



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

*“PERFIL QUÍMICO DE PROPÓLEOS MEXICANOS PARA
SU APLICACIÓN EN MEDICINA VETERINARIA”*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BETSABÉ RODRÍGUEZ PÉREZ

TUTOR:

DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO – FES Cuautitlán
DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ- FES Iztacala



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FINANCIAMIENTO

- ✓ Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM:
 - ❖ IT223811-3: Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal.
 - ❖ IT200915: Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelisis del conejo, el distemper canino y la otitis canina.
- ✓ Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación. FES Cuautitlán.
 - ❖ PIAPI C28: Uso potencial del propóleo en la salud animal.
 - ❖ PIAPI C14: Química Heterocíclica.
- ✓ Beca CONACYT con número de registro 511917.

LUGARES DE REALIZACIÓN

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 1 y 4. UNAM

- Taller de Miel. Bajo la responsabilidad del M. en A. Liborio Carrillo Miranda.
- Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.
- Laboratorio L-121 de la Sección de Química Orgánica. Bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.
- Laboratorio de Química Experimental Aplicada. Bajo la responsabilidad de la M. en E. Victoria Oralia Hernández Palacios.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM

- Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos. Bajo la responsabilidad de la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Este trabajo ha sido presentado en los siguientes eventos académicos

- **49° Congreso Mexicano de Química** realizado del 17 al 21 de septiembre de 2014 en Mérida, Yucatán. Modalidad cartel con el título *“Especificaciones y métodos de prueba para el control de calidad de propóleos mexicanos”*.
- **VIII Congreso de Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal** realizado el 16 y 17 de junio de 2014 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Modalidad cartel con el título *“Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en Medicina Veterinaria”*.
- **4° Jornada de Farmacobiología** de la Universidad de La Cañada, Oaxaca. Realizado el 2 de junio de 2014. Modalidad cartel con el título *“Propuesta del análisis químico para fundamentar la norma de calidad para propóleos mexicanos”*, con la obtención del 2° lugar.
- **III Curso de apiterapia e industrialización de los productos de la colmena.** Realizado el 29 de mayo de 2014 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ponencia con el título *“Normas oficiales de calidad para el uso del propóleo”*.
- **Reunión Ordinaria del Comité de Salud y Producción Apícola.** Realizada el 31 de julio del 2014 en las oficinas de SAGARPA, ponencia con el tema *“Propuesta para el acuerdo por el que se establecen las determinaciones para la constatación y control de calidad del propóleo”*.
- **39° Congreso Nacional de Microbiología, A.C.** Realizado del 22 al 26 de marzo del 2015 en Querétaro, Qro. Modalidad cartel con el título *“Evaluación de la actividad antibacteriana de propóleos mexicanos”*, obteniendo premio como uno de los mejores trabajos.

ÍNDICE

Índice de figuras	vi
Índice de cuadros	viii
Abreviaturas	viii
Resumen	x
Abstract	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades del propóleo	2
2.2 Composición química	4
2.2.1 Metabolitos secundarios	6
2.2.2 Flavonoides	7
2.3 Actividad biológica del propóleo	13
2.4 Aplicaciones en Medicina Veterinaria	17
2.5 Apicultura	20
2.5.1 Contexto internacional	20
2.5.2 Apicultura en México	21
2.6 Normas de calidad internacionales	24
2.7 Determinación de la calidad del propóleo	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	29
5. METODOLOGÍA	30
5.1 Diseño experimental	30
5.2 Colecta y origen de los propóleos	30
5.3 Acondicionamiento de las muestras	31
5.4 Caracterización organoléptica	31
5.5 Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP)	32
5.6 Rendimiento de los extractos	32
5.7 Especificaciones físicas y químicas	32
5.7.1 Presencia de flavonoides	32
5.7.2 Compuestos fenólicos: método de Folin-Ciocalteu	33
5.7.3 Cuantificación de flavonoides	33
5.7.4 Propiedades antioxidantes	33

