



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

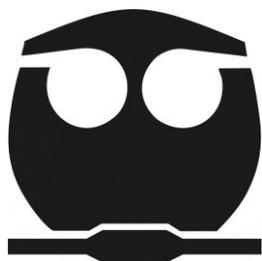
**ESTUDIO QUÍMICO DE UNA MUESTRA DE PROPÓLEO  
RECOLECTADA EN EL ESTADO DE CHIAPAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LORENA ISELA GARCÍA BOHÓRQUEZ**



México D. F.

2014



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**

<b>Presidente:</b>	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
<b>Vocal:</b>	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
<b>Secretario:</b>	Dr. José Fausto Rivero Cruz
<b>1er. suplente:</b>	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
<b>2do. suplente:</b>	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E  
Facultad de Química, UNAM

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Asesor del tema

---

Lorena Isela García Bohórquez

Sustentante

## **Agradecimientos.**

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Doctor José Fausto Rivero Cruz por su asesoría y apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado asignado por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo de Tesis y por sus valiosas observaciones y comentarios para mejorarlo.

Al personal Técnico de la USAI de la Facultad de Química; a la Q. Georgina A. Duarte Lisci por su apoyo en el registro y análisis de los espectros utilizados en este proyecto.

## **Dedicatorias.**

A Dios, por permitirme concluir esta etapa.

A mis padres por brindarme su apoyo, esfuerzo, motivación y comprensión para lograr alcanzar una meta más.

A mis amigos, con los cuales compartí esta maravillosa etapa de crecimiento, aprendizaje y diversión.

A mi novio I.Q. Hugo Cabello por caminar junto a mí a lo largo de este camino.

## Índice.

I. Lista de abreviaturas.....	i
II. Lista de cuadros .....	ii
III. Lista de figuras.....	iii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Propóleo. Definición y generalidades.....	3
2.2 Aspectos históricos.....	4
2.3. Clasificación del propóleo de acuerdo a su origen .....	5
2.4. Distribución de las zonas apícolas en México .....	6
2.4.1. Regionalización en México.....	6
2.5. Producción del propóleo.....	7
2.6. Recolección del propóleo.....	8
2.6.1. Raspado .....	8
2.6.2. Rejillas.....	9
2.6.3. Mallas .....	10
2.6.4. Placas Plásticas .....	10
2.7. Composición química .....	10
2.7.1. Triterpenos .....	17
2.8. Variantes que afectan la composición química.....	19
2.9. Propiedades farmacológicas.....	20
2.9.1. Actividad antimicrobiana.....	20
2.9.2. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante.....	21
2.9.3. Actividad antioxidante.....	21
2.9.4. Actividad anestésica.....	22
2.9.5. Otras actividades .....	22
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	23
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	25
4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	25
4.1.2. Determinación de flavonoides totales .....	25
4.1.3. Determinación de fenoles totales .....	26
4.1.4. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados .....	27
4.1.5. Análisis cromatográficos.....	28
4.1.6. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	28
4.2. Material vegetal.....	29
4.3. Estudio químico del propóleo .....	29
4.3.1. Preparación del extracto de propóleo.....	29
4.3.2. Fraccionamiento primario .....	29
4.3.3. Fraccionamiento secundario a partir de F2 .....	30
4.3.4. Fraccionamiento de F2A por medio de CCA .....	31
4.3.5. Purificación de la fracción F1 .....	32
4.3.6. Separación de la mezcla de compuestos 2A-1 .....	32
4.3.7. Separación de la mezcla compuestos 2A-2 .....	33
4.4. Reacción de metilación utilizando BF <sub>3</sub> .....	33

<b>5. Resultados y Discusión</b> .....	34
<b>6. Conclusiones</b> .....	43
<b>7. Perspectivas</b> .....	44
<b>8. Referencias bibliográficas</b> .....	45

## I. Lista de abreviaturas.

Abreviatura	Significado
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de plata
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Cloruro de Aluminio
<b>BF<sub>3</sub></b>	Trifloruro de boro
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>EEP</b>	Extracto etanólico de propóleo
<b>eV</b>	Electrovoltio
<b>G</b>	Gramo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>Mg</b>	Miligramos
<b>mg EAG/g</b>	Miligramos equivalentes de Ácido gálico sobre gramo de muestra
<b>mg EQ/g</b>	Miligramos equivalentes de Quercetina sobre gramo de muestra
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>Min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Mm</b>	Milímetros
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio anhidro
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
<b>S</b>	Segundos
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>Uma</b>	Unidades de masa atómica
<b>Mg</b>	Microgramos
<b>Mm</b>	Micrómetros

## II. Lista de cuadros.

Cuadro	Descripción
1	Principales compuestos químicos del propóleo
2	Fraccionamiento primario del extracto etanólico del propóleo por CCA
3	Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F2
4	Fraccionamiento terciario del extracto etanólico del propóleo por CCA
5	Compuestos identificados a partir de la mezcla F1-M1M
6	Compuestos identificados a partir de la mezcla 2A-1M

### III. Lista de figuras y gráficas.

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>
<b>Figura 1</b>	Distribución geográfica de diversos tipos de propóleo
<b>Figura 2</b>	Regiones apícolas en el territorio mexicano
<b>Figura 3</b>	Métodos de recolección de propóleo
<b>Figura 4</b>	Estructura química de $\alpha$ - amirina y $\beta$ -amirina
<b>Figura 5</b>	Cromatograma de la mezcla de compuestos F1-1MM.
<b>Figura 6</b>	Identificación del nonanal dimetil acetal mediante comparación del espectro de masas experimental y de referencia.
<b>Figura 7</b>	Cromatograma de la mezcla de compuestos 2A-1M.
<b>Gráfica 1</b>	Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales
<b>Gráfica 2</b>	Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales

## 1. INTRODUCCIÓN.

Milenariamente el humano ha hecho uso de los remedios tradicionales con la finalidad de tratar distintos padecimientos a los que se ve expuesto; actualmente esta actividad sigue siendo una importante alternativa en la terapéutica y con ayuda de las innovaciones científicas y tecnológicas se ha visto favorecida en el desarrollo de áreas como la fitoquímica, la farmacéutica, la farmacológica, la cosmetología y la alimenticia, en todas ellas con el objetivo principal de promover la salud y prevenir enfermedades (Banskota *et al.*, 2001).

El propóleo es un producto natural resinoso recolectado por las abejas *Apis mellifera* a partir de los exudados de las cortezas de numerosos árboles que circundan sus colmenas y que posteriormente es enriquecido con sus propias secreciones enzimáticas (Kumazawa *et al.*, 2004; Sulaiman *et al.*, 2011). Estos insectos utilizan el propóleo como material de defensa y resistencia ante agentes amenazantes tales como microorganismos patógenos y factores ambientales, así como también para la construcción y restauración de las colmenas.

El propóleo es uno de los pocos remedios naturales que ha mantenido su popularidad a lo largo de los años y ha sido tema importante de diversos estudios químicos y farmacológicos, debido a que presenta un amplio rango de actividades biológicas y terapéuticas entre las que destacan la actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral (Castaldo y Capasso, 2002; Popova *et al.*, 2009), antiséptica, antioxidante (Sforcin *et al.*, 2000; 2001; Peña, 2008; Valencia *et al.*, 2011), entre otros.

Debido a que el propóleo es una mezcla compleja de cerca de 300 compuestos químicos (Castaldo y Capasso, 2002; Pereira *et al.*, 2002). Este material difícilmente puede catalogarse dentro de criterios químicos específicos (Bankova, 2005a). Las principales variaciones que existen en el propóleo, tales como color, olor y composición, se deben básicamente al origen del material resinoso

recolectado por las abejas, es decir a las secreciones que sirven como fuente principal de los diversos propóleos, aspecto que se encuentra íntimamente relacionado con la flora del sitio de colecta, así como con los diferentes ecosistemas, con la época del año y la raza de las abejas (Bankova, 2005a).

La variabilidad en la composición química de propóleos de diferentes orígenes geográficos ha permitido establecer una correlación de los diversos compuestos con las propiedades químicas y biológicas que se le han atribuido a este producto (De Castro, 2001; Peña, 2008; Valencia *et al.*, 2011). Diversos estudios han caracterizado al propóleo con base en la flora local de recolección de este producto, Por un lado los propóleos recolectados en regiones templadas incluyen compuestos fenólicos como los principales biológicamente activos; por otra parte los propóleos recolectados en regiones tropicales tienen una mayor diversidad química, que incluye flavonoides, benzofenonas y terpenos incluso en muestras que provienen del mismo origen (Salomão *et al.*, 2004; Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Popova *et al.*, 2009).

Los propóleos mexicanos son productos ampliamente utilizados en nuestro territorio con fines terapéuticos, sin embargo no existe información suficiente acerca de su composición que permita caracterizarlo químicamente como un producto de calidad y hacer un mejor uso de este producto dentro de la terapéutica.

Con base en la gran variabilidad química presente en los propóleos y los aspectos terapéuticos que ello conlleva, se ha tratado en diferentes estudios el tema de establecer criterios que permitan estandarizar este producto natural (Peña, 2008; Valencia *et al.*, 2011) con la finalidad de obtener mayores beneficios al aprovechar al máximo sus propiedades biológica y terapéuticas en áreas específicas.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Propóleo. Definición y generalidades.**

El propóleo es el nombre genérico con el que se le conoce a la sustancia resinosa de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran a partir de la mezcla de enzimas salivales y de sustancias de carácter lipofílico recolectados a partir de las grietas de la corteza de árboles y plantas de diverso origen botánico (Salatino, 2011).

Las abejas utilizan ampliamente el propóleo en actividades que van desde la construcción, la reparación y la protección de la colmena, además de ser el agente responsable de la sanidad de la misma. Debido a que las colonias de las abejas se encuentran tan confinadas, las enfermedades suelen esparcirse muy fácilmente dentro de la colmena, sin embargo, estos insectos encuentran en el propóleo un potente antibiótico que es capaz de reducir el crecimiento microbiano que puede llegar a presentarse sobre las paredes de la colmena. Por otro lado, el propóleo funciona como un material impermeable que proporciona protección contra las corrientes de aire y ayuda a mantener una humedad constante dentro de la colmena (Seeley y Morse, 1976; Visscher, 1980).

La palabra propóleo proviene de los vocablos griegos *pro* (defensa) y *polis* (ciudad), de manera que su significado es “Defensa para la ciudad” (Martínez *et al.*, 2010; Sforcin y Bankova, 2011), lo cual hace clara alusión a las actividades que desarrollan estos insectos para la protección del panal.

Físicamente, el propóleo es una sustancia de carácter resinoso; a bajas temperaturas se presenta quebradizo y duro, mientras que con la aplicación de calor toma una consistencia maleable y viscosa (Ghisalberthi, 1979; Marcucci, 1995; Almas *et al.*, 2001). Tiene sabor amargo y posee un aroma agradable semejante al de la miel debido a los componentes volátiles que presenta; Su coloración varía de amarillo-verdoso a marrón (Burdock, 1998). Estas

características difieren de manera general con el origen y edad de las fuentes vegetales, así como con zona geográfica.

