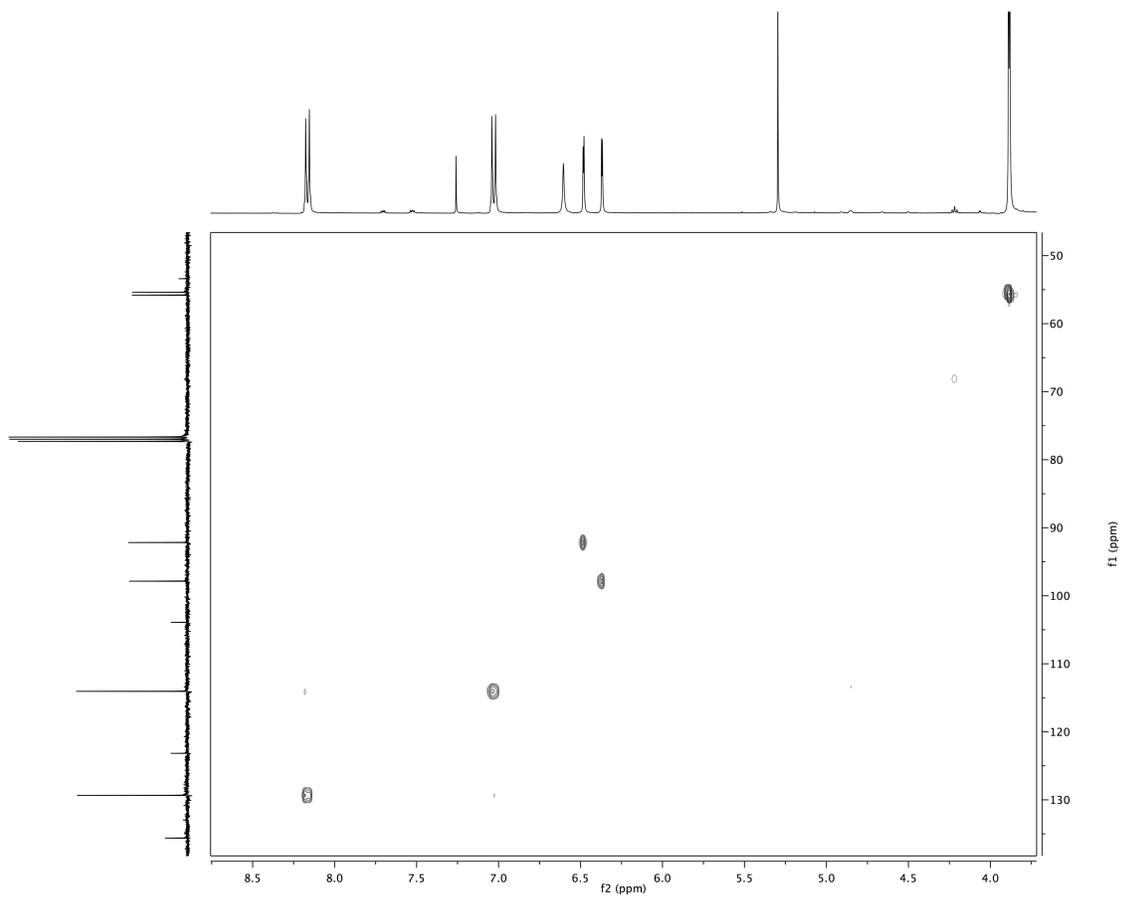


Figura 14. Espectro de HCQS de la 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona (**I-C**)

6.3.3. Elucidación estructural del compuesto II-A

El compuesto **II-A** se aisló como un sólido cristalino amarillo soluble en una mezcla de diclorometano acetona. La fórmula molecular del compuesto se estableció como $C_{17}H_{14}O_5$ con base en los espectros de RMN y espectrometría de masas. El ión molecular se encuentra en una relación masa carga de m/z 298.

Los espectros de RMN (**Figuras 17-19**) presentan el perfil típico para compuestos de tipo flavona (Guedes *et al.*, 2006 ; Lago *et al.*, 2007). Las características más importantes para el espectro son:

- a) En δ_H 12.81 un singulete asignable al proton de un grupo hidroxilo quelatado ubicado en la posición C-5 .
- b) En la región aromática del espectro de RMN- 1H , se observa un sistema A_2B_2 [δ_H 7.84 (2H, d, $J=$ 8.0 Hz, H-2' y H-6'), 7.01 (2H, d, $J=$ 8.0 Hz, H-3' y H-5'), dos dobletes en δ_H 6.48 (1H, d, $J=$ 4.0 Hz, H-6)] y δ_H 6.37 (1H, d, $J=$ 4.0 Hz, H-8). Estas señales son asignables a los anillos B y A del flavonoide. Las señales del sistema A_2B_2 correlacionan con las absorciones en δ_C 128.5 (C-2' y C-6') y 114.5 (C-3' y C-5') en el espectro de HSQC (**Figura17**), en tanto que los dobletes correspondientes a los protones del anillo A correlacionan con las señales en δ_C 92.6 (C-6) y 98.03 (C-8).
- c) En δ_H 6.57 aparece un singulete que se asigna a H-3. Este singulete correlaciona con la señal en δ_C 104.4 (C-3) en el espectro de HSQC (**Figura 17**).
- d) En δ_H 3.89 y δ_H 3.88 se observan dos singuletes asignables a dos grupos metoxilos. Estos singuletes correlacionan con las señales ubicadas en δ_C 55.5 y 55.7 en el espectro HSQC (**Figura 17**). Uno de los grupos metoxilo se ubicó en la posición C-4' con base en los resultados obtenidos en el espectro de 1D-NOESY. En este espectro se observa claramente que al irradiar el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

singlete centrado en δ_H 3.89 se observa efecto NOE en el doblete asignable a los hidrógenos H-3' y H-5' (**Figura 18**). Por otra parte, el segundo metoxilo (δ_H 3.88) se ubicó en la posición C-7 con base en análisis del espectro de 1D-NOESY (**Figura 18**). En este espectro se observa que al irradiar el singlete en δ_H 3.88 se presenta efecto NOE en las señales en δ_H 6.47 y 6.36 asignables a los protones H-6 y H-8, respectivamente.