5.8 Especificaciones antimicrobianas	34
5.9 Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopía de Masas (CG-EM)	34
6. RESULTADOS	35
6.1 Colecta y origen de los propóleos	35
6.2 Caracterización de los propóleos en greña	35
6.2.1 Especificaciones organolépticas	35
6.3 Caracterización de los extractos etanólicos	42
6.4 Presencia de flavonoides	43
6.5 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides	44
6.6 Propiedades antioxidantes	46
6.6.1 Actividad antioxidante	46
6.6.2 Índice de oxidación por el método visual y por espectrofotometría UV-VIS	47
6.7 Evaluación antimicrobiana	49
6.8 Cromatografía de Gases Masas acoplada a Espectroscopía de Masas (CG-EM).	51
7. DISCUSIÓN	64
8. CONCLUSIONES	73
8.1 Propuesta para el acuerdo por el qué se establecen las determinaciones para la constatación y control de calidad del propóleo.....	75
9. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	78
10. ANEXOS	79
Anexo 1. Prueba cualitativa de flavonoides	79
Anexo 2. Compuestos fenólicos: método de Folin-Ciocalteu.....	80
Anexo 3. Cuantificación de flavonoides	83
Anexo 4. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	85
Anexo 5. Índice de oxidación por el método visual	87
Anexo 6. Índice de oxidación por el método de espectrofotometría UV-VIS.....	88
Anexo 7. Microtécnica de dilución en caldo	91
Anexo 8. Características de los compuestos identificados por CG-EM.....	94
11. REFERENCIAS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Abeja recolectando resinas	3
Figura 2. Aspecto físico del propóleo.	3
Figura 3. Ruta metabólica general de los metabolitos secundarios.	7
Figura 4. Estructura química del fenol	7
Figura 5. Origen biogenético de los flavonoides.	8
Figura 6. Estructura básica de los flavonoides.	8
Figura 7. Estructuras químicas básicas de las subclases de flavonoides.	9
Figura 8. Cicatrización después del tratamiento con propóleo.	18
Figura 9. Regiones apícolas de México.	22
Figura 10. Zonas de recolección de los ocho propóleos analizados.	31
Figura 11. Propóleo en greña de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.....	37
Figura 12. Propóleo en greña de El Oro, Estado de México	38
Figura 13. Propóleo en greña de Villa del Carbón, Estado de México	38
Figura 14. Propóleo en greña de Tianguismanalco, Puebla.....	39
Figura 15. Propóleo en greña de San José Iturbide, Guanajuato.	40
Figura 16. Propóleo en greña de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán.	41
Figura 17. Propóleo en greña proveniente de Tlacotalpan, Veracruz.	41
Figura 18. Tonalidad de los ocho extractos etanólicos de propóleos.	43
Figura 19. Identificación de flavonoides con acetato de plomo al 10%.	43
Figura 20. Identificación de flavonoides con hidróxido de sodio al 20%.....	44
Figura 21. Porcentaje de fenoles totales y flavonoides en EEP.	45
Figura 22. Actividad antioxidante de la quercetina	46
Figura 23. Espectrograma de absorción UV-VIS de cada propóleo.	48
Figura 24. Comparación del índice de oxidación de los propóleos con mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides, por el método visual y espectrofotometría UV-VIS.	49
Figura 25. Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL) de los EEP sobre cepas de referencia de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i>	50
Figura 26. Concentración Mínima Bactericida y Fungicida (mg/mL) de EEP sobre cepas de referencia de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i>	50
Figura 27. Cromatograma del EEP de Cuautitlán Izcalli, Edo de México.	53
Figura 28. Cromatograma del EEP de Villa del Carbón, Estado de México.	54
Figura 29. Cromatograma del EEP de El Oro, Estado de México.	55
Figura 30. Cromatograma del EEP de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán.	56
Figura 31. Cromatograma del EEP de San José Iturbide, Guanajuato.	57
Figura 32. Cromatograma del EEP de Tianguismanalco 2012, Puebla.....	58

Figura 33. Cromatograma del EEP de Tlacotalpan, Veracruz.	59
Figura 34. Reacción de Fenton: quelación de hierro por flavonoides.	64
Figura 35. Estructura química y principales fuentes naturales de pinocembrina.	67
Figura 36. Compuestos identificados en los propóleos del Estado de México.	68
Figura 37. Compuestos identificados en el propóleo de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán.	69
Figura 38. Compuestos identificados en el propóleo de San José Iturbide, Guanajuato.	69
Figura 39. Compuestos identificados en el propóleo de Tianguismanalco 2012, Puebla.	70
Figura 40. Compuestos identificados en el propóleo de Tlacotalpan, Veracruz.	70
Figura 41. Estructura del ácido gálico	81
Figura 42. Curva de calibración de ácido gálico.	82
Figura 43. Estructura de la quercetina	83
Figura 44. Curva de calibración de quercetina.	84
Figura 45. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).	85
Figura 46. Espectro de absorción del KMnO_4 (barrido).	88
Figura 47. Comportamiento de absorbancias en función de la concentración de KMnO_4	89
Figura 48. Comparación de tiempos de reposo antes de la determinación del índice de oxidación.	89
Figura 49. Reacción de reducción de una sal de tetrazolio..	91
Figura 50. Determinación de la CMI por microtécnica de dilución en caldo	93
Figura 51. Determinación de la CMB por la microtécnica de dilución en caldo.....	93