## **2.2 Aspectos históricos.**

La apicultura ha estado presente en el desarrollo del ser humano desde épocas muy remotas. En culturas como la egipcia, mesopotámica, griega, persa o romana (Houghton, 1998; Castaldo y Capasso, 2002; Sforcin y Bankova, 2011; Salatino, 2011) se han encontrado datos históricos que muestran los inicios en el manejo de la colmena y control de las abejas, con lo que se dan los inicios de la apicultura. Los antiguos egipcios utilizaron el propóleo como una sustancia para embalsamar cadáveres, actividad observada en las mismas abejas que cubren los cuerpos muertos de organismos invasores para evitar infecciones ocasionadas por la descomposición de los mismos (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Las propiedades medicinales del propóleo, fueron reconocidas por importantes personajes griegos y romanos como Aristóteles, Dioscórides Hipócrates, Plinio y Galeno en el tratamiento para la cicatrización de úlceras y heridas, así como desinfectante bucal principalmente (Castaldo y Capasso, 2002; Kuropatnicki *et al.*, 2013), estos usos perpetuaron hasta la edad media.

Las civilizaciones del nuevo mundo, también conocieron las propiedades del propóleo; La cultura Inca utilizó este producto como un importante agente antipirético, mientras que las farmacopeas británicas del siglo XVII consideraron al propóleo como una droga oficial y como uno de los ingredientes principales de diversos ungüentos con actividad terapéutica (Castaldo y Capasso, 2002; Sforcin y Bankova, 2011).

En México existen antecedentes de la actividad apícola principalmente en el sudeste del país, con más de 3000 años en la cultura Olmeca; sin embargo, es en

la cultura maya donde hay mayores datos de antecedentes y prácticas apícolas que incluso se siguen practicando al día de hoy (SAGARPA, 2009).

Con el aprovechamiento integral de los productos de la colmena, se han caracterizado las propiedades biológicas no sólo de la miel, sino también de la jalea real, el polen y los propóleos, los cuales hasta la actualidad han mantenido su importancia como alternativas terapéuticas.

### **2.3. Clasificación del propóleo de acuerdo a su origen.**

La actividad biológica presente en el propóleo depende básicamente de su composición química, la cual es altamente variable y está íntimamente relacionada con la flora del sitio de la colecta, época de recolección y la raza de las abejas (Bankova, 2005a).

La zona geográfica es uno de los factores determinantes en la composición química del propóleo y con ello en la actividad biológica. A pesar de que se ha considerado que las abejas recolectan resinas a partir de plantas de diferentes especies, se ha comprobado una tendencia marcada hacia ciertas resinas de lugares específicos. Estas observaciones han permitido establecer una regionalización del propóleo a nivel mundial, el cual se han clasificado en propóleos de climas templados, propóleos verdes o de climas tropicales, propóleos derivados de *Clusia*, propóleos derivados de *Macaranga* o de la región del pacífico y propóleos de las regiones orientales del Mediterráneo; cada uno de ellos con una composición química característica (Figura 1) (Salatino, 2011).



**Figura 1. Distribución geográfica de diversos tipos de propóleo: I. Propóleos de climas templados. II. Propóleos verdes o de climas tropicales. III. Propóleos derivados de *Clusia*. IV. Propóleos derivados de *Macaranga* o de la región del Pacífico. V. Propóleos de las regiones orientales del Mediterráneo.**

## **2.4. Distribución de las zonas apícolas en México.**

La apicultura cuenta con una amplia tradición en México y se practica desde antes de la llegada de los españoles a América, principalmente en el sureste del país, en donde se ubica la principal zona de producción de miel y sus derivados, específicamente en los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas (Organización Nacional de Apicultores). De manera particular, el estado de Jalisco se ha convertido en un fuerte productor al contribuir con más de cinco mil toneladas de producción de miel durante el año 2008, superando regiones altamente productoras como los estados antes mencionados (SAGARPA, 2009).

### **2.4.1. Regionalización en México.**

El territorio mexicano cuenta con una gran diversidad de climas, suelos, orografía y altitudes, lo cual permite disponer de una importante variedad de flora, que permite distinguir cinco zonas apícolas, en donde la producción varía de acuerdo a

la disponibilidad y al tipo de estos recursos, lo que influye en los tipos de miel, sabor, color, aroma y grados de humedad. Estas regiones apícolas son: la región del altiplano, la costa del Pacífico, la región del Golfo, la región del norte y la región de la Península de Yucatán (Organización Nacional de Apicultores) (Figura 2).



**Figura 2. Regiones apícolas en el territorio mexicano.**

## **2.5. Producción del propóleo.**

La producción del propóleo se lleva a cabo por un número reducido de abejas y es realizada durante las horas más calientes del día. Existen diversos factores que determinan la producción de propóleo, como lo son: la raza de las abejas, la conducta a propolizar, las condiciones ambientales y la flora circundante.

Cada abeja después de haber localizado con sus antenas la partícula más adecuada de resina en alguna planta, procede a desprenderla valiéndose de sus mandíbulas y del primer par de patas, auxiliándose con la secreción de sus glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxi-2-decenoico), lo cual le permite el ablandamiento de la resina. Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al

lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, permitiendo a las abejas propolizadoras tomar algunas partículas de la sustancia, comprimirlas y agregarles cera para proceder a propolizarlo (Martínez *et al.*, 2010). Para completar una carga de propóleo una abeja se lleva de 15 minutos a una hora, dependiendo principalmente de la temperatura ambiente.

## **2.6. Recolección del propóleo.**

La cantidad de propóleos que produce una colmena depende de la raza de la abeja y de su ubicación; De manera general, una colonia de abejas llega a recolectar de 150 a 200 g de propóleo en un año (Kuropatnicki *et al.*, 2013). Se ha observado que las colmenas ubicadas en zonas con vegetación abundante, contienen más propóleo que las que se encuentran situadas en zonas llanas. La propolización se presenta durante todo el año; sin embargo, se ha observado que durante el final del verano y el otoño la propolización es mayor, por lo que la recolección debe realizarse antes de invierno para optimizar la colecta de propóleo (González, 2002).

Actualmente se cuenta con diferentes técnicas de producción de propóleos, desde el simple raspado de las paredes internas de la tapa, cuadros y caja, hasta el uso de mallas plásticas y diversos tipos de rejillas de madera (Martínez *et al.*, 2010).

### **2.6.1. Raspado.**

El propóleo se recolecta raspando las superficies interiores de la colmena utilizando una espátula; No se debe comprimir con las manos, por el contrario, se debe mantener en formas de escamas y/o trozos sueltos para evitar posibles contaminaciones (Figura 3a).

### 2.6.2. Rejillas.

Consiste en una lámina plástica o metálica que contiene ranuras, las cuales son rellenas con propóleo por las abejas, lo que permite su fácil retirada y recolección. Se colocan debajo de la tapa de la colmena y una vez cubierta de propóleos, estas rejillas deben ser congeladas en la heladera para facilitar su extracción con una simple presión y desprender el propóleos de las ranuras (Figura 3b).



a)



b)



c)



d)

**Figura 3. Métodos de recolección de propóleo. a) Método de raspado; b) Método de rejillas; c) Uso de placas plásticas; d) Uso de mallas.**

### **2.6.3. Mallas.**

Consiste en un tejido de hilos plásticos o metálicos que las abejas propolinizan en superficies mayores, por lo que la cantidad recolectada es mayor. El método consiste en cortar secciones de este material del tamaño de la superficie de la colmena y colocarlos sobre la última alza, retirándolas y congelándolas. Muchos consideran que es más económica y también más duradera, pues no se quiebra por los sucesivos cambios de temperatura y manipulación, ya que las superficies son mayores, por lo que se recolecta una mayor cantidad de propóleo en cada extracción (Figura 3c).

### **2.6.4. Placas Plásticas.**

Son del tamaño y apariencia de un excluidor de reinas, pero con agujeros más pequeños para impedir el paso de una abeja. Se sitúan en la parte alta de la colmena en sustitución de la entretapa; al percibir la pérdida de calor que se produce en esa área, las abejas propolizan rápidamente los agujeros. Para cosechar el propóleo, se colocan las placas en el congelador por 3 a 4 horas y luego se flexionan para desprender el producto (Reyna, 2013).

## **2.7. Composición química.**

El propóleo es un producto natural rico en constituyentes bioactivos; Su composición química es muy compleja y depende en gran medida de la flora correspondiente a las zonas donde se recolecta, sin embargo dentro una misma zona geográfica pueden observarse claras diferencias en la composición de muestras de propóleo incluso de una colmena a otra (Kuropatnicki *et al.*, 2013); En una muestra típica de propóleo llegan a identificarse entre 80 y 100 compuestos químicos diferentes (Marcucci *et al.*, 2001).

Los estudios enfocados en la composición química del propóleo comenzaron al inicio del siglo XX y hasta ahora, más de 300 compuestos han sido identificados en muestras de propóleo crudo de diferentes orígenes (Pereira *et al.*, 2002; Paulino *et al.*, 2003; Salatino *et al.*, 2005; Senedese *et al.*, 2008), incluyendo polifenoles, terpenos, esteroides, azúcares y aminoácidos (Kumazawa *et al.*, 2004; Kalogeropoulos *et al.*, 2009). En 1970, los avances en los métodos analíticos cromatográficos tales como la cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina, permitieron la separación y la extracción de diversos compuestos a los que hasta entonces habían sido identificados.

De manera general, la composición básica del propóleo consta de 50% a 70% de resinas y bálsamos (formada principalmente por compuestos polifenólicos), 30 % de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de otros constituyentes como ácidos grasos, minerales, vitamina A y algunas del complejo B (Burdock, 1998; Ataç-Uzel *et al.*, 2005; Gómez- Caravaca *et al.*, 2006; Parolia *et al.*, 2010).

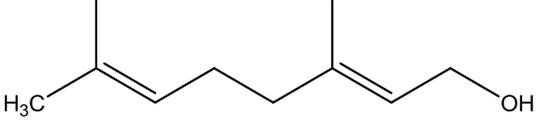
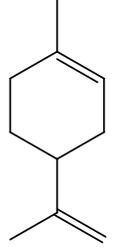
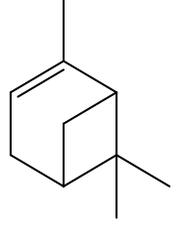
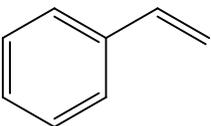
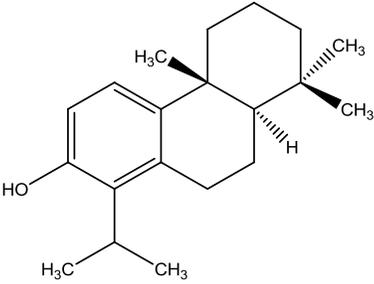
Dentro de estos componentes, las resinas son las sustancias de mayor interés, ya que son la fuente natural de los compuestos activos presentes en el propóleo, entre los que destacan los compuestos polifenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres). Estos compuestos son el grupo de productos activos más importantes presentes en el propóleo. En el Cuadro 1 se mencionan los principales compuestos que se han identificado en propóleos de diversos orígenes.