Los desplazamientos de los carbonos cuaternarios se presentan en la **Tabla 12** y son los reportados por Guedes y colaboradores (2006).

Con base en las evidencias presentadas, el compuesto **II-A** se identificó como la 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona el cual se nombra comúnmente como 4',7-dimetilapigenina. Este compuesto se a identificando en la resina de las hojas de la especie vegetal *Cistusladanifer* (Chaves *et al*, 1998); en *Rosmarinus officinalis* (Amela *et al.*, 2007) y en diferentes especies del genero *Artemisa*: *A. ordosica*, *A. iwayomogi* y *A. afra* (Dong-Bao *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004).

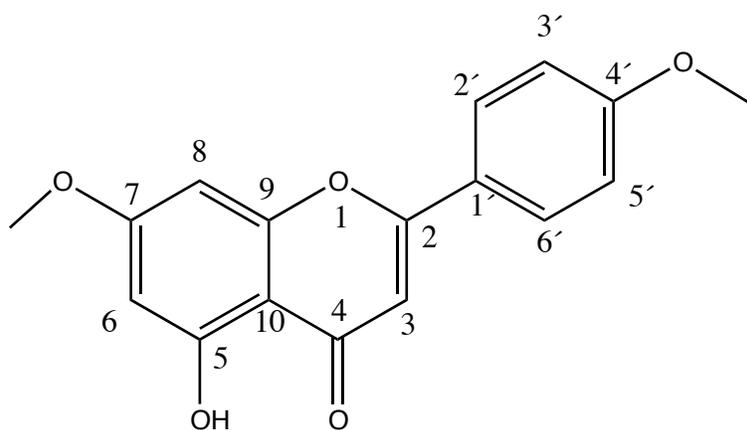


Figura 15. Estructura química de la 4',7-dimetilapigenina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para la 4',7-dimetilapigenina (**II-A**).

Posición	^1H (δ) ^a	^{13}C (δ) ^a
1	-	-
2	-	128.0
3	5.57 (1H, s)	104.4
4	-	182.0
5	-	157.6
6	6.37 (1H, d, $J= 4.0$ Hz)	92.6
7	-	155.3
8	6.48 (1H, d, $J= 4.0$ Hz)	98.03
9	-	162.9
10	-	-
1'	-	123.5
2', 6'	7.84 (2H, d, $J= 8.0$ Hz)	128.5
3', 5'	7.01 (2H, d, $J= 8.0$ Hz)	114.5
4'	-	163.9
-OCH ₃	3.89 (3H, s)	55.5
-OCH ₃	3.88 (3H, s)	55.7
-5-OH	12.81 (1H)	-

^a400 MHz, CDCl₃.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

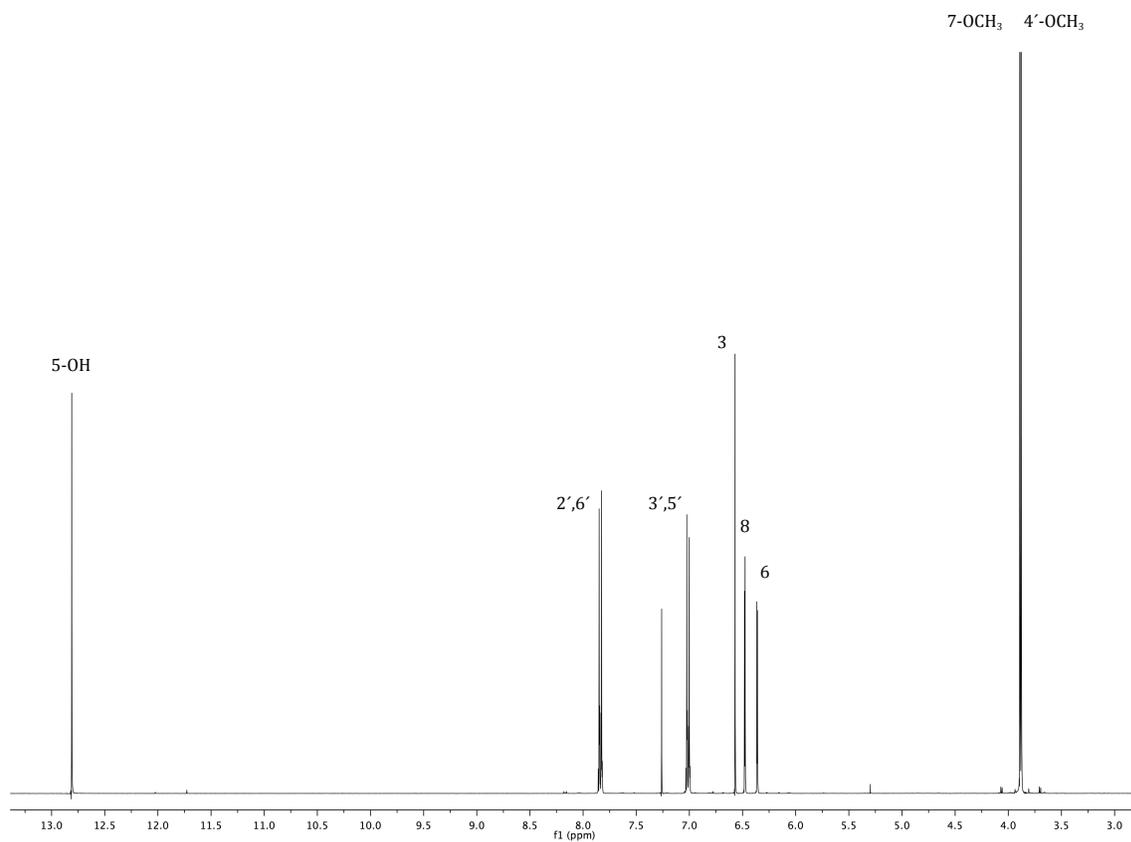


Figura 16. Espectro de RMN- H^1 de la 4',7-dimetilapigenina (**II-A**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