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de propóleos: origen vegetal y principales componentes.	5
Cuadro 2. Componentes químicos identificados en los propóleos.	6
Cuadro 3. Estudios realizados de las propiedades biológicas del propóleo.	14
Cuadro 4. Principales actividades biológicas y componentes de propóleos en el mundo.	17
Cuadro 5. Aplicaciones del propóleo en Medicina Veterinaria.	19
Cuadro 6. Producción de miel en el año 2011 y 2012.	20
Cuadro 7. Exportación de miel en el 2011.	21
Cuadro 8. Volumen de producción vendida de propóleo por entidad federativa en 2007.	23
Cuadro 9. Normas de calidad internacionales para propóleos y sus extractos.	25
Cuadro 10. Especificaciones organolépticas.	26
Cuadro 11. Especificaciones físicas y químicas.	27
Cuadro 12. Especificaciones antimicrobianas.	28
Cuadro 13. Cantidad recolectada de propóleos en bruto	35
Cuadro 14. Especificaciones organolépticas de los propóleos estudiados.	36
Cuadro 15. Porcentaje de impurezas mecánicas y de rendimiento de EEP.	42
Cuadro 16. Concentración y porcentaje de fenoles totales y de flavonoides.	45
Cuadro 17. Actividad antioxidante en relación a la cantidad de flavonoides	46
Cuadro 18. Índice de oxidación por método visual y por espectrofotometría UV-VIS.	47
Cuadro 19. Efecto de los extractos de propóleos frente a cepas de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i> por la técnica de microdilución en caldo.	49
Cuadro 20. Compuestos propuestos por la base de datos de los ocho EEP.	52
Cuadro 21. Constituyentes del EEP de Cuautitlán Izcalli, Estado de México	53
Cuadro 22. Constituyentes del EEP de Villa del Carbón, Estado de México	54
Cuadro 23. Constituyentes del EEP de El Oro, Estado de México	55
Cuadro 24. Constituyentes del EEP de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán	56
Cuadro 25. Constituyentes del EEP de San José Iturbide, Guanajuato	57
Cuadro 26. Constituyentes del EEP de Tianguismanalco 2012, Puebla	58
Cuadro 27. Constituyentes del EEP de Tlacotalpan, Veracruz	59
Cuadro 28. Compuestos orgánicos identificados en los ocho EEP	60
Cuadro 29. Resultados del contenido de fenoles y flavonoides, propiedades antioxidantes, actividad antimicrobiana y CG-EM de los ocho propóleos estudiados	62
Cuadro 30. Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.	81
Cuadro 31. Curva de calibración para cuantificación de flavonoides.	84
Cuadro 32. Preparación de muestras para evaluar CA_{50}	86

ABREVIATURAS

AcONa	Acetato de sodio
AlCl ₃	Cloruro de aluminio
CAPE	Fenetil éster del ácido cafeíco
CD	Cúmulo de diferenciación (<i>Cluster of differentiation</i> en inglés)
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CONASA	Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal
COX	Ciclooxigenasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEP	Extracto etanólico de propóleo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FeCl ₃	Cloruro férrico
FeO(OH)	Oxihidróxido de hierro
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High performance liquid chromatography</i> en inglés)
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Geografía e Informática
Kg	Kilogramo
KOH	Hidróxido de potasio
Mg	Miligramo
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-kB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
NK	Natural Killer
Nm	Nanómetro
PGE ₂	Prostaglandina
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
Th	Células T cooperadoras (<i>T Helper</i> en inglés)
TR	Tiempo de retención
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento (<i>Ultra performance liquid chromatography</i> en inglés)
UV-VIS	Ultravioleta visible
v/v	Volumen/volumen
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Mg	Microgramo
µL	Microlitro

RESUMEN

El propóleo es un producto de composición compleja que las abejas *Apis mellifera* recolectan a partir de resinas vegetales, por lo que su composición varía según la fuente de procedencia. Su composición química es 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% de polen.

Se han identificado más de 300 componentes bioactivos entre ellos los flavonoides: quercetina, naringenina, pinocebrina, crisina, entre otros, que actúan de forma sinérgica con compuestos fenólicos como el ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cinámico a los que se les atribuye acción antimicrobiana, cicatrizante, antioxidante, antiinflamatoria, estimulante del sistema inmune, entre otras.

El contenido de estos **compuestos fenólicos** es el parámetro que establece **la calidad** del material y su **potencial biológico**, razón por la que países como Cuba, Rusia, Argentina, Brasil, Japón y El Salvador, principalmente, cuentan con normas oficiales para la evaluación de la calidad del propóleo como materia prima en productos terminados. **En México no se cuenta con un estándar de calidad de propóleos.**

El objetivo de este trabajo fue establecer las pruebas de control de calidad que deben cumplir los propóleos mexicanos para su uso en la salud humana y animal, y que sirvan de base al establecimiento de una Norma Oficial Mexicana.

Para la caracterización de un propóleo se realizan las siguientes evaluaciones: física (color, sabor, estructura, consistencia a temperatura ambiente e impurezas visibles), análisis químico (cuantificación e identificación de compuestos fenólicos y flavonoides, índice de oxidación y actividad antioxidante); actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos.

En este trabajo fueron determinados los caracteres organolépticos, propiedades químicas y actividad antimicrobiana de ocho muestras de propóleos recolectadas de diferentes regiones de la República Mexicana; 3 del Estado de México (FES Cuautitlán, Villa del Carbón, El Oro), 2 de Puebla (Tianguismanalco), Michoacán (Tlalpujahuá-Senguio), Guanajuato (San José Iturbide) y Veracruz (Tlacotalpan).

Los propóleos analizados presentaron colores que van desde el ámbar hasta el café, lo cual depende de la fitogeografía y la oxidación externa que sufre la resina. La proporción de compuestos fenólicos y de flavonoides fue variable, lo que se puede explicar por los factores: clima, relieve, vegetación, hidrografía, entre otros, lo que puede causar diferencia en la proporción de los componentes de la fuente vegetal primaria en cada estación del año.

Las muestras con niveles altos de fenoles y flavonoides fueron las provenientes del Estado de México y Michoacán presentando mejores propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Los propóleos de Puebla, Guanajuato y Veracruz presentaron niveles bajos de fenoles y flavonoides, como consecuencia esto provoca una disminución en sus propiedades antioxidantes y actividad antibacteriana como lo mostraron los resultados obtenidos.