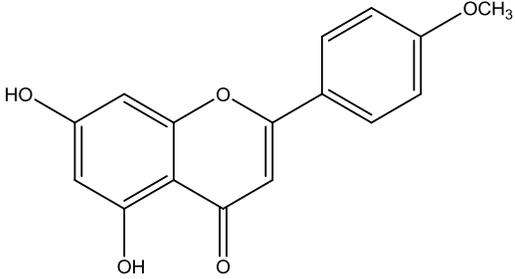
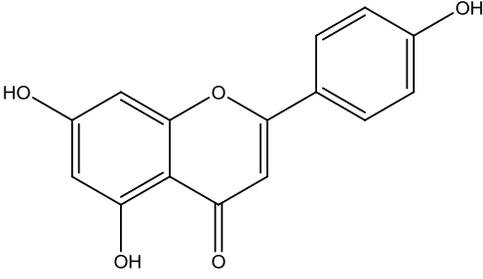
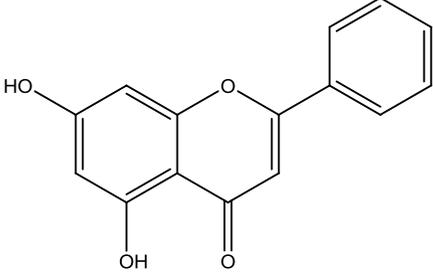
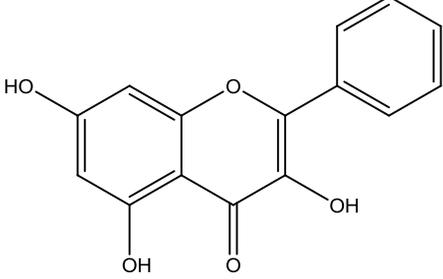
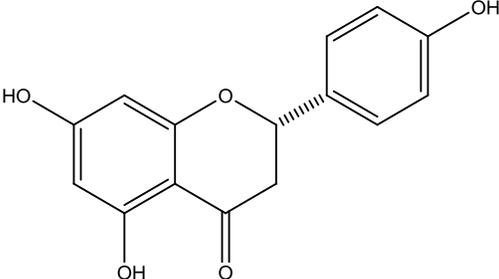
Los compuestos identificados en los propóleos se originan de tres fuentes: los recolectados a partir de exudados de plantas, sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y materiales introducidos durante el proceso de manufactura del propóleo (Marcucci, 1995).

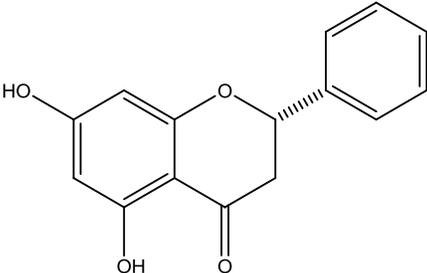
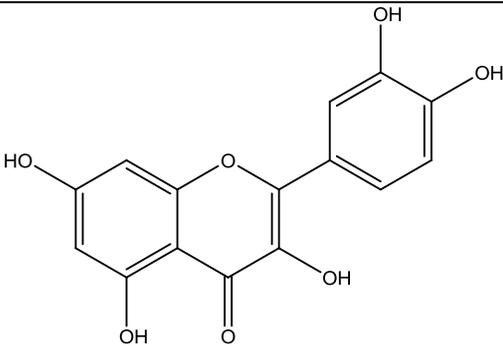
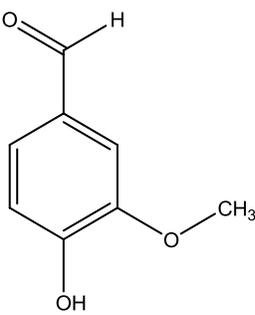
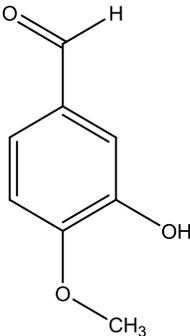
Por la diversidad de su composición, los extractos derivados del propóleo, se realizan generalmente con disolventes como etanol, acetona, tolueno, éter,

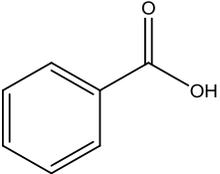
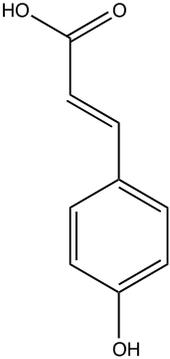
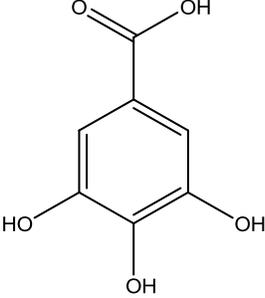
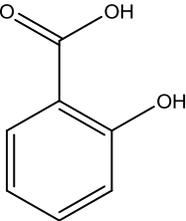
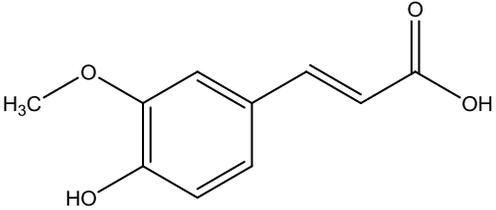
tricloroetileno y cloroformo, los cuales permiten la disolución de numerosos constituyentes presentes en el propóleo.

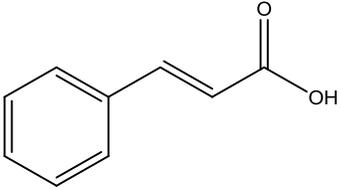
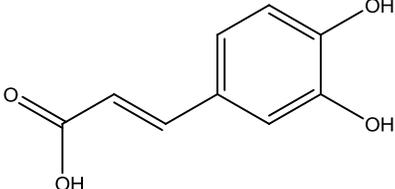
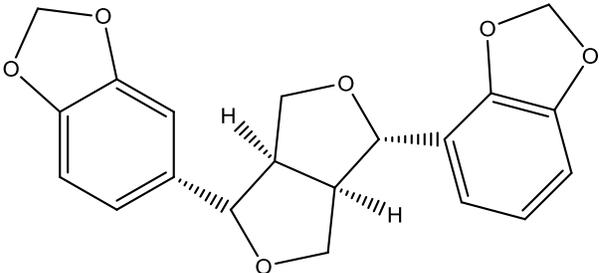
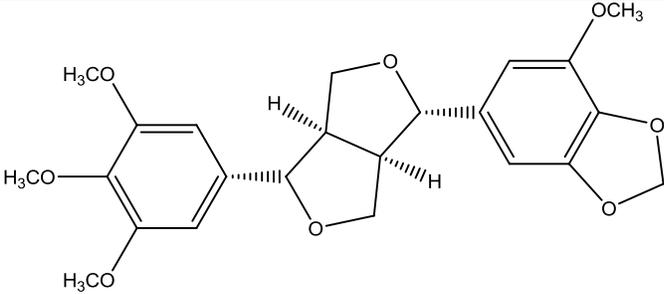
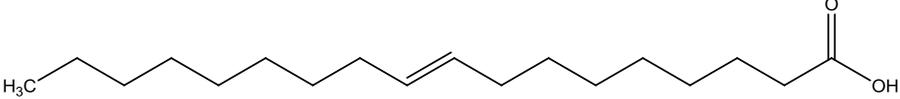
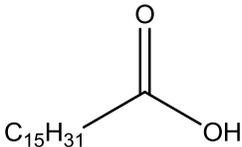
**Cuadro 1. Principales compuestos químicos del propóleo**

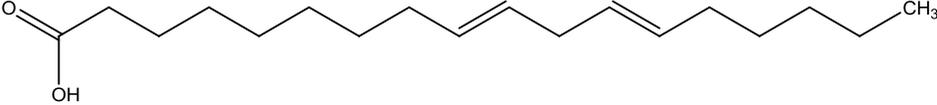
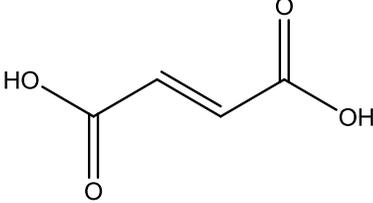
Compuesto químico	Estructura química
<b>Terpenoides</b>	
Geraniol	
Limoneno	
Pino	
Estireno	
Totarol	

Compuesto químico	Estructura química
<b>Flavonoides</b>	
Acacetina	
Apigenina	
Crisina	
Galangina	
Naringenina	

Compuesto químico	Estructura química
<b>Flavonoides</b>	
Pinocembrina	
Quercetina	
<b>Aldehídos</b>	
Vainillina	
Isovainillina	

Compuesto químico	Estructura química
<b>Compuestos aromáticos</b>	
Ácido benzoico	
Ácido cumárico	
Ácido gálico	
Ácido salicílico	
Ácido ferúlico	

Compuesto químico	Estructura química
<b>Compuestos aromáticos</b>	
Ácido cinámico	
Ácido caféico	
<b>Lignan</b>	
Sesamina	
Sesartenina	
<b>Ácidos grasos</b>	
Ácido oleico	
Ácido palmítico	

Compuesto químico	Estructura química
<b>Ácidos grasos</b>	
Ácido linoléico	
Ácido fumárico	

(Walker, 1987; Marcucci, 1995; Marcucci, 1996; Bankova *et al.*, 2000; González, 2002; Silici y Kutluca; 2005; Ataç-Uzel *et al.*, 2005; Gardana *et al.*, 2007; Popova *et al.*, 2009).

### 2.7.1. Triterpenos.

Los triterpenos constituyen un grupo importante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios derivados del escualeno o de precursores acíclicos de 30 átomos de carbono. Xu y colaboradores (2004) estimaron cerca de 200 tipos de esqueletos triterpénicos, los cuales poseen una amplia distribución en el reino vegetal. Los triterpenos más importantes y ampliamente distribuidos en la naturaleza son los pentacíclicos, que se han encontrado tanto en forma de glucósidos como en forma libre, ejemplos de estos son la  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina y sus derivados, así como los ácidos ursólico y oleanólico.

Las investigaciones realizadas en las últimas décadas, orientadas a determinar la composición química del propóleo a nivel mundial, han permitido establecer que los flavonoides no son los marcadores químicos principales de este material, pues existen otros componentes novedosos como los triterpenos. En la última década, se ha incrementado de manera exponencial el número de reportes sobre la

actividad biológica de estos y su posible uso como medicamentos. Al respecto, el primer reporte sobre la presencia de este tipo de metabolito secundario fue la identificación del triterpeno acíclico escualeno, precursor de los triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos. Posteriormente, dos equipos de investigación reportaron en 1998, la presencia de alcoholes triterpénicos y el triterpeno pentacíclico  $\beta$ -amirina en muestras de propóleos provenientes de Egipto y Brasil, respectivamente (Bracho *et al.*, 2009).