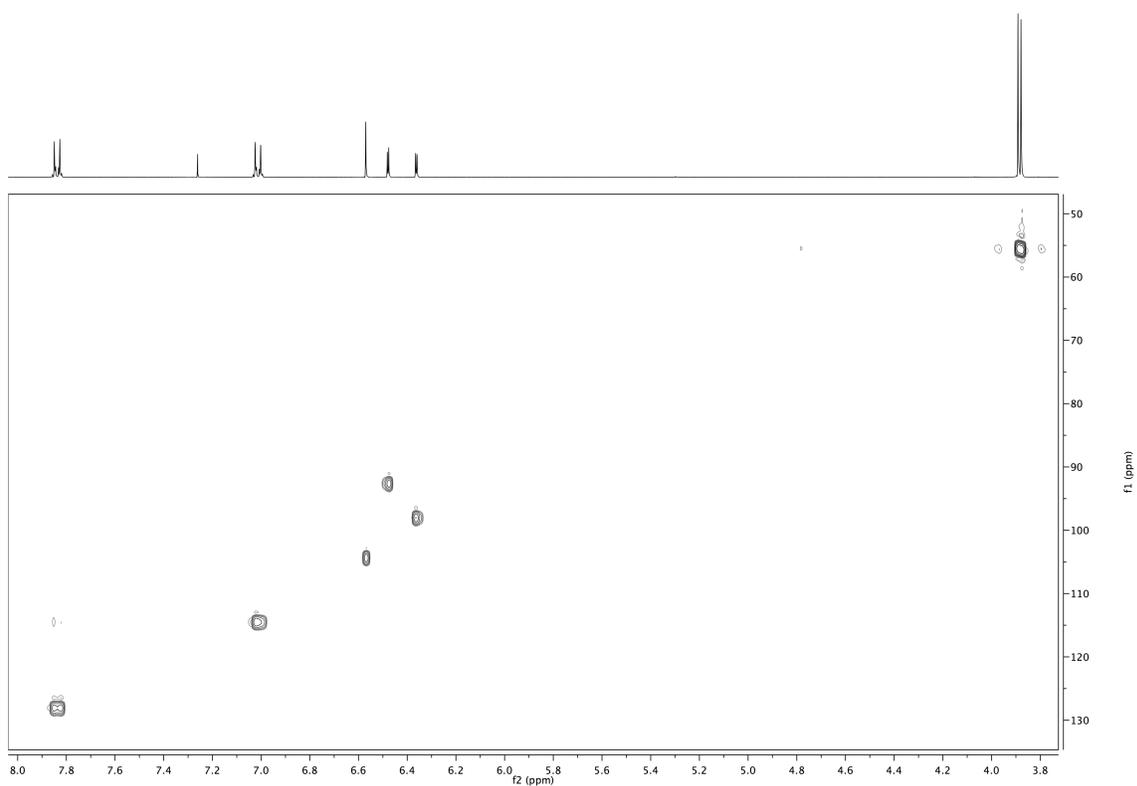


Figura 17. Espectro de HCQS de la 4',7-dimetilapigenina (II-A).