Aportaciones en este proyecto de investigación:

- En las propiedades químicas se determinó el índice de oxidación por el método visual, pero debido a que es un método que requiere de la percepción visual, el resultado puede ser muy subjetivo, por lo que se **implementó un método espectrofotométrico** (espectrofotometría UV-VIS) para resultados más precisos y confiables.
- Se establecieron los criterios de calidad y de constatación que deben cumplir los propóleos y sus extractos para la comercialización, importación y su uso en el territorio nacional.
- La elaboración del Anteproyecto de norma denominado *“Propuesta para el acuerdo por el que se establecen las pruebas analíticas para la constatación y calidad del propóleo”* presentado ante el Comité de Salud y Producción Apícola de la SAGARPA y CONASA.
- La Coordinación General de Ganadería de la SAGARPA informó que gestionará la **inclusión del Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana** en el Programa de Normalización 2015, una vez que dicho programa se publique en el Diario Oficial de la Federación, por tal razón es importante seguir realizando los trámites para el cumplimiento del objetivo de este trabajo.

ABSTRACT

Propolis is a product of complex composition that *Apis mellifera* bees collect from plant resins, so its composition varies by source of origin. Its chemical composition is 55% aromatic resins and balsams, 30% wax, 10% essential oils and 5% pollen.

There are more than 300 bioactive components including flavonoids quercetin, naringenin, pinocembrin, chrysin, that act synergistically with phenolic compounds such as caffeic acid, ferulic acid, cinnamic acid to which antimicrobial actions are attributed, healing, antioxidant, anti-inflammatory, immune stimulant, among others.

The content of these phenolic compounds is the parameter that sets the quality of the material and its biological potential that is why countries like Cuba, Russia, Argentina, Brazil, Japan and El Salvador mainly have official standards for assessing the quality of propolis as a raw material into finished products. **Mexico does not have a quality standard of propolis.**

The aim of this work was to establish quality control tests to be met by Mexican propolis for use in human and animal health, and to underpin the establishment of Official Mexican Standards.

For characterization of a propolis the following evaluations conducted: physical (color, taste, structure, consistency at room temperature and visible impurities), chemical analysis (quantification and identification of flavonoids and phenolic compounds, and oxidation index antioxidant activity); microbiological analysis against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi.

In this work were determined organoleptic characteristics, chemical and microbiological activities of eight samples of propolis collected from different regions of Mexico; 3 State of Mexico (FES Cuautitlán, Villa del Carbon, El Oro), 2 of Puebla (Tianguismanalco), Michoacán (Tlalpujahua-Senguio), Guanajuato (San José Iturbide) and Veracruz (Tlacotalpan).

Propolis analyzed had colors ranging from amber to brown, which depends on the phytogeography and external oxidation suffered by resin. The proportion of phenolic compounds and flavonoids can be explained by the geographical and climatic variation which can cause some variation in the proportion of the components of the primary plant source in every season.

Samples with high levels of phenols and flavonoids were from the State of Mexico and Michoacán presenting best antioxidant and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Propolis from Puebla, Guanajuato and Veracruz had low levels of phenols and flavonoids; as a result this causes a decrease in its antioxidant and antibacterial activity as shown by the results.

Contributions in this research project:

- A chemical property in oxidation rate is determined by the visual method, but is a method that requires visual perception and the result can be very subjective and therefore a spectrophotometric method (UV-VIS spectrophotometry) for more accurate and reliable results was implemented.
- The criteria for testing and quality to be met by propolis and extracts for marketing, import and use in the country were established.
- There were established the criteria of quality and of verification that must meet the propolis and his extracts for the commercialization, import and his use in the national territory.
- Preparation of Draft Standard entitled "*Proposal for the agreement to the analytical tests for verifying the quality of propolis set*" presented to the Committee on Health and Production Beekeeping of SAGARPA and CONASA.
- The General Coordination of Livestock of SAGARPA reported that will manage the inclusion of the Draft Mexican Official Standard in the Standardization Program in the 2015, once the program is published in the Official Journal of the Federation, therefore it is important to continue doing the paperwork for meeting the objective of this work.

1.0 INTRODUCCIÓN

Las plantas y los productos de la colmena han sido durante un largo tiempo, una importante fuente medicinal. La medicina natural funciona de la misma manera que los productos farmacéuticos convencionales, o sea, por su composición química. Estos contienen muchos compuestos químicos que se dan por sí solos en la naturaleza y tienen actividad biológica.

En los últimos 150 años los químicos y farmacólogos se han dedicado a aislar y purificar los componentes "activos" de estos compuestos, en un intento por producir nuevos fármacos. Hoy en día no existe duda sobre la importancia de las plantas y de los productos de la colmena como la miel y el propóleo, y a pesar del desarrollo alcanzado por la síntesis química, estos constituyen un arsenal de sustancias biológicamente activas.

Sin embargo, el uso de los productos naturales en la terapéutica, requiere, al igual que los productos sintéticos, de profundas investigaciones que no se limitan al campo de la experimentación, sino que una vez que se comercializan es necesario seguir las investigaciones (Ruiz *et al.*, 2013).