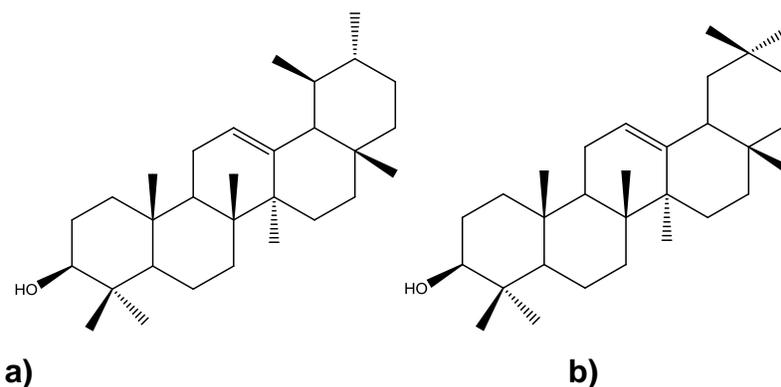
Los compuestos triterpenoides derivados de fuentes naturales, en general son conocidos por que poseen un amplio espectro de actividades farmacológicas, tales como anti-inflamatoria, se ha demostrado también que previenen diferentes tipos de neoplasias y actúan como antiinflamatorios, antibacterianos y antibióticos.

Saeed y Sabir (2001) aislaron compuestos triterpenoides de las semillas de *Caesalpinia bonducella*, estos compuestos (lupeol, acetato de lupeol,  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina) demostraron actividad antimicrobiana contra distintas cepas de bacterias Gram positivo y Gram negativo.

Holanda y colaboradores (2008) evaluaron el potencial antiinflamatorio de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina (aisladas de *Protium heptaphyllum*) en ratas con periodontitis aguda, observando retardo en el proceso inflamatorio cuando se suministraban los triterpenos, sugiriendo su eficacia para prevenir periodontitis crónica asociada a pérdida de hueso.

Johan y colaboradores (2007) evaluaron la actividad antifúngica de triterpenos pentacíclicos de la amirina (aisladas de *Protium heptaphyllum*) y de 15 derivados sintéticos contra especies del género *Candida*, advirtiendo la inhibición en la adhesión de *C. albicans* a células epiteliales humanas. En el caso particular de  $\beta$ -amirina, se ha demostrado actividad antimicrobiana moderada en contra de *E. coli* (Jain *et al.*, 2003).

El triterpeno  $\alpha$ -amirina posee un esqueleto base tipo ursano y la  $\beta$ -amirina posee un esqueleto base tipo oleano, la diferencia entre ellos es la posición del metilo en el carbono 20. En la Figura 4 se ilustra la estructura de la molécula de la amirina diferenciada en a)  $\alpha$ -amirina y b)  $\beta$ -amirina



**Figura 4. Estructura de la  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina**

## **2.8. Variantes que afectan la composición química.**

La composición química del propóleo es altamente variable, en muestras recolectadas en zonas próximas entre sí o incluso en el mismo apiario, se han encontrado sustancias completamente diferentes. Sin embargo, existen ciertos constituyentes que se encuentran en forma constante, lo cual puede utilizarse para caracterizar a este producto natural.

La variabilidad genética entre las razas de las abejas puede generar diferencias en la composición debido a su preferencia hacia un tipo de planta en específico, además de la reducción en la disponibilidad de las principales fuentes de resinas, con lo que los insectos realizan la recolección del material disponible en plantas alternativas (Salatino *et al.*, 2011). Otros factores que afectan la composición del propóleo son las zonas geográficas, la época de recolección, la cantidad de resina disponible en las fuentes vegetales e incluso materiales considerados como

contaminantes tales como el polen, la cera y las sustancias secretadas por las abejas.

## **2.9. Propiedades farmacológicas.**

En los últimos años se ha publicado un gran número de estudios en relación a las propiedades biológicas presentes en el propóleo, los cuales señalan que la combinación de distintos componentes es esencial para que se presente siempre alguna actividad biológica considerable (Kujumgiev *et al.*, 1999; Bankova, 2005b; Seidel *et al.*, 2008;).

### **2.9.1. Actividad antimicrobiana.**

La actividad antibacteriana y antifúngica han sido las más estudiadas dentro de las actividades biológicas presentes en el propóleo (Marcucci, 1995). Estudios previos han demostrado la eficacia del propóleo contra el crecimiento de bacterias Gram positivo (*Staphylococcus spp*; *Streptococcus spp.*) y contra Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Marcucci, 1996; Castaldo y Capasso, 2002; Ataç-Uzel *et al.*, 2005); además, los extractos provenientes del propóleo también han demostrado actividad contra el protozooario *Trypanosoma cruzi* así como contra *Candida albicans* y contra el virus de la inmunodeficiencia humana, del herpes y de la influenza (Castaldo y Capasso, 2002).

De acuerdo con Ríos y Recio (2005), la obtención de una concentración mínima inhibitoria (CMI) por encima de 1 mg/mL para extractos de plantas y 0.1 mg/mL para metabolitos puros, muestra que los extractos o metabolitos probados son pobres en actividad, por otro lado, la actividad de extractos y compuestos aislados en concentraciones menores a 100 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente, son considerados interesantes y prometedores en la búsqueda de nuevos agentes anti infecciosos.

### **2.9.2. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante.**

Diversos autores han considerado que la capacidad de acelerar la epitelización y la división celular en la curación de heridas, así como la prevención y detención del desarrollo de procesos inflamatorios, son de las propiedades más característica de los preparados que contienen propóleo. Investigaciones han probado que la aplicación de soluciones alcohólicas de propóleo aceleran los procesos de regeneración tisular. Por otro lado, algunos de los componentes fenólicos del propóleo como el ácido caféico y el éster del ácido feniletil caféico, así como la quercteina y la naringenina, ejercen un efecto antiinflamatorio a través de diversos mecanismos; Diversos estudios realizados con respecto a la actividad antiinflamatoria de los extractos del propóleo concluyen que este proceso se basa en la acción inhibidora hacia la enzima ciclooxigenasa, precursora del proceso inflamatorio (Mirzoeva y Calder, 1996; Araujo *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en los estudios realizados al propóleo a este respecto, han permitido considerarlo como una excelente alternativa natural en los tratamientos de inflamación crónica y aguda (Araujo *et al.*, 2012).

### **2.9.3. Actividad antioxidante.**

La riqueza en polifenoles que posee el propóleo, ha demostrado una gran capacidad antioxidante que se basa en la propiedad para neutralizar radicales libres, la cual solo es superada por la capacidad antioxidante que posee el té verde (Shroka, 2006). Algunos de los compuestos con actividad antioxidante que se han identificado en el propóleo, incluye al ácido ferúlico, quercetina y ácido caféico. De acuerdo a Nagai y colaboradores, el propóleo posee una actividad mayor que el resto de los productos apícolas en cuanto a propiedades antioxidantes se refiere. Aunado a esto, el propóleo ha sido incluido en la formulación de productos cosméticos como cremas faciales, ungüentos y lociones (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

#### **2.9.4. Actividad anestésica.**

Desde la década de 1950, se comenzaron a llevar a cabo diversos experimentos en animales, que han demostrado que ciertos extractos de propóleo actúan como anestésicos locales y debido a su ligero poder penetrante pueden ser utilizados en prácticas dentales (Prokopovich, 1957).

Paintz y Metzner (1979) en experimentos con extracto etanólico de propóleo y por separado con algunos constituyentes aislados del mismo, obtuvieron un efecto de anestesia total en cornea de conejo y de ratón, tanto con el extracto etanólico total como con los compuestos aislados pinocembrina, pinostrobina y una mezcla de ésteres del ácido caféico. Cada uno de estos compuestos fue aproximadamente tres veces más potente que el extracto etanólico.

#### **2.9.5. Otras actividades.**

Se han reportado otras actividades biológicas atribuidas al propóleo, como actividad antiulcérica, antidiabética, antitumoral, inmunomoduladora, (Sforcin y Bankova, 2011), vasorrelajante (Valenzuela, 2013), antihipertensiva (Niraldo, 2005), entre otras.

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.**

La apicultura es una actividad de creciente importancia a nivel mundial, debido a la gran cantidad de productos naturales que ofrece y a la tendencia del hombre a consumir productos cada vez menos procesados. Si bien la miel es el producto apícola más reconocido y de más antiguo uso, existen otros de gran interés como lo son la cera, el polen, la jalea real, el veneno de abeja y el propóleo. Este último, utilizado desde tiempos antiguos, ha demostrado tener un amplio espectro en cuanto a actividades farmacológicas se refiere, razón por la que en diversos países ha sido un importante objeto de estudio centrado en la identificación de sus componentes químicos.

En México el propóleo es un producto natural ampliamente utilizado como alternativa terapéutica en diversos padecimientos; sin embargo, su producción es limitada y de baja calidad a pesar del gran potencial apícola y de las herramientas tecnológicas con las que cuenta el país para generar productos de calidad superior. Considerando el potencial productivo en nuestro país y el incremento en el consumo de este producto a nivel mundial, surge la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la composición química de los propóleos mexicanos y correlacionarla con las actividades biológicas específicas que aportan los mismos.

Con base en las consideraciones anteriores, el objetivo principal del presente estudio de investigación consiste en determinar la composición química de una muestra de propóleo recolectada en el Estado de Chiapas, por el Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Para poderlo llevar a cabo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Recolectar una muestra representativa de propóleo en ECOSUR, San Cristobal de las Casas en el Estado de Chiapas.
- Realizar una investigación bibliográfica exhaustiva acerca de los aspectos generales así como de la composición química y actividades biológicas presentes en propóleos de diversos orígenes.
- Obtener por medio de maceración el extracto etanólico de la muestra de propóleo recolectada.
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto mediante cromatografía en columna.
- Aislar los compuestos mayoritarios obtenidos a partir del proceso de fraccionamiento.
- Caracterizar los compuestos aislados empleando métodos espectroscópicos y espectrométricos, tales como espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