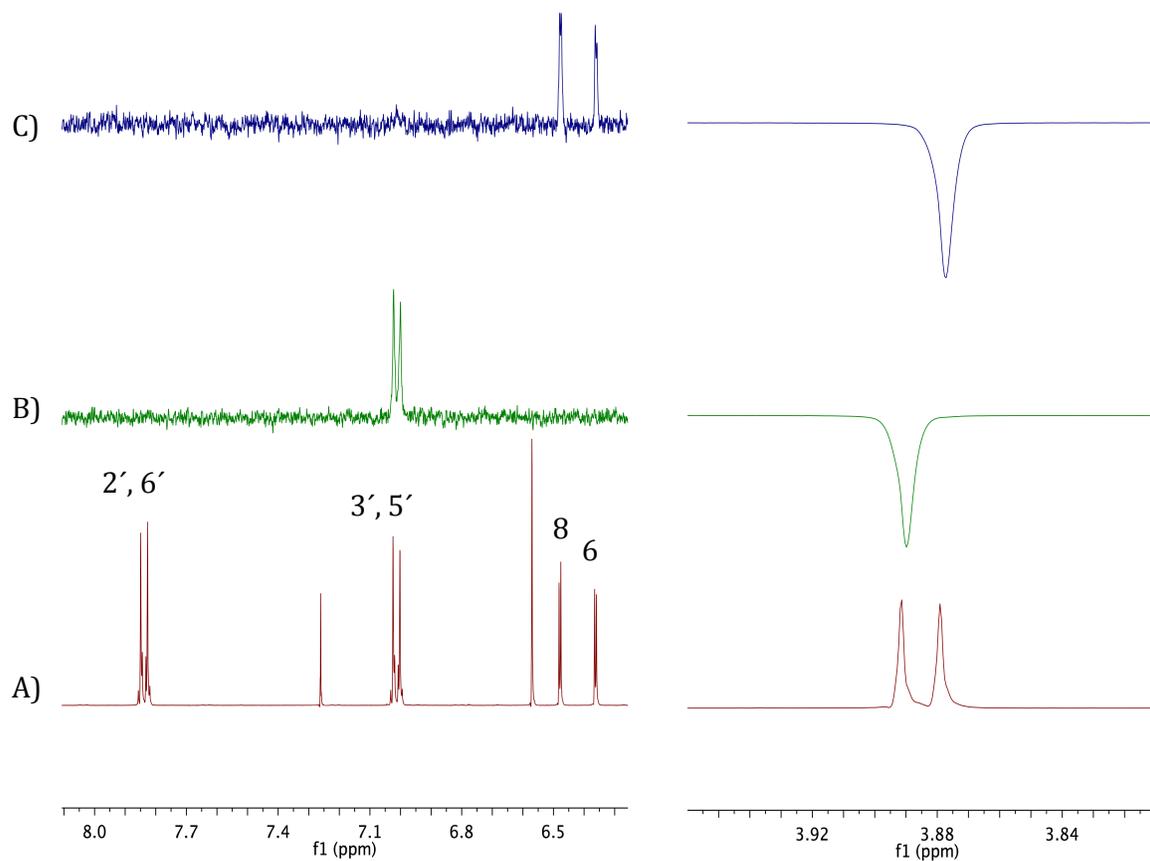


Figura 18. Espectro 1D-NOESY. A) RMN- H^1 4',7-dimetilapigenina (**II-A**). Efecto NOE observado al irradiar la señal que se encuentra en 3.88 ppm (B) y en 3.89 ppm (C).

6.4. Evaluación de la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de los compuestos puros.

El radical catiónico ABTS \bullet + es un cromóforo que se genera a partir de una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio. En esta técnica la cuantificación de la actividad antioxidante esta basada en la decoloración del radical libre que reacciona fuertemente con un donador de átomos de hidrógeno convirtiéndose en ABTS incoloro (Prior *et al.*, 2005). La reacción se ilustra en la **Figura 19**.

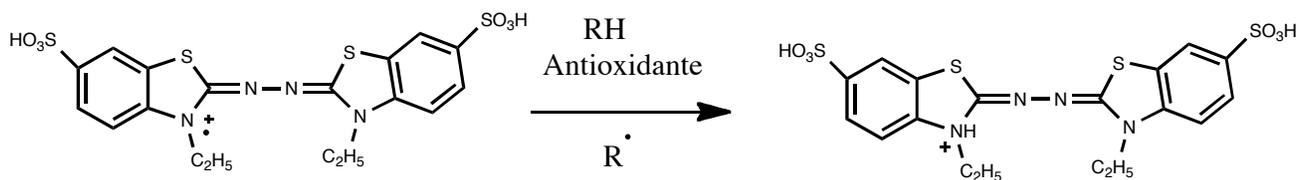
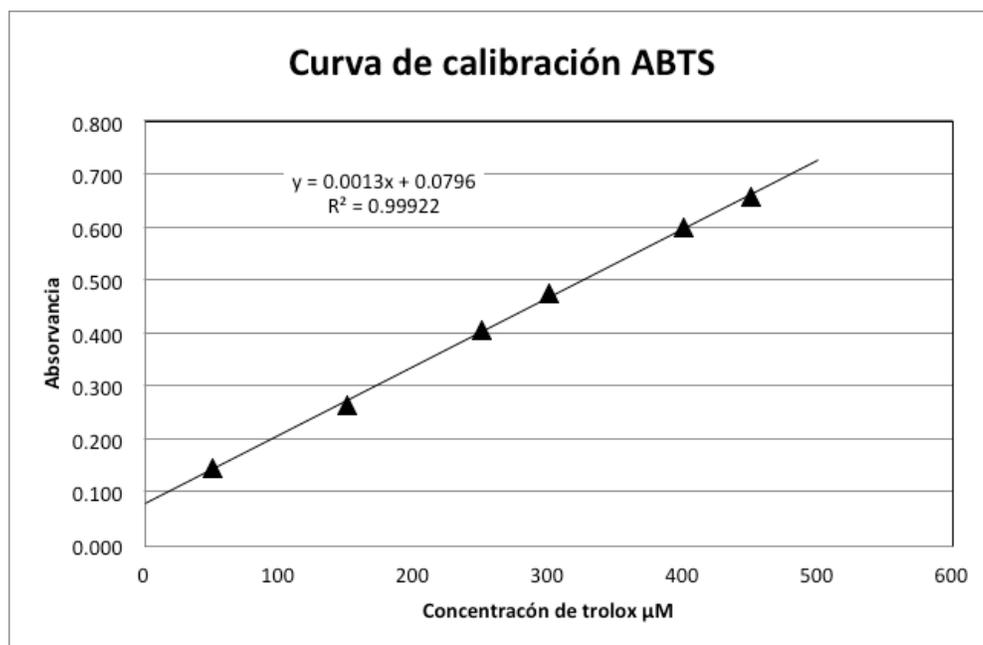


Figura 19. Reacción entre al ABTS y el antioxidante

Los resultados obtenidos para este ensayo se expresan como concentración μM de Trolox eq./mg de muestra. La curva de calibración se realiza utilizando Trolox en un rango de concentraciones de 0 a 500 μM . En la **Gráfica 4** se observa que en este rango de concentraciones la ecuación que se obtiene se adecúa a una recta con un coeficiente de correlación lineal ($R^2=0.9992$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Gráfica 4. Curva de calibración de Trolox (ABTS)

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 13**, en esta se observa que el compuesto **I-B** es el que presenta mayor actividad seguido del extracto E001, en cuanto a los compuestos **I-B** y **II-A** estos no presentan una actividad antioxidante relevante.

Tabla 13. Resultados de actividad frente al ABTS

Muestras	Conc. de muestra utilizada (mg/ml)	μM de Trolox eq. por mg de muestra
E001	0.3	58,513
I-B	1	7,272
I-C	0.08	82,885
II-A	1	4,669

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Por otra parte, se realizó un segundo método para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos aislados, mediante la determinación de la decoloración del radical libre DPPH, el cual es uno de los métodos más utilizados para determinar la actividad antioxidante de los alimentos y las plantas medicinales. El radical DPPH• es uno de los pocos radicales estables y comercialmente disponibles, su principal característica es que presenta un color violeta intenso, el cual disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical. Esta propiedad es aprovechada para cuantificar que tanto un compuesto puede neutralizar al radical midiendo el grado de decoloración que éstas provocan en una solución metanólica de DPPH (Prior *et al.*, 2005).