El interés del hombre por las colmenas data de hace miles de años, si bien la miel es el producto apícola de uso más antiguo, existen otros de gran interés como la cera, el polen, la jalea real, el veneno de abeja y el propóleo. Antiguamente, el propóleo también llamado "*El oro púrpura de las abejas*", constituía un obstáculo para los apicultores dada su naturaleza pegajosa. Con el paso del tiempo es uno de los productos más valiosos que producen las abejas.

El propóleo es un material resinoso y aromático producido por las abejas a partir de exudados de diversas plantas. Su coloración varía dependiendo de su origen botánico y edad. Constituye un material de construcción, pero más importante, un arma química en contra de microorganismos patógenos, ya que al barnizar con propóleos las paredes de la colmena favorecen la desinfección.

Basado en el uso que las abejas le dan a este producto, se ha discutido que la acción antimicrobiana es común para propóleos de diversos orígenes geográficos, así se les ha atribuido propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anti-inflamatorias, antioxidantes, inmunoestimulantes, anestésicas, hepatoprotectoras y antitumorales (Bankova, 2005).

El mayor problema que existe con los propóleos, a pesar de contar con grandes avances tecnológicos que permiten conocer la composición química, es la variabilidad de la composición. Esta variabilidad es dependiente del sitio de colecta, de los diferentes ecosistemas, de la época del año y de las secreciones que sirven como fuente de los propóleos (Burdok, 1998; Bankova, 2005).

En México, los propóleos se utilizan como auxiliares en el tratamiento de enfermedades respiratorias, en productos cosméticos, en cremas y como suplemento alimenticio, sin embargo, hasta el momento son escasos los estudios químicos y biológicos que puedan evaluar la efectividad medicinal en el uso tradicional (Carranza, 2014).

Es por ello que los apicultores han encontrado recientemente dificultades para poder comercializar los productos medicinales como la jalea real y el propóleo, debido al desconocimiento de la composición química de dichos productos, por lo que no cuentan con herramientas que sustenten el uso de estos productos con fines terapéuticos.

Por lo anterior, los apicultores mexicanos se encuentran en desventaja frente a apicultores extranjeros que están incursionando en el mercado nacional, quienes la mayoría de las veces cuentan por lo menos con alguna referencia de la composición de sus productos, lo cual brinda cierta confiabilidad y ventaja (Guerrero, 2013; Carranza, 2014).

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del propóleo

Gran parte de las civilizaciones antiguas, como la inca, china, tibetana, egipcia y grecorromana empleaban los productos de las abejas en sus terapias milenarias como recursos medicinales valiosos en la cura o prevención de enfermedades (Alves *et al.*, 2011; Tovalino *et al.*, 2012).

El término propóleo etimológicamente proviene del griego *pro* –“para o en defensa de” y *polis* - “ciudad” haciendo referencia a la defensa de la colmena (Bedascarrasbure, 2006; Londoño *et al.*, 2010).

Una colonia de abejas puede recoger anualmente entre 100 y 400 gramos de propóleo dependiendo de sus necesidades, raza, condiciones climáticas y la disponibilidad de fuentes de materias primas vegetales en un perímetro de 1 a 2 kilómetros de la colmena (Figura 1) (Chil *et al.*, 2002; León, 2012).

La elaboración de este producto es a partir de secreciones de fuentes vegetales como álamos (*Populus alba*, L.), sauces (*Salix babilonica*, L.), abedules (*Betula allegheniensis*, Briton), alisos (*Alnus* sp, Miller), castaños silvestres (*Castañea sativa*, Miller), pinos (*Pinus* sp.), enebros (*Juniperus communis*, L.), algunas plantas herbáceas, caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L.) y árboles de cítricos, entre muchos otros (Bedascarrasbure, 2006; Carrillo *et al.*, 2011; Salamanca *et al.*, 2013). Las abejas posteriormente mezclan cera y las resinas de la vegetación con sus secreciones que contienen enzimas (α -amilasa, β -glucosidasa) para hidrolizar flavonoides

glicosilados en flavonoides agliconas, enriquecidas con secreciones de la digestión láctica de los gránulos de polen y otros elementos que mejorarán su consistencia, disponiéndolas para su uso (Lozina *et al.*, 2010; Salamanca *et al.*, 2013).



Figura 1. Abeja recolectando resinas.

Las abejas que vivían en estado salvaje en los bosques, en troncos de árboles y en cuevas, aprendieron a utilizar el propóleo para protegerse de sus enemigos, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena, consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y para evitar vibraciones en la colmena (González, 1997; Chaillou *et al.*, 2004; Manrique *et al.*, 2006).

El propóleo es una sustancia de composición compleja, resinosa, balsámica y gomosa. A temperaturas elevadas es suave, flexible y muy pegajosa, pero cuando se enfría se vuelve dura y quebradiza. Su color varía de verde a marrón rojizo dependiendo de su fuente botánica. Con sabor acre o amargo, olor agradable y dulce (Figura 2) (González 1997; Kuropatnicki *et al.*, 2013).

En los últimos 50 años se han realizado estudios científicos enfocados en determinar la composición química, propiedades curativas y el uso farmacológico de los preparados a base de propóleos. Esto ha permitido que su uso en fitomedicina se haya incrementado, por lo tanto, es una materia valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos (Guerrero, 2013).