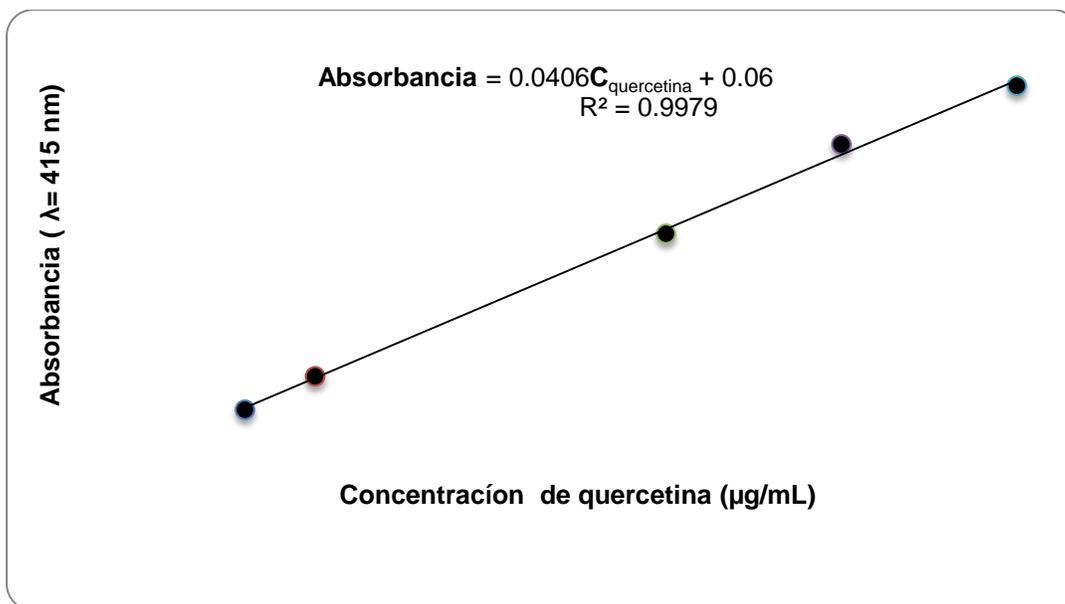
### 4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, se colocaron en todos los pozos 100  $\mu$ L de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI). Seguidamente se adicionaron en los pozos de la primera línea de A hasta G 100  $\mu$ L de la muestra (2 mg/mL), sobre la línea H se adicionaron 100  $\mu$ L del control positivo gluconato de clorhexidina (CHX al 0.12 %) y en todo el carril 12 se adicionaron 100  $\mu$ L de control negativo (medio BHI). Se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 100  $\mu$ L de línea en línea de la primera a la doceava línea. Posteriormente se adicionaron a todos los pozos 80  $\mu$ L de medio de cultivo BHI con 1.5 % de glucosa, y 10  $\mu$ L de solución  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *Streptococcus mutans*. Las determinaciones se realizaron por duplicado, se incubaron las placas durante 24 horas a 37 °C, y posteriormente se interpretaron. El mismo procedimiento se siguió para evaluar el crecimiento de las bacterias *S. sanguinis* y *S. oralis*. El valor de CMI para cada muestra analizada se definió como la mínima concentración del compuesto de prueba que limitaba la turbidez a menos de 0.05 a una absorbancia de 660 nm.

### 4.1.2. Determinación de flavonoides totales.

La determinación de flavonoides totales se realizó en placas de 96 pozos, siguiendo la metodología de Kumazawa y colaboradores (2004). Se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de la muestra (1 mg/mL), y 100  $\mu$ L de solución etanólica de  $AlCl_3$  al 2%. Se dejó incubar a temperatura ambiente una hora y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de ELISA BIORAD Benchmark. Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones  $\pm$  la desviación estándar correspondiente.

En la Gráfica 1, se muestra la curva de calibración de quercetina que se construyó en un intervalo de concentración entre 3-25  $\mu$ g/mL, con el fin de expresar los resultados como equivalentes de quercetina por gramo de extracto ( $mg_{quercetina}/g_{ext}$  o mg EQ/g).

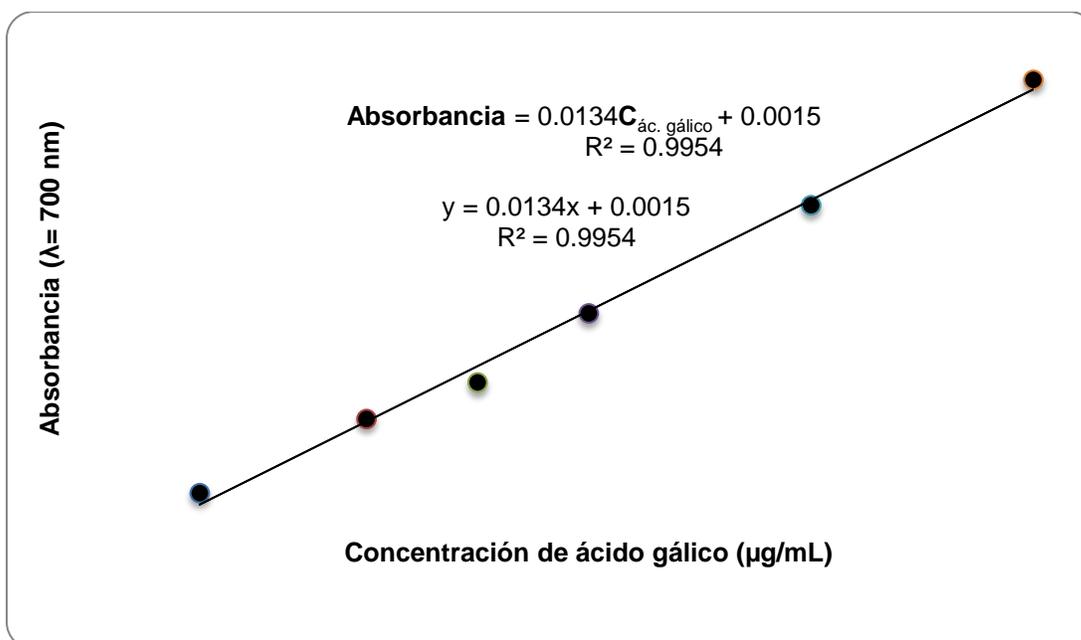


**Gráfica 1.** Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales

#### 4.1.3. Determinación de fenoles totales.

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. En placas de 96 pozos, se adicionó en cada pozo 160 µL de agua desionizada, 20 µL de solución de la muestra (1 mg/mL) y 20 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1). La mezcla resultante se agitó y se dejó reposar por 8 minutos en ausencia de luz. Posteriormente se adicionaron 10 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. Se incubó por una hora en ausencia de luz y se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de Elisa BIORAD Benchmark. Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones ± la desviación estándar correspondiente.

En la Gráfica 2, se observa la curva de calibración de ácido gálico que se construyó en un intervalo de 5-80 µg/mL, con la finalidad de expresar los resultados como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg<sub>ác.gálico</sub>/g<sub>ext</sub> o mg EAG/g).



**Gráfica 2.** Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales.

#### 4.1.4. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas se realizó en la unidad de servicio de apoyo a la investigación (USAI), ubicada en el edificio B de la facultad de Química, UNAM. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C) se generaron en un equipo marca Varian modelo VNMRS el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron utilizando CDCl<sub>3</sub>. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidos al Tetrametilsilano (TMS).

#### **4.1.5. Análisis cromatográficos.**

El fraccionamiento del extracto etanólico del propóleo se realizó mediante la técnica de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice 60 Merck ® con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM. Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones recubiertas con gel de sílice (60F<sub>254</sub> Merck ®, tamaño de partícula 0.063- 0.200 mm, 70-230 mesh 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 anisaldehído sulfúrico seguido de calentamiento hasta la visualización de marcas violetas.

#### **4.1.6. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.**

Para la realización del análisis, se empleó el espectrómetro de masas con analizador de masa de tiempo de vuelo (TOF), marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5% fenil-polimetilsiloxano) con dimensiones de 10 m x 0.18 mm x 0.18 µm. La temperatura del inyector se mantuvo a 300°C, utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó a 40°C (durante un minuto) y se incrementó 20°C/min hasta los 300°C durante 5 minutos. Las inyecciones se realizaron mediante el modo de inyección “split” (división de flujo) 1:20.

En el espectrómetro de masas se utilizó ionización electrónica a 70 eV, la temperatura de la cámara de ionización fue de 200 °C y de la línea de transferencia, 250 °C. Se programó a una velocidad espectral de 20 espectros/s. El barrido de masas fue de 33-400 uma (unidades de masa atómica).

## **4.2. Material vegetal.**

La muestra de propóleo fue recolectada y proporcionada por personal del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), San Cristóbal de las Casas, en el Estado de Chiapas en el año 2011.

## **4.3. Estudio químico del propóleo.**

### **4.3.1. Preparación del extracto de propóleo.**

El material vegetal (50 g) se sometió a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente durante 72 horas, utilizando 500 ml de etanol. El extracto obtenido se filtró al vacío y se evaporó el disolvente a presión reducida. Al finalizar este proceso se obtuvieron 16.6841 g de un extracto de consistencia cerosa color marrón.

### **4.3.2. Fraccionamiento primario.**

El extracto etanólico de propóleo se sometió a un proceso de fraccionamiento por CCA utilizando 75 g de gel de sílice como adsorbente y como fase móvil mezclas de hexano-acetona en diferentes proporciones.

Se colectaron 34 fracciones de 150 mL cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose un total de 6 fracciones combinadas. En el Cuadro 2 se resume el proceso de fraccionamiento primario del extracto etanólico del propóleo recolectado en Chiapas.

**Cuadro 2. Fraccionamiento primario del extracto etanólico del propóleo por CCA.**

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones combinadas
hexano	100	1-4	F1
hexano:acetona	95:5	5-8	F2
	93:7	9-12	
	90:10	13-16	F3
	85:15	17-20	
	80:20	21-24	F4
	75:25	25-27	F5
	70:30	28-30	
	1:1	31-32	F6
acetona	1:0	33-34	

#### **4.3.3. Fraccionamiento secundario a partir de F2.**

La fracción F2 (5.7606 g) fue sometida a un fraccionamiento en CCA utilizando 113.4 g de gel de sílice y 10% de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (11.3 mL). Como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano-AcOEt en un gradiente de concentración.

Se colectaron 76 fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose un total de 5 fracciones combinadas. En el Cuadro 3 se resume el proceso de fraccionamiento secundario que se aplicó al extracto etanólico del propóleo a partir de la fracción F2.

**Cuadro 3. Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F2.**

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones combinadas
hexano	100	1-5	F2
hexano: AcOEt	99:1	6-10	
	98:2	11-15	
	97:3	16-20	
	96:4	21-25	
	95:5	26-30	F2A
	93:7	31-35	
	91:9	36-40	
	89:11	41-45	
	85:15	46-50	
	80:20	51-52	
	75:25	53-55	F2B
	70:30	56-58	
hexano; AcOEt	65:35	59-60	
	50:50	61-63	F2C
	30:70	64-65	
20:80	66-67		
AcOEt	10:90	68-69	F2D
	100	70-72	
AcOEt:MeOH	95:5	73-76	

#### 4.3.4. Fraccionamiento de F2A por medio de CCA.

La fracción F2A (2.9438 g) fue sometida a un fraccionamiento en CCA utilizando gel de sílice. La elución de la columna se realizó de forma isocrática utilizando como fase móvil  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Durante el proceso se colectaron 16 fracciones de 100

mL cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose un total de 3 fracciones combinadas. En el Cuadro 4 se ilustra el proceso de fraccionamiento al que fue sometida la fracción F2A.

**Cuadro 4. Fraccionamiento terciario del extracto etanólico del propóleo por CCA.**

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones combinadas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1	2A-1
		2-4	2A-2
		5-8	2A-3
		9-12	
		13-16	

#### 4.3.5. Purificación de la fracción F1.

La fracción F1 (0.6948 g) se purificó mediante una recristalización utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Este proceso permitió obtener 0.5687 g de un sólido blanco de apariencia cristalina.

#### 4.3.6. Separación de la mezcla de compuestos 2A-1.

A partir de la fracción 2A-1 se obtuvo un precipitado color blanco, el cual se separó mediante sucesivas recristalizaciones utilizando MeOH y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Este proceso permitió la obtención de 0.1086 g de una mezcla color blanco.

#### **4.3.7. Separación de la mezcla compuestos 2A-2.**

A partir de la fracción 2A-2 se obtuvo un precipitado color blanco, el cual se separó mediante sucesivas recristalizaciones utilizando MeOH y acetona. Este proceso permitió la obtención de 0.0518 g de un compuesto blanco de apariencia seca.