El fundamento del método se basa en la interacción de los antioxidantes con el radical estable libre, 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (color violeta) para convertirlo en su forma reducida DPPH-H (1,1-Difenil-2-picrilhidrazina, color amarillo) como se observa en la **Figura 20**.

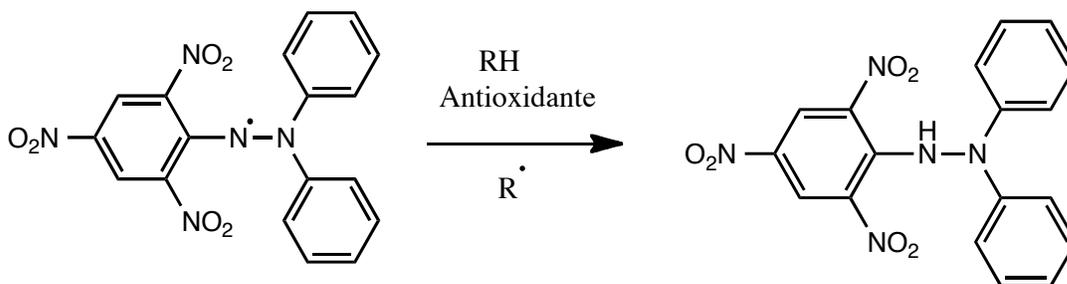
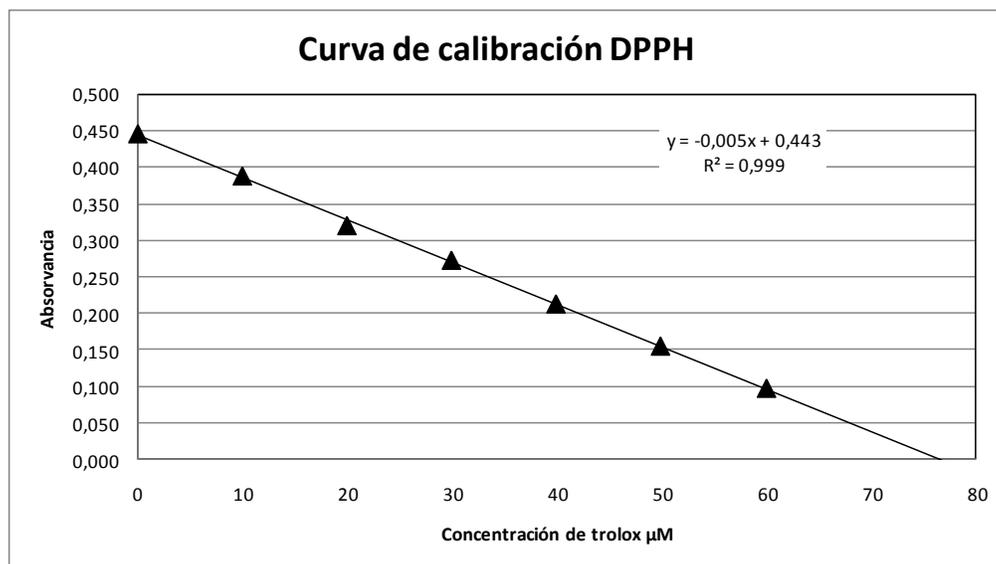


Figura 20. Reacción entre el DPPH y el antioxidante

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante utilizando el método del DPPH se expresan como concentración μM de Trolox eq. por mg de muestra, y para ello, se realizó una curva (**Gráfica 5**) de calibración con Trolox en un rango de concentraciones de 0 a 60 μM , se observa que en este rango de concentraciones la ecuación que se obtiene se adecúa a una recta con un coeficiente de correlación lineal ($R^2=0.9992$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Gráfica 5. Curva de calibración de Trolox (DPPH)

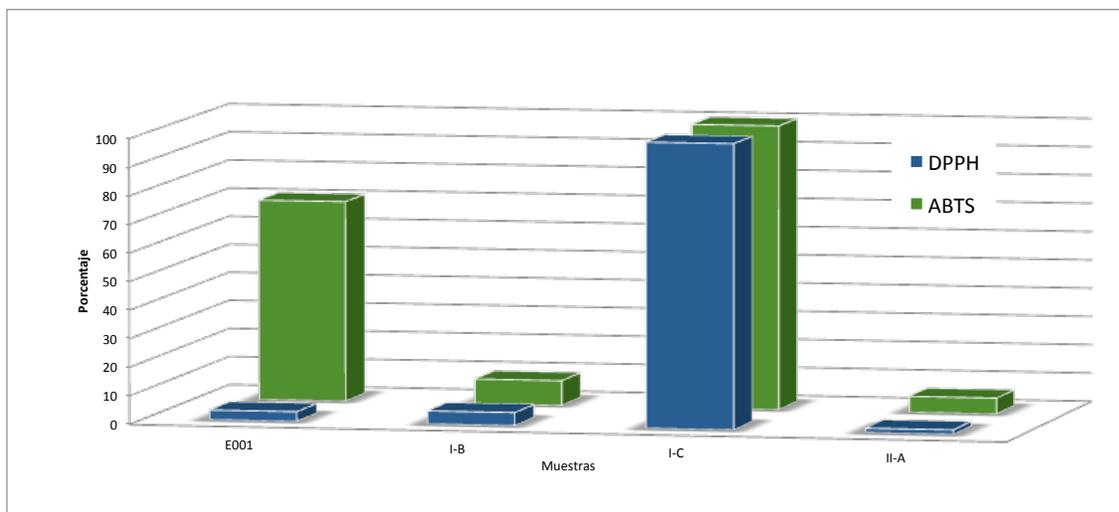
Los resultados presentados en la **Tabla 14** muestran que el compuesto I-C es el que presenta la mayor actividad antioxidante al ser comparado con el extracto y los compuestos I-B y II-A.