Figura 2. Aspecto físico del propóleo.

Dichos estudios han revelado la presencia de ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales, polen, impurezas mecánicas, compuestos fenólicos, aldehídos, cetonas y ésteres alifáticos, aminoácidos

y ésteres aromáticos, flavonoides, flavonas, flavononas, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares. La proporción de cada componente es variable y depende tanto de la época de recolección como del origen vegetal de la resina, así como de la raza de las abejas que lo procesan (Chaillou *et al.*, 2004; León, 2012; Guerrero, 2013).

La diversidad de componentes que presenta le confiere gran cantidad de acciones farmacológicas, entre las que destacan acción antimicrobiana, cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatoria antiulcerosa, anestésica, citostática, inmunogenizadora, entre otras, las que le confieren significativa importancia en la terapéutica de diferentes patologías (Chil *et al.*, 2002).

2.2 Composición química

Las primeras investigaciones sobre la composición química del propóleo se iniciaron a partir del siglo XX. Los primeros intentos fueron realizados por fraccionamiento, pero Dieterich y Helfenberg indicaron la utilización de métodos de extracción utilizando alcohol, cloroformo y éter (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Los estudios sobre la composición química del propóleo continuaron hasta la década de 1960. Al principio, se pensó que el propóleo era químicamente muy complejo, pero consistente en la presencia de cera de abejas (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

En la actualidad se conoce que el propóleo es una sustancia compleja constituida por una gran variedad de compuestos químicos, que varían según la vegetación alrededor de la colmena, la especie de abeja, la época de recolección y método de recolección, es por ello que se encuentran diversos componentes químicos como se indica en el Cuadro 1 (Bankova, 2005; Sforcin, 2011).

El progreso de la investigación sobre el propóleo está estrictamente relacionada con el desarrollo de los avances en los métodos analíticos como la Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), Cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Cromatografía líquida de ultra rendimiento o Ultra performance liquid chromatography (UPLC) que han permitido la caracterización de cerca de 300 componentes a partir de exudados de las cortezas vegetales, como ácidos alifáticos de cadena larga (ácido esteárico y oleico), terpenos, aldehídos (benzaldehído y p-hidroxibenzaldehído), ácidos aromáticos y sus ésteres (ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido p-cumárico), polifenoles, quinonas, cumarinas y cetonas.

Otros compuestos como los ácidos y ésteres alifáticos de cadena corta, como el ácido butírico o acetato de isopentilo, son aportados por las ceras de las abejas, así como el glicerol, algunos alcoholes como α - y β glicerofosfato se derivan del metabolismo de la abeja.

Cuadro 1. Tipos de propóleos: origen vegetal y principales componentes.

TIPO DE PROPÓLEO	ORIGEN GEOGRÁFICO	FUENTE BOTÁNICA	CONSTITUYENTES MAYORITARIOS
Álamo	Europa, Norteamérica, Regiones no tropicales de Asia, Nueva Zelanda,	<i>Populus</i> spp, más a menudo <i>P. nigra</i>	Flavonas, flavononas, ácido cinámico y sus ésteres
Verde brasileño (alecrim)	Brasil	<i>Bacaris</i> spp predominando <i>B. dracunculifolia</i> DC.	Ácidos cumáricos prenilados, ácidos diterpénicos
Abedul	Rusia	<i>Betula verrucosa</i>	Flavonas, flavononas diferentes a las del Álamo.
Propóleos rojos	Cuba, Brasil, México	<i>Dalbergia</i> spp	Isoflavonoides
Mediterráneos	Sicilia, Grecia, Creta, Malta	<i>Cupressaceae</i>	Diterpenos
Propóleo rojo "Clusia"	Cuba, Venezuela	<i>Clussia</i> spp	Benzofenonas preniladas
Propóleo "Pacífico"	Región del Pacífico, Okinawa, Taiwán, Indonesia	<i>Macaranga tanarius</i>	C- prenil flavononas
Propóleo "Canaria"	Islas Canarias	<i>Desconocido</i>	Lignanós

Fuente: Bankova, 2005; Sforcin, 2011.

La constitución química básica es una mezcla de resinas y bálsamos, cera de abeja, aceites esenciales o volátiles, polen y materiales orgánicos y algunos minerales, como se indica en el Cuadro 2 (Bedascarrasbure, 2006; Alves *et al.*, 2011; Tovalino *et al.*, 2012).

El progreso de la investigación sobre el propóleo ha permitido identificar que los **compuestos fenólicos**, dentro de los cuales se encuentran los **flavonoides**, son el grupo más importante de compuestos bioactivos (50%) por sus propiedades medicinales en especial a los flavonoides pinocebrina, galangina y pinobanksina. En los propóleos encontramos otros compuestos que incluyen aceites esenciales o volátiles (7%) y granos de polen los cuales son fuente de elementos esenciales como magnesio, níquel, calcio, hierro y zinc (Gimeno, 2004; Bedascarrasbure, 2006; Bogdanov, 2012).

En los últimos años, el propóleo ha ganado popularidad debido a su amplio espectro de actividades biológicas y prevenir la inflamación, cardiopatías, diabetes y hasta cáncer, además de efecto hepatoprotector, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana (bacterias, hongos, virus y parásitos), anestésico, inmunomoduladora, entre otras (Banskota *et al.*, 2001).