#### **4.4. Reacción de metilación utilizando BF<sub>3</sub>.**

Se utilizó un procedimiento de derivación de ácidos grasos utilizando BF<sub>3</sub>-MeOH (Sigma-Aldrich). En un vial con tapón de rosca se adicionaron entre 5 y 15 mg de muestra y 100 µL de BF<sub>3</sub> disuelto en MeOH. El tubo de reacción se colocó en baño María a 80 °C por una hora. Este procedimiento se realizó para la Fracción F1, así como para la mezcla de compuestos 2A-2.

Cada una de las mezclas de reacción se sometió a un proceso de partición, adicionando por triplicado 12 mL de agua y 12 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se concentró a sequedad.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El material objeto de este estudio fue seleccionado con base en los usos reportados en la medicina tradicional y los resultados preliminares obtenidos de en los ensayos de actividad sobre el crecimiento de bacterias de la cavidad oral del grupo *mutans*. Por otra parte, es importante mencionar que existen escasos estudios químicos sobre los propóleos producidos en el territorio mexicano (Lotti *et al.*, 2010). Durante la realización de este estudio en primera instancia se determinó la cantidad de fenoles y flavonoides totales presentes en la muestra de propóleo recolectada en el Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) en el Estado de Chiapas. Estas determinaciones se realizaron debido a que esta clase de compuestos se considera los principales responsables de las actividades biológicas descritas para los propóleos de distintos orígenes (Burdock, 1998; Parolia *et al.*, 2010; Salatino *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos, siguiendo las metodologías descritas por Kumazawa (2004) para la determinación de flavonoides y por Singleton y Rossi (1965) para la determinación de fenoles totales, indican que la muestra presenta una concentración de 20 mg EQ/g y 60 mg EAG/g, respectivamente. Esta concentración resultó ser muy baja en comparación con otras muestras de propóleos recolectadas en diferentes localidades de México (Medina, 2011; Zarco, 2012; Rice, 2012; Valenzuela, 2013). Por otra parte, es importante mencionar que el efecto que presentó el extracto etanólico del propóleo (EEP) sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* fue similar al obtenido por otras muestras de propóleo recolectadas en otras entidades de la República Mexicana. La concentración mínima inhibitoria obtenida fue de 500, 1000 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Se considera que el extracto de origen vegetal es activo si su CMI es menor o igual a 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Rosas-Piñón *et al.*, 2012).

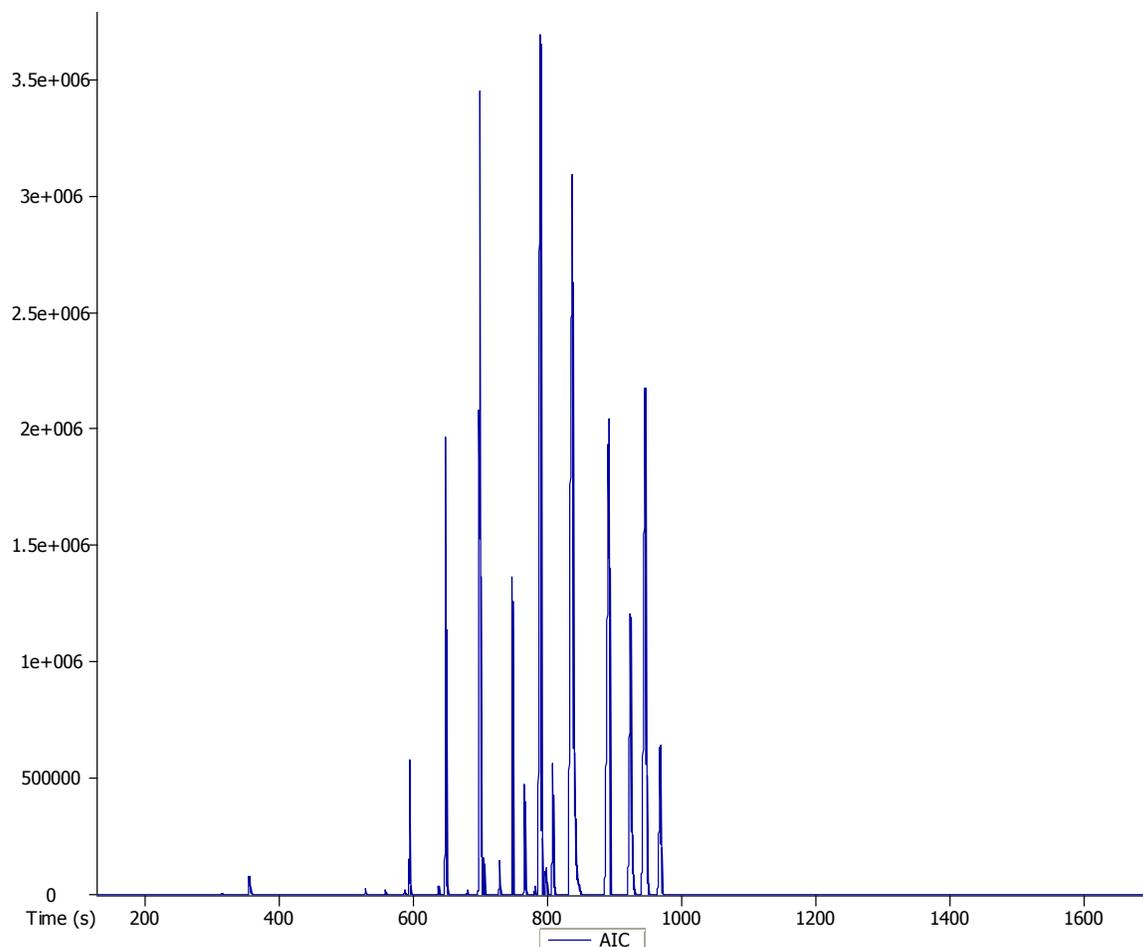
Para la realización del estudio fitoquímico una porción de 50 g de la muestra de propóleo se sometió a un proceso de extracción por maceración a temperatura

ambiente durante 72 horas, utilizando 500 ml de etanol. El extracto obtenido se filtró al vacío y se evaporó el disolvente a presión reducida.

El fraccionamiento primario del extracto etanólico, se llevó a cabo mediante un proceso de CCA, utilizando sílica gel como adsorbente y mezclas de hexano-acetona en un gradiente de concentración como eluyente; como resultado de este procedimiento se obtuvieron 34 fracciones que fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en 6 fracciones primarias.

Para continuar con el estudio se seleccionó la fracción F1 a la cual se adicionó  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , con lo que se precipitó y separó una mezcla compleja de compuestos que se denominó F1-M1. El precipitado se derivatizó utilizando  $\text{BF}_3$  disuelto en MeOH (proceso descrito en el punto 4.4) y la mezcla metilada (F1-M1M) se analizó mediante CG-EM.

El cromatograma resultante de la mezcla F1-M1M permitió detectar la presencia de 18 compuestos, los cuales se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los reportados en las bibliotecas electrónicas NIST 5.0 y Wiley 2.0. En la Figura 5 se muestra el cromatograma resultante del análisis realizado.



**Figura 5. Cromatograma de la mezcla de compuestos F1-1MM**

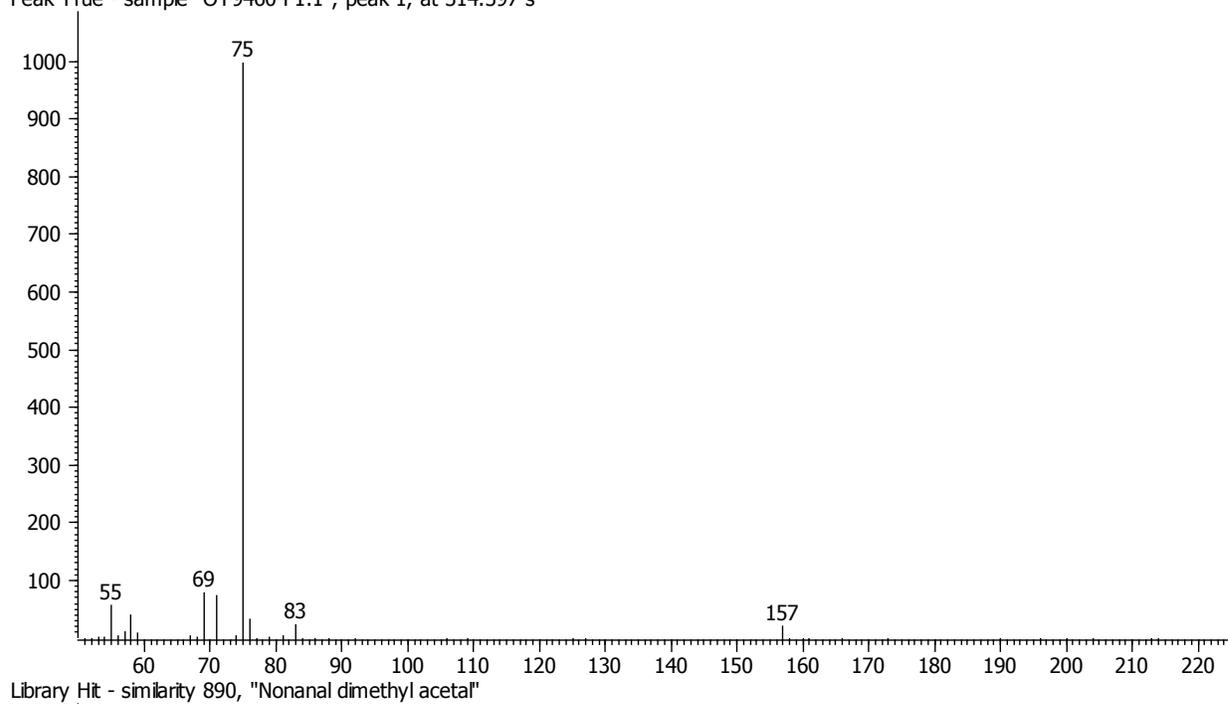
En el Cuadro 5 se resumen los tiempos de retención y las proporciones de los componentes separados y analizados por CG-EM. Los componentes mayoritarios fueron ácidos grasos (éster metílico del ácido tridecanoico; éster metílico del ácido mirístico), hidrocarburos (triacontano; pentatriacontano) y triterpenoides (ácido 3-ceto- $\beta$ -boswelico).