Tabla 14. Resultados de actividad frente a DPPH

Muestras	Conc. de muestra utilizada (mg/ml)	μM de Trolox eq. por mg de muestra
E001	0.3	195
I-B	0.5	263
I-C	0.08	5703
II-A	0.5	91

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Otra forma de presentar los resultados de las pruebas anteriores, es integrando los datos en una sola gráfica, en donde transformamos los resultados obtenidos a porcentaje, tomando la mejor actividad como el cien por ciento (**Gráfica 6**).



Gráfica 6. Gráfica de los resultados del DPPH y ABTS.

En esta Gráfica se observa que en ambos casos el compuesto I-C es el que presenta la mejor actividad antioxidante. En el caso del E001 se observa una mejor actividad al neutralizar el radical catiónico ABTS que el radical DPPH.

Al realizar un análisis de las estructuras de los compuestos aislados se observa que las diferencias se presentan en las posiciones C-2 y C-3 del anillo C de los flavonoides estudiados. En el caso particular del compuesto I-C, este presenta una insaturación entre C-2 y C-3 y un grupo hidroxilo en C-3 (**Figura 21**). Esta diferencia es determinante para la actividad antioxidante encontrada para este compuesto. Por otra parte, es importante mencionar que el radical libre DPPH es más selectivo que el radical libre catiónico ABTS, ya que a diferencia de este

último, el radical DPPH no reacciona con los flavonoides que no presentan grupos hidroxilo en el anillo B ni con ácidos aromáticos con un solo grupo hidroxilo (Roginsky *et al.*, 2005), lo que explicaría la diferencia de los resultados de E001 entre ambos métodos.

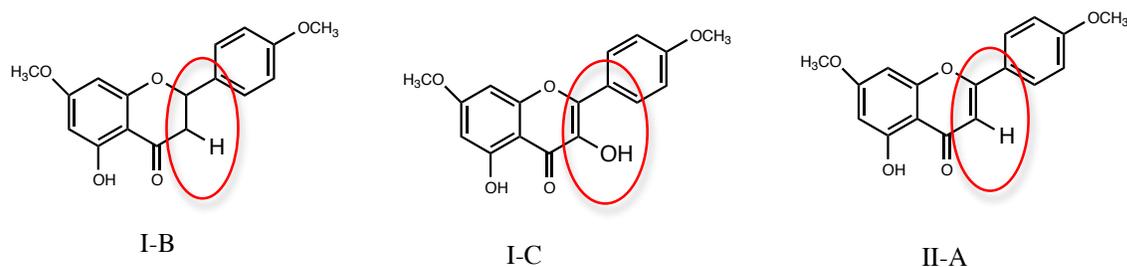


Figura 21. Diferencias estructurales entre los tres compuestos aislados

6.5 Actividad antimicrobiana

El bioensayo consistió en la determinación del efecto del extracto etanólico del propóleo sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*. Los resultados obtenidos indican que el extracto del propóleo inhibe el crecimiento de la bacteria seleccionada con una concentración mínima inhibitoria de 550 $\mu\text{g/mL}$. Cabe mencionar que en México los estudios sobre el propóleo son muy escasos, motivo por el cual, fue seleccionado el material de dicha experimentación

El efecto de los compuestos puros sobre el crecimiento de la bacteria *S. mutans* se determinó utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente y los resultados se observan en la **Tabla 15**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 15. CIM de las diversas muestras

Muestra	CMI ($\mu\text{g/mL}$) para <i>S. mutans</i>
E001	550
I-B	1050
I-C	1050
II-A	1000

Comparando los resultados de las diferentes muestra se observa que E001 tiene una CMI menor que los compuestos puros, con esto nos damos cuenta que la actividad que este presenta no es debida a dichos compuestos.

Con base en los resultados de los CMIs, se puede observar que E001 y los compuestos aislados poseen una actividad antibacteriana moderada sobre las bacteria patógena *S. mutans* . Es importante mencionar que un compuesto se considera activo si su CMI es menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Rivero-Cruz *et al.*, 2008;). Al comparar la actividad obtenida para el extracto y los compuestos con el antibiótico comercial utilizado como control positivo, se observa que el gluconato de clorhexidina presenta una concentración mínima inhibitoria menor a la de los flavonoides aislados (Rivero *et al.*, 2008).

7. CONCLUSIONES

- El estudio químico del extracto activo preparado a partir de una muestra de propóleo recolectada en la Delegación Milpa Alta del Distrito Federal, permitió el aislamiento y la caracterización de los flavonoides (4',7-dimetilnaringenina, 4',7-dimetilapigenina y 3,5-dihidroxi-4,7'dimetoxiflavona)
- Con base en los resultados obtenidos podemos afirmar que la 3,5-dihidroxi-4,7'dimetoxiflavona es uno de los compuestos responsables de la actividad antioxidante del extracto y que la posición del hidroxilo en posición C-3 con la insaturación entre C-2 y C-3 es fundamental para dicha actividad.
- Los compuestos aislados presentan concentraciones mínimas inhibitorias sobre la bacteria careogénica *Streptococcus mutans* en un rango 1000 a 1050 µg/mL por lo que de acuerdo con los criterios descritos en la literatura (Rivero *et al.*, 2008) esta actividad puede considerarse como moderada.
- En el presente estudio fitoquímico se describe por primera vez la presencia de la 3,5-dihidroxi-4,7'dimetoxiflavona en un propóleo mexicano. Por otra parte, el flavonoide 4',7-dimetilnaringenina ha sido reportado en diferentes muestras de propóleo recolectadas en la zona rural del Distrito Federal por lo que puede considerarse como un compuesto marcador para los propóleos de la zona.