Cuadro 2. Componentes químicos identificados en los propóleos.

CLASE DE COMPONENTE	COMPUESTOS
Bálsamos: 40-70% Soluble en etanol Origen : Álamo	Fenólicos: Fenoles, ácidos fenólicos, ésteres, flavonoides, dihidroxiflavononas, flavonas, flavonoles, chalconas, glicéridos fenólicos. Otros: Ácidos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácido benzoico y ésteres.
Ceras: 20-35% Insoluble en etanol	Componentes de cera de abejas.
Aceites esenciales: 7% Soluble en etanol Origen : Álamo	Mono y sesquiterpenos.
Otros: 5% Parcialmente soluble en etanol Origen: Abeja y polen	Minerales, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, aminas, amidas, trazas de carbohidratos, lactonas, quinonas, esteroides y vitaminas.

Fuente: Bogdanov, 2012.

2.2.1 Metabolitos secundarios

Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como **metabolitos secundarios** que pueden definirse como productos necesarios para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular (Sepúlveda *et al.*, 2003; Gutiérrez & Estévez, 2009).

Es importante destacar que también reciben la denominación de **productos naturales** y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Los precursores de la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Figura 3) se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del ácido shikímico (Ávalos & Pérez, 2009).

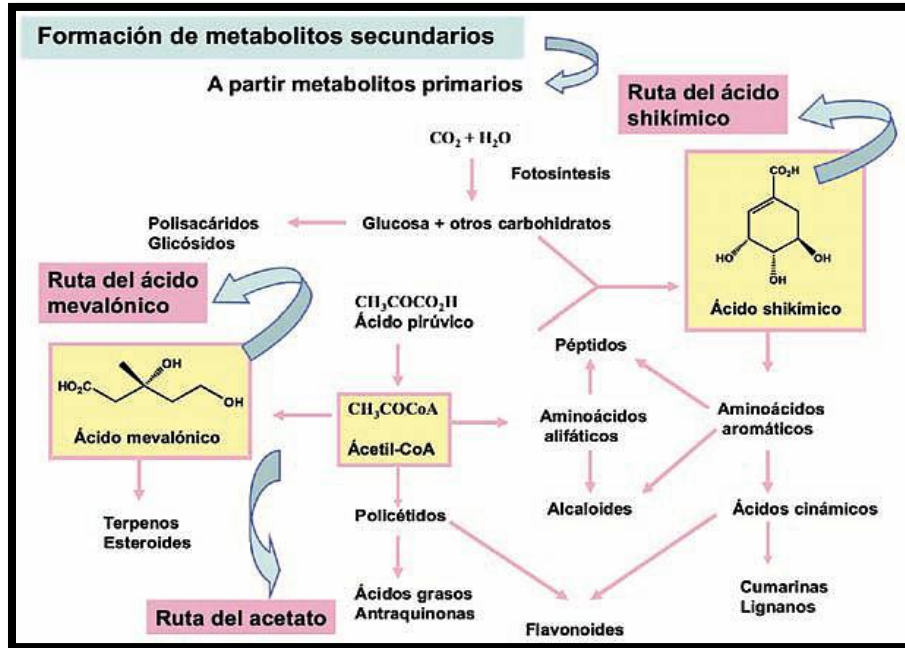


Figura 3. Ruta metabólica general de los metabolitos secundarios (Gutiérrez & Estévez, 2009).

En la actualidad, se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: (Sepúlveda *et al.*, 2003):

1. *Nitrogenados*: incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos.
2. *No nitrogenados*: se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides.

2.2.2 Flavonoides

Características

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol (Figura 4), estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides (Ávalos & Pérez, 2009).

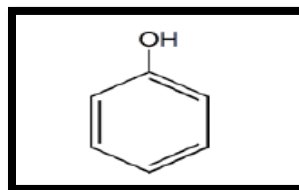


Figura 4. Estructura química del fenol.

Existen dos rutas básicas implicadas en su biosíntesis: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido mevalónico (Figura 5) (Sepúlveda *et al.*, 2003).

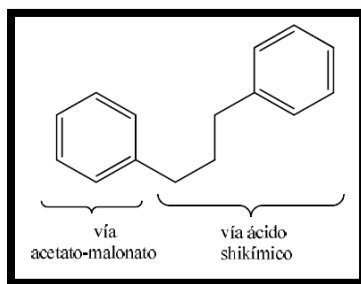


Figura 5. Origen biogénico de los flavonoides.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los **flavonoides**. Químicamente, son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en plantas vasculares. Estructuralmente (Figura 6), pueden ser considerados como fenilbenzo-pironas (fenilcromonas) compuesto de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C) (Tenorio *et al.*, 2006).

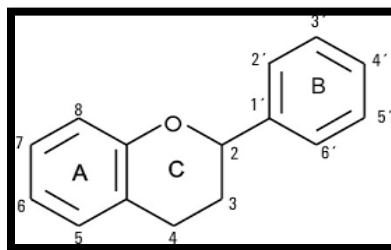


Figura 6. Estructura básica de los flavonoides.