**Cuadro 5. Compuestos identificados a partir de la mezcla F1-M1M.**

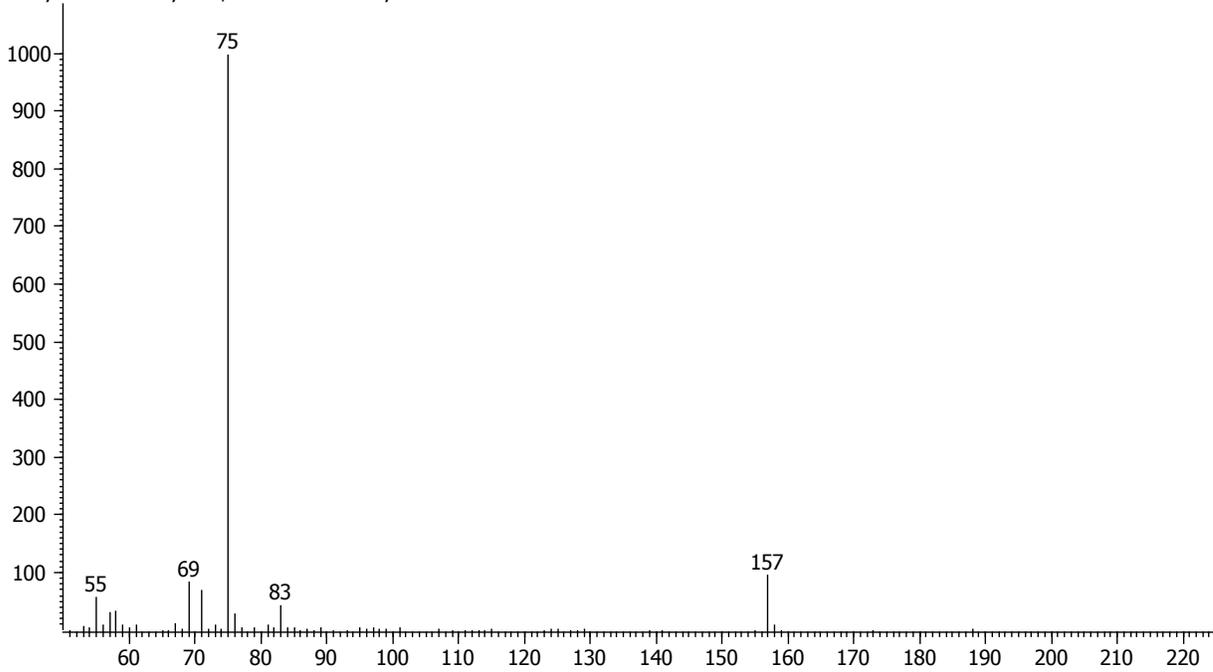
Nombre	Área %	P.M. (g/mol)	R.T. (s)	Formula
Nonanal dimetil acetal	0.026791	188	314.397	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
7,7-dimetoxi-heptanal	0.31737	174	355.397	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>
1,1-dimetoxi-dodecano	0.342041	230	528.847	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Eicosano	0.71306	282	594.747	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
Cinamato de bornilo	0.058801	284	637.747	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
7-hexil-eicosano	11.0937	366	648.847	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>
Ester metílico del ácido tridecanoico,	0.303576	228	681.197	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Ester metílico del ácido mirístico	0.25685	256	705.397	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Triacontano	10.044	422	748.047	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>
11-decil-tetracosano	1.85416	478	765.947	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>
Pentatriacontano	37.89	492	790.197	C <sub>35</sub> H <sub>72</sub>
Desconocido	0.39473	178	797.847	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O
2(3H)-Benzofuranona, 6-etenilhexahidro-6-metil-3-metilen-7-(1-metiletenil)-, [3aS-(3aà,6à,7à,7aá)]-	0.25875	232	807.697	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
17-Pentatriaconteno	12.599	490	891.497	C <sub>35</sub> H <sub>70</sub>
Desconocido	4.8958	424	923.797	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O
9,19-Cicloergost-24(28)-en-3-ol, 4,14-dimetil-, acetato, (3á,4à,5à)-	11.739	468	945.897	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>
Ácido 3-ceto-β-boswelico	3.1929	468	946.597	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
Acetato de cicloartenol	4.0192	468	968.647	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>

Como ya se mencionó, la identificación de los compuestos presentes en la mezcla, se realizó mediante la comparación de sus espectros de masas obtenidos en el análisis cromatográfico (CG-EM). En la Figura 6 se ilustra la comparación del espectro experimental y el encontrado en las bibliotecas Wiley 2.0 y NIST 5.0 para el nonanal dimetil acetal.

Peak True - sample "OT9460-F1:1", peak 1, at 314.397 s



Library Hit - similarity 890, "Nonanal dimethyl acetal"



**Figura 6. Identificación del nonanal dimetil acetal mediante comparación del espectro de masas experimental y de referencia (Wiley 2.0 y NIST 5.0).**

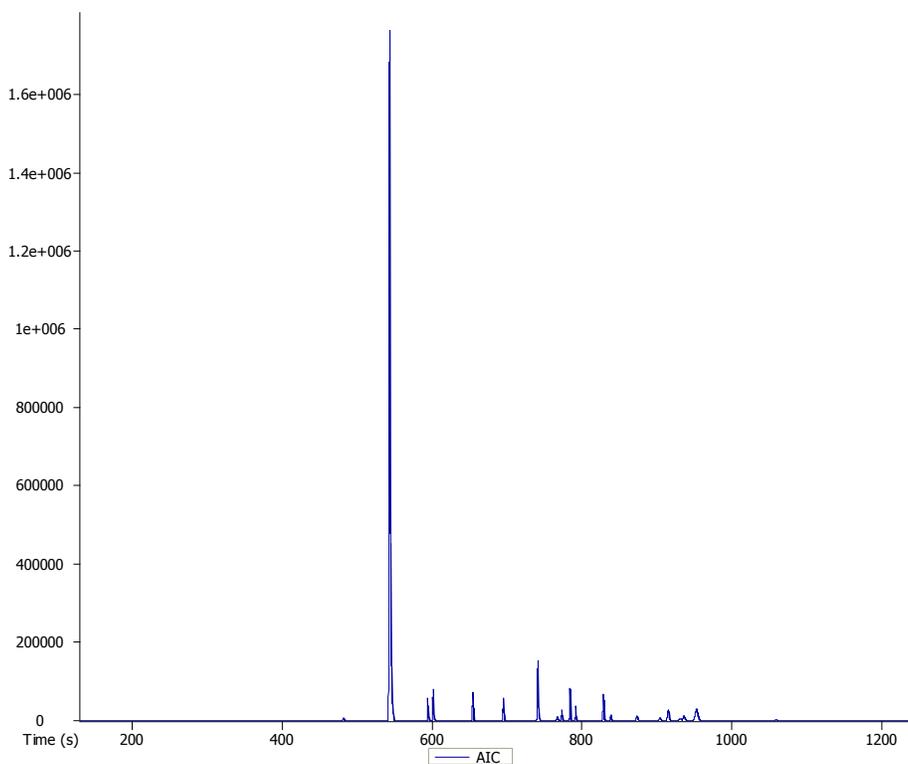
Por otra parte, la fracción F2 se recromatografió en columna abierta utilizando como adsorbente sílica gel y como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt-MeOH en un gradiente de concentración. Este proceso permitió la obtención de 76 fracciones que fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en cuatro fracciones. A partir de la fracción 2A se separó una segunda mezcla de compuestos (**2A-1**) y en forma pura el compuesto **2A-2**. Este último se identificó por comparación de sus constantes espectroscópicas, espectrométricas y físicas como la  $\alpha$ -amirina (Hernández-Vázquez, 2012).

En estudios anteriores (Hernández-Vázquez, 2012) se han identificado  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y otros triterpenoides por medio de CCF, los cuales han demostrado que este método funciona como una herramienta muy valiosa para el análisis preliminar de estos componentes, a partir de extractos comerciales de resinas y plantas.

Siguiendo una estrategia experimental semejante a la descrita para el análisis de la mezcla F1-M1 se decidió derivatizar la mezcla 2-A1. El cromatograma de gases resultante del análisis de la mezcla 2A-1M (Figura 7) permitió identificar 15 componentes. Dicha identificación se realizó de nueva cuenta por comparación de cada uno de los espectros de masas con aquellos recopilados en la base de datos Wiley 2.0 y NIS T5.0. En el Cuadro 6 se resumen los tiempos de retención y las proporciones de los componentes presentes en la mezcla 2A1-M.

**Cuadro 6. Compuestos identificados a partir de la mezcla 2A-1M.**

Nombre	Área %	P.M. (g/mol)	R.T. (s)	Formula
Ester metílico del ácido tridecanoico	5.40553	228	482.697	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Ester metílico del ácido palmítico	53.53	270	543.747	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Ester metílico del ácido 7-Hexadecenoico	2.3694	268	594.747	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
7-hexil-eicosano	5.0863	366	695.347	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>
9-Octadecenamida	0.53311	281	767.297	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO
Pentadecanal	0.62515	226	773.397	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O
11-decil-tetracosano	2.0157	478	784.097	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>
Ester metílico del ácido mirístico,	1.2622	256	791.697	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Desconocido	1.1633	268	873.897	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O
Desconocido	9.3156	468	915.547	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>
Ácido 3-ceto-β-boswelico	6.7587	468	935.897	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
Desconocido	11.935	218	953.347	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O



**Figura 7. Cromatograma de la mezcla de compuestos 2A-1M.**

A partir de los análisis realizados a las fracciones obtenidas, se pudo determinar que el extracto etanólico de propóleo, está compuesto por ácidos grasos e hidrocarburos principalmente. Los ácidos grasos son fácilmente identificables bajo la forma de sus ésteres metílicos utilizando la técnica de CG-EM. Utilizando esta técnica, los ésteres generados son más volátiles, y por lo tanto, la separación por cromatografía de gases es más eficiente.

Por otro lado, es importante mencionar que composición química del propóleo esta íntimamente relacionada con el origen vegetal de las resinas que sirven como materia prima para la producción del mismo. Las plantas silvestres tienen generalmente una distribución geográfica característica que ordena especies y géneros específicos., De la misma manera, la distribución de metabolitos secundarios ha mostrado un patrón relacionado con las zonas geográficas (Salatino, 2011; Wagh, 2013), a pesar de las diferencias existentes incluso entre una colmena y otra.

La muestra de propóleo se recolectó en el Colegio de la Frontera Sur en el Estado de Chiapas con sede en San Cristóbal de las Casas. La flora natural que existe en esta zona del estado está compuesta por vegetación de bosque de pino y encino donde predominan especies como el laurel, el manzano, el cantulan, el alcanfor, el ciprés, el cerezo, el encino, el pino, el romerillo, el roble, el sabino, el mezquite, y el nanche.

En estudios previos, el triterpeno  $\alpha$ -amirina se ha aislado de propóleos de diferentes orígenes y de fuentes botánicas como el nanche (*Byrsonima crassifolia*), así como de la resina de copal, árbol perteneciente a la familia *Burseraceae* el cual se distribuye ampliamente en el continente americano y particularmente en el sur de México, en los estados de San Luis Potosí, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Quintana Roo y Yucatán, Oaxaca y Chiapas. Además del propóleo, otras fuentes vegetales de donde se aislado  $\beta$ -amirina y que se encuentran presentes en el Estado de Chiapas son plátano mexicano (*Platanus*

mexicana), toloache (*Datura stramonium L.*), palo mulato (*Busera simaruba*), zapote (*Manilkara zapota*) y nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*), así como en algunas especies de *Karwinskia* entre otras.

Debido a las fuentes vegetales y al tipo de clima donde se ha encontrado este compuesto, no es de extrañar que se haya obtenido en la muestra estudiada, además es importante tener en cuenta la amplia distribución de  $\alpha$ -amirina en diversas plantas y demás fuentes vegetales, así como el amplio rango de actividades biológicas presentes en dicho triterpeno.