8. PERSPECTIVAS

- ❖ Continuar con el estudio del mecanismo mediante el cual la 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona ejerce su efecto antioxidante.
- ❖ Finalizar el estudio de las fracciones secundarias activas, con la finalidad de aislar y purificar los compuestos minoritarios.
- ❖ Desarrollar un método analítico por HPLC para cuantificar a los flavonoides aislados y establecer su presencia en propóleos recolectados en otras regiones de México.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., Paster, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46 (4), 1407-1417.
- Alencar, S., Oldoni, T., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., Rosalen, P. L. e Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007, 113, 278-283.
- Amela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J., Roca, M. y Rabe, V. Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of Rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography*. 2007, 1120, 221-229.
- Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F. y Cormier, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod*. 1994, 57(5), 644-647.
- Asís, M. Apiterapia para todos. Como usar los siete productos de la colmena para curar. Ed. Científico Técnica. 1993, 60-96
- Bankova, V. y Popova, M. Bogdanov S, Sabatini A. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch* 2002, 57c, 530-533.
- Bankova, V-S., De Castro, S-L. y Marcucci, M-C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000, 31, 3-15.
- Bankova. V. Determininig quality in propolis samples. *J Am Apither Soc* 2000; Vol 7, No 2.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banskota, A., Tezuka, Y., Adnyana, I., Midorikawa, K., Matsushige, K. y Message, D. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 2000, 72(1-2), 239-246.
- Boulton, D., Walle, U., y Walle, T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *Pharmacol.* 1998, 50, 243-249.
- Bratter, C., Tregel, M., Liebenthal, C. y Volk, H. Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: A clinical pilot investigation. *Forsch Komplementarmed* 1999, 6(5), 256-260.
- Burdock, G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology.* 1998, 36, 347-363.
- Cardile, J., Cury, J. y Bowen, W. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. . *Life Sciences.* 2003, 73, 1027–1035.
- Castaldo, S. y Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002, 73 Suppl. 1, S1-S6.
- Castro, S-L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Science.* 2001, 3, 49–83.
- Claus, R., Kinscherf, R., Gehrke, C., Bonaterra, G., Basnet, P. y Metz, J. Antiapoptotic effects of propolis extract and propel on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzn Forsch Drug Res* 2000, 50(4), E373-E379.
- Cortez-Gallard, V., Macedo-Ceja, P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D. y Rodríguez-Landa, J. *Farmacognosia:*

breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. Rev Biomed 2004, 15, 123-136.

- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B., Ramírez-Apan, T. y Cárdenas, J. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. Z Naturforsch 2002, 57c, 372-378.
- Chaves, N., Rios, J., Gutiérrez, C., Escudero, J. Y Olias, J. Analysis of secreted flavonoid of *Cistus ladanifer* L. by high performance liquid chromatography beam mass spectrometry. Journal of Chromatography. 1988, 799, 111-115.
- Chung, J. Y., Choo, J. H., Lee, M. H., Hwang, J.K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine, 2006,13, 261-266.
- da Silva- Leitão, D. P., da Silva-Filho, A. A., Morseli-Polizello, A. C., Kenupp- Bastos, J., Cropanese-Spadaro, A. C. Comparative evaluation of in- vitro effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. Biol. Pharm. Bull., 2004, 27 (11), 1834-18
- da Silva, J., Herrmann, S., Heuser, V., PossaMarroni, N, Gonzales-Gallego, J. y Erdtmann, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. FoodChemToxicol. 2002, 40, 941-7.
- Dantas, F. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. Journal of Ethnopharmacology 2006, 103, 187–193.
- Das, DK. Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and

- characterization. *MethodsEnzymol*, 1994, 234, 410-420.
- Dong-Bao, Z., Yu-Xia, Y., Wei, A., Xiu-Hua, L., y Han Qing, W. Studies on flavonoids from herb of *Artemisia ordosica*. *Journal of Chromatography*.2005, 30 (18) 1430-1432.
 - Duthie, G. y Crozier, A. Current. Opinion, Clinical, Nutrition, Metabolic, Care, 2000, 3, 457-471.
 - Fatokun, A., Stone, T. y Smith R. Oxidative stress in neurodegeneration and available means of protection. *Front Bio*. 2008, 13, 3288-311.
 - Freitas, G. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalistrophozoites*. *Phytomedicine*. 2004.
 - Funari, C. y Ferro, V. Análise de própolis. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 2006, 26, 171-178.
 - Garcez, F., Garcez, W., Santana, A., Alves, M., Matos, MF.,Scaliante, A. Bioactive Flavonoids and triterpenes from *Terminalia Fagifolia* (Combretaceae). *Journal Brazilian Chemistry Society*. 2006, 17, 7, 1223-1228.
 - Gekker, J. M. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microbial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 102, 158– 163.
 - Giralt, T. Producción, cosecha, manejo poscosecha, Caracterización de propóleos y forma de empleo en la terapia de diferentes enfermedades. *Memorias IV Seminario Internacional de abeja africanizada Universidad Nacional de Colombia sede Medellín*. 2001, Ago, 25-38.

- Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. Y Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41, 1220-1234.
- Grassi, D., Desideri, G. y Ferri C. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*. 2010, 2,889-902.
- Guedes, J., da Silva, M., da-Cunha, E., Atháide-Filho, F., Melo, M., da Silva, M., Takemura, O. y Barbosa-Filho, J. Chemical Constituents and Analgesic Activity of *Conocliniopsis prasiifolia*. *Pharmaceutical Biology*. 2006, 44, 76-78.
- Havsteen, B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32,1141-1148.
- Hegazi, A., Abd, E. y Hady F. Egyptian propolis: 1 Antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. *Z Naturforsch* 2001, 56(1-2), 82-88.
- Hertog. MGL., Hollman, PCH. y Putte van de B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruitjuices. *J Agric Food Chem*, 1996, 41, 1242-1246
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O. y Kondo K, Antioxidantability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Internal Medicine I, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. J Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2001, 47, 357-362.
- Hodnick, W., Milosavljevic, E., Nelson, J. y Pardini, R. Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of

mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochempharmacol.* 1988, 37, 2607-11.