## 6. CONCLUSIONES.

El estudio fitoquímico del propóleo recolectado en ECOSUR, Chiapas, permitió el aislamiento del triterpenoide  $\alpha$ -amirina.

El análisis de los derivados metilados de las fracciones mayoritarias F1 y 2A-1 permitió la identificación de los ácidos grasos ácido mirístico, ácido tridecanoico y del triterpenoide ácido 3-ceto- $\beta$ -boswélico.

El extracto etanólico preparado a partir del propóleo tuvo una actividad moderada sobre el crecimiento de las bacterias cariogénicas *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* con CMI's de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente.

La presencia de los ácidos grasos y terpenoides puede explicar de manera parcial las propiedades antibacterianas presentadas por el extracto etanólico del propóleo. Estudios previos (Johan *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2003) han reportado la capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano de triterpenos como la  $\alpha$ -amirina.

Por último, es importante destacar que el extracto etanólico preparado a partir del propóleo presentó una pobre actividad antioxidante. Los resultados en el análisis para la determinación de flavonoides totales y fenoles totales fueron 20 mg EQ/g y 60 mg EAG/g, respectivamente.

## **7. PERSPECTIVAS.**

Identificar los compuestos minoritarios del extracto etanólico del propóleo y otros diferentes a los encontrados en el presente trabajo.

Realizar estudios biológicos complementarios al extracto etanólico de propóleo que permitan ampliar el panorama terapéutico de los propóleos de origen mexicano.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Almas, K., Dahlan A., Mahmoud, A., 2001. **Propolis as a Natural Remedy: An Update.** Saudi Dental Society, Vol. 13, No. 1, 45-49.
- Araujo, M.A., Libério S.A., Guerra, R.N., Ribeiro, M.N., Nascimento, F.R., 2001. **Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review.** Rev. Bras. Farmacogn. vol.22, n.1, 208-219.
- Ataç-Uzel, K., Ozant-Onçag., 2005. **Chemical composition and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.** Microbiology Research, 160, 189-195.
- Bankova, V., 2005a. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization.** Journal of Ethnopharmacology, 100, 114-117.
- Bankova, V., 2005b. **Recent trends and important developments in propolis research.** Bulgarian Academy of Sciences, 2(1)29–32.
- Bankova, V., Melikova, M., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C., 2000. **Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees.** Fitoterapia, 71, 693-699.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2001. **Recent progress in pharmacological research of propolis.** Phytother, 15, 561-571.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> Fecha de consulta Julio, 2013.
- Bracho, J.C., Rodríguez, C., Llanes, F., 2009. **Triterpenos pentacíclicos en propóleo.** Revista de la Sociedad Química del Perú, 75.
- Burdock, G.A., 1998. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis).** Food and Chemical Toxicology, 36, 347-363.
- Calderón, M.F., 200. **Contenido de ácidos grasos y metales pesados en huevos de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* de la colonia anidadora de Plata Escobilla, Oaxaca México.** Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México, D.F.

- Castaldo, S., Capasso, F., 2002. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** *Fitoterapia*, 73, 1-6.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A.L., Campo-Fernández, M., Márquez-Hernández, I., Rosado, A., Rastrelli, A.L., 2007. **Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS and NMR: the Brown, Red and yellow Cuban varieties of propolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7502-7509.
- Gardana, C., Sacaglianti, M., Pieta, P., 2007. **Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography tandem mass spectrometry.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 390-399.
- Ghisalberti, E.L., 1979. **Propolis-review.** *Bee World*, 60, 59-84.
- Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2006. **Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41:1220-1234.
- González, A.R., Bernal, R., 2002. **Propóleos: Un camino hacia la salud.** Ed. Pablo de la Torre. La Habana, Cuba, 7, 132.
- Hernández-Vázquez, L., palazón, J., Navarro-Ocaña, A., 2012. **The pentacyclic triterpenes-amyrins: review of sources and Biological activities.** *Phytochemicals. A global perspective of their role in nutrition and health.*  
 Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/the-pentacyclic-triterpenes-amyrins-a-review-of-sources-and-biological-activities>.
- Holanda, P., Pinto, L., Cunha, G., Chávez, M., Santos, F., Rao, V., 2008.  **$\alpha$   $\beta$ - amyryn, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induce acute pancreatitis in rats.** *Inflammopharmacology*, 16, 48-52.
- Houghton, P.J., 1998. Propolis as a medicine. **Are there scientific reasons for its reputation? in Beeswax and Propolis for Pleasure and Profit.** P. Munn, Ed. International Bee Research Association, Cardiff, UK.

- Jain, S., Jain, R., Singh, B., 2003. Antimicrobial principles of *Arnebia hispidissima*. Pharmacology Biology, 16, 48-52.
- Johann, S., Soldy, C., Lyon, J., Pizzolatti, M., Resende, M., 2007. **Antifungal activity of the amyirin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells.** Letters Application Microbiology, 45, 148-153.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V.T., 2009. **Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus.** Food Chemistry 116, 452–461.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popova, S. 1999. **Antimicrobial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** Journal of Ethnopharmacology, 64, 235-240.
- Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T., 2004. **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins.** Food Chemistry, 84, 329-339.
- Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W., 2013. **Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times.** Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- Lotti, C., Campo-Fernández, M., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Márquez-Hernández, Ingrid., Rastrelli, L., 2010. **Chemical Constituents of Red Mexican Propolis.** J. Agric. Food Chem., 58, 2209–2213.
- Marcucci, M.C. 1996. **Propiedades biológicas y terapéuticas de dos constituyentes químicos de propóleo.** Química Nova, 19, 529-536.
- Marcucci, M.C., 1995. **Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity.** Apidologie, 26, 83:99.
- Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., de Castro, S.L., Dantas, A.P., 2001. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.** Journal of Ethnopharmacology, 74, 105-112.

- Martínez, .L.R., Delgado-Herrera, M.A., Rojas, N., Casillas-Peñuelas. R. 2010. **El propóleo y las técnicas para su colecta**. SAGARPA.
- Mirzoeva, O., Calder, P., 1996. **The effect of propolis and its components on eicosanoids production during the inflammatory response**. 55 (6), 441-449.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2001. **Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis**. Food Chemistry 75:237-240.
- Niraldo, P., 2005. **Da actividade antiinflamatória do extracto padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin C**. Tesis de Doctorado, Florianópolis, Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Paintz, M., Metzner, J., 1979. **On the local anaesthetic action of propolis and some of its constituents**. Pharmazie, (34), 12, 839–841, 1979.
- Parolia, A., Thomas, M. S., Kundabala, M., Mohan, M., 2010. **Propolis and Its Potential Uses in Oral Health**. International Journal of Medicine and Medical Sciences, Vol. 2, No. 7, 210-215.
- Paulino, N., Dantas, A.P., Bankova, V., Longhi, D.T., Scremin, A., de Castro S.L., Calixto, J.B., 2003. **Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits *in vitro* contraction of airway smooth muscle**. Journal of Pharmacological Science, 93, 307-313.
- Peña, C.R., 2008. **Propolis standardization: a chemical and biological review**. Ciencia e Investigación Agraria, 35, 11-20.
- Popova, M.P., Chinou, I.B., Marekov, I.N., 2009. **Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis**. Phytochemistry, 70, 1262-1271.
- Prokopovich, N.N., 1957. **Propolis a new anaesthetic**. Vrachebnoe Delo, 10, 1077-1080.
- Reyna, W., 2013. **Efecto de la zona y la época de colecta sobre la producción de marcadores químicos en propóleos de la región del altiplano mexicano**. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D. F.
- Ríos, J., Recio, M., (2005). **Medicinal plants and antimicrobial activity**.

Journal of Ethnopharmacology, 100, 80-84.

- Rosas-Piñon, G., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M., Sánchez-Nieto, S., Rivero-Cruz, F., 2012. **Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections.** Journal of Ethnopharmacology. 141(3):860-865.
- SAGARPA.2009.[http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/APICOLAS.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/APICOLAS.pdf) Fecha de consulta, Julio 2013.
- SAGARPA.[http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Sistemas%20Productos%20Pecuarios/Attachments/24/plan\\_final.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Sistemas%20Productos%20Pecuarios/Attachments/24/plan_final.pdf). Fecha de consulta, Julio 2013.
- Salatino, A., Fernández-Silva, C., Abbud Righi, A., Salatino, L.F., 2011. **Propolis research and the chemistry of plants products.** Natural Products Report, 28, 925-936.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. **Origin and chemical variation of Brazilian propolis.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2, 33–38.
- Salomão, K., Dantas, A.P., Borba, C.M., Campos, L.C., Machado, D.G., Aquino, F.R., de Castro, S.L., 2004. **Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis.** Letters in Applied Microbiology, 38, 87-92.
- Seeley, T.D., Morse, R.A., 1976. **The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.).** Insectes Sociaux, 4, 495–512.
- Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., Fearnly, J., 2008. **Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones.** Phytotherapy Research, 22, 1256-1263.
- Senedese, J.M., Rodrigues, A.R., Furtado, M.A., Faustino, V.D., Berretta, A.A., Marchetti, J.M., Tavares, D.C., 2008. **Assessment of the Mutagenic Activity of Extracts of Brazilian Propolis in Topical Pharmaceutical Formulations on Mammalian Cells *In Vitro* and *In Vivo*.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

- Sforcin, J.M., Fernández A Jr., Lopes, C.A., Bankova, V., Funari, S.R., 2000. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** Journal of Ethnopharmacology, 73, 243-249.
- Sforcin, J.M., Fernandes Jr., A., Lopes, C.A., Funari, S.R., Bankova, V., 2001. **Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.** Journal of Venomous Animals and Toxins, 7, 139-144.
- Sforcin, J.M., Bankova, V, 2011. **Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?** Journal of Ethnopharmacology, 133, 253-260.
- Sroka, Z. 2006. **The screening analysis of antiradical activity of some plant extracts.** Postepy Hyg. Med. Dosw. (On line) 60:563-570.
- Silici, S., Kutluca, S., 2005. **Chemical composition and antibacterial activities of propolis collected by three different races of honeybees in the same region.** Journal of Ethnopharmacol, 99, 69-73.
- Singleton, V-L., Rossi J-A., 1965. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology and Viticulture, 16,144-58.
- Sutta, J., Hanko, J., Janda, J., Tkac, J., 1975. **Experimental and clinical experience of the treatment of wounds of domestic animals with a locally applied solution of propolis.** Folia Veterinaria, 18, 143–147.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J.C., Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, E., Hernández, J., Velázquez, C., 2012. **Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis.** Food Chemistry, 131, 645-651.
- Vijay D. Wagh, **Propolis, a wonder Bees product and its pharmacological potentials.** Advances in pharmacological science, 2013. Article ID 308249. 11 pages.
- Visscher, P., 1980. **Adaptations of honey bees (*Apis mellifera*) to problems of nest hygiene.** Sociobiology, 5, 249-260.

- Walker, P., Crane, E., 1987. **Constituents of propolis.** *Apidologie*, 18 (4), 327-334.
- Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, P.T., 2004. **On the origins of triterpenoid skeletal diversity.** *Phytochemistry*, 65:261-291.