- Hu, F., Hepburn, H., Yinghua, L., Chen, M., Radloff, S. y Daya, S. Effects of ethanol and wáter extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. . *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 100, 276–283.
- Isla, M., Nieva, M., Sampietro, A. y Vattuone, M. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 2001, 76(2), 165-170.
- Jovanovic, S.V., Steenken,S., Simic, M.G. y Hara, Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals, 1998 p. 137-161. *In* M. Dekker (ed.). Rice Evans C PL, Nueva York, EEUU.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinis, I. y Karathanos, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 2009, 116, 452-461.
- Kim, A., Zou, Y., Park, T., Shim, K., Kim, M., Kim, N., Kim, J., Bae, S., Choi, J. Y Chung, H. Active components from *Artemisa iwayomogi* displaying ONOO⁻ Scavenging Activity. *Phytotherapy Research*. 2004, 18, 1-7.
- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46, 1302-1309.
- Krell, R. Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services*

Bulletin No. 124. Rome 1996.

- Kühnau, J. The Flavonoids: a class of semiesential food components: their role in human nutrition. *World Rev NutrDiet*, 1976, 24, 117-190.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T. y Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 2004, 84, 329-39.
- Kumazawa, S., T. Hamasaka., T. Nakayama. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 2004, 84(3), 329–339.
- Lago, J., Young, M., Reigada, J., Soares, M., Roesler, B. y Kato, M. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. ihotzkyanum* (*Piperaceae*). *Quimica nova*. 2007, 30(5), 1222-1224.
- Libério, S.A., Pereira, A.L. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009, 125, 1-9.
- Lu, L., Chen, Y., y Chou, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, 102, 213-220.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*. 2002, 17, 271-278.
- Merck, S.A. Industrias Químicas: Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Informe a Profesionales, 2000.



- Miranda, C. Antioxidant Activities of Flavonoids [online]. Department of Environmental and Molecular Toxicology Oregon State University. [visitado en abril, 2003]. Disponible en <<http://ip.i.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>>.
- Muñoz, O., Peña, R., Ureta, E., Montenegro G. y Timmermann B. Propolis from Chilean matorral hives. *Z Naturforsch* 2001, 56(3-4), 269-272.
- Olsen, I., Shhah H., Gharbia, S. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontal* **2000**, 20, 14-52
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Oral Health. **2007**. Revisado el 15 de enero 2011
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html>
- Park, Y., Alencar, S. y Aguiar, C. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* 2002, 50(9), 2502-2506
- Peña, R. C. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación agraria.* 2008, 35, 17-26.
- Pérez, J. y Saura, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of results. *Int J FoodSci and Tech.* 2008, 43,185-91.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G. y Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *PhytochemicalAnalysis.* 2004, 15, 235-240.

- Reiter, R., Tan D. y Burkhardt, S. Reactive oxygen and nitrogen species and celular and organism decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev.* 2002, 123,1007-19
- Rivero-Cruz, J., Zhu, M., Kinghom, A. D. y Wu, C. D. Antimicrobial constituents of thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters.* 2008, 1, 151-154.
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. "Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits". *Food Chemistry* (66). 1999, 401- 436.
- Roginsky, V., Lissi, E-A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry.* 2005, 92, 235-254.
- Rossi, M., Yoshi, M. y Soares, J. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids in *Aniba* species. *Phytochemistry.* 1997, 45, 1263-1269.
- Rowland, M. y Tozer, T.N. *Concepts and Applications. Pharma cokinetics.* 3 Ed: Williams &Wilkins. Baltimore, 1995.
- Saskia, ABE., van Accker y Bast AALT. StructuralAspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease.* Ed Marcel Dekker, INC. New York. 1998, 9, 221-251.
- Sayre, L., Perrym, G. y Smith M. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008, 21, 172-88.
- Schieber, A., Stintzng, F., Carle, R. Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in Food Science &Technology*(12). 2001, 401-413

- Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., Van Tunen, A.J. y Bovy, A.G. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 2004, 65, 2631.
- Schmidt, T. y Willum, G. Sesquiterpenelactone and flavonoid variability of the *Arnica augustifolia aggregata* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2000, 28, 133-142.
- Serkedjieva, J., Manolova, N. y Bankova, V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *J Nat Prod* 1992, 55(3), 294-302.
- Sestili, P., Diamantini, G., Bedini y cols. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem J*, 2002, 364, 121-128
- Sforcin, J. y Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, 133, 253-260.
- Silici, J. y Katluca, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 99, 69–73.
- Simone-Finstrom, M. y Spivak, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honeybees. 2010, 41, 295-311.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Singleton, V. y Rossi, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enology Vit.* 1965, 16,144-58.
- Song, F. A. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 82, 89-95.
- Sorkun, K., Süer, B. y Salih B. Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Z naturforsch* 2001, 56(7-8), 666-668.
- Stangaciu, S. Cuidados para la producción y extracción de propóleos. *Espacio Apícola*. 1998, 33, 24-29.
- Terao, J., Yamaguchi, S., Shirai, M. y Cols. Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radic Res*, 2001, 35, 925-931.
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P. y Cols. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of celular activation. *Free Rad BiolMed*, 1994, 16, 547-553.
- Yanucci, H. Principios básicos sobre propóleos. *Boletín del colmenar S.A.D.A*, 2000, 5 No. 39, 20-21.
- Yildirim, H. Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacological Research*, 2004, 49, 287–292.
- Yoshida, A., Ansa, T., Takehara, T., Kuramitsu, H. K. y Luxs-Based. Signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 2372-80.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Youdim, KA., Qaiser, MZ., Begley, DJ., Rice-Evans, CA. y Abbott, NJ. Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood–brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine* 2004, 36, 592-604.
- Zhihong, C., Jeffrey, M. yLiangli, Y. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *J Agric Food Chem.* 2006, 54, 7429-36.