De acuerdo a los sustituyentes presentes en estas tres estructuras cíclicas, se subdividen en función de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del anillo C, de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, y de la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B. En función de sus sustituyentes químicos los flavonoides se clasifican en: (1) flavanoles, (2) antocianidinas, (3) flavonas, flavanonas y chalconas (Figura 7) (Tenorio *et al.*, 2006).

Métodos de separación e identificación

En este sentido, los procesos de extracción para su obtención dependerán de la polaridad de los mismos. Para la caracterización de estos compuestos se utilizan técnicas basadas en la presencia de grupos fenólicos o en la presencia del núcleo fundamental de cromona.

Los grupos fenólicos de los flavonoides hacen que al añadirles álcalis (NaOH, KOH) se produzca una coloración amarilla o la intensificación del color de la disolución inicial. Igualmente, la adición de sales metálicas como FeCl₃ o AlCl₃ da lugar a una coloración verde o a una fluorescencia amarillo intensa a la luz ultravioleta, respectivamente (Martínez, 2005).

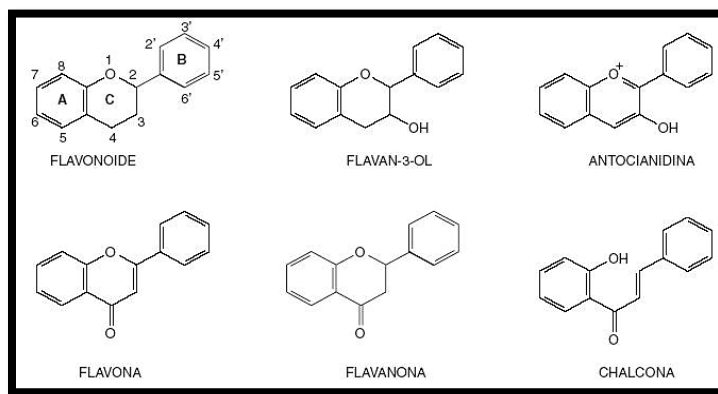


Figura 7. Estructuras químicas básicas de las subclases de flavonoides.

En general, un procedimiento analítico para la determinación de compuestos fenólicos individuales implica tres pasos básicos: extracción de la muestra, separación analítica y cuantificación. Varios métodos han sido desarrollados para su análisis: desde reacciones colorimétricas hasta métodos cromatográficos y, últimamente, la electroforesis capilar (CE).

a) Extracción de la muestra

Los flavonoides en general se extraen de muestras secas y molidas utilizando diversos solventes según la solubilidad de la muestra a analizar. Aquellos que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares son moderadamente solubles en solventes polares como etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO o agua. Por otro lado, los menos polares son más solubles en solventes como éteres y cloroformo.

Posteriormente se filtra y se repite el procedimiento varias veces para asegurar la completa recuperación de los compuestos fenólicos. Después de la disolución de la porción insoluble se separa por filtración y el disolvente se evapora a sequedad bajo presión reducida para luego ser utilizada en el análisis. Hay que destacar que, como en cualquier estudio analítico, el muestreo es muy importante, ya que este procedimiento determina el resultado final (Cartaya & Reynaldo, 2001; Gómez *et al*, 2006; Mora, 2010).

b) Reacciones colorimétricas

Existen diferentes ensayos físico-químicos cualitativos que permiten identificar de forma rápida y sencilla la presencia de determinados constituyentes en un extracto ya que éstos pueden dar reacciones coloridas, de precipitación, fluorescencia, entre otras (Mora, 2010).

• Ensayo de Shinoda

Los flavonoides con el núcleo benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas) producen desprendimiento de calor y coloración cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado, presentando color naranja para flavonas, rojo-rojo cereza para flavonoles o rojo violáceo para flavanonas (Bonkanka, 2006; Mota, 2010).

• Ensayo con zinc/ácido clorhídrico (Zn/HCl)

Al reemplazar el magnesio por el zinc en el procedimiento del ensayo de Shinoda, solamente los dihidroflavonoles producen coloraciones rojo-violetas. Las flavanonas y flavanoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles (Martínez, 2005).

• Ensayo de Pacheco

El flavonoide sólido se calienta sobre una llama con unos pocos cristales de AcONa y anhídrido acético y luego con HCl concentrado. Los dihidroflavonoles producen un color rojo característico. Las flavonas, chalconas, auronas, flavonoles y flavanonas no generan coloración (Martínez, 2005).

• Reconocimiento de antocianinas

Las antocianinas se comportan como indicadores ácido-base. A pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y moradas; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones verdes y azules (Martínez, 2005).

- Fenoles: Cloruro Férrico (FeCl₃)

Se utiliza una solución de FeCl₃ al 1%, la cual es neutralizada con NaOH hasta formar un ligero precipitado de FeO(OH), que debe ser filtrada antes de usarla. La muestra del extracto se disuelve en agua, metanol o etanol según su solubilidad. Luego se añade la disolución neutra de FeCl₃, una coloración transitoria o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol (Orozco, 2010).

c) Determinación espectrofotométrica

Estos métodos están dirigidos a la determinación de flavonoides y/o fenoles totales. Las determinaciones cuantitativas de flavonoides se llevan a cabo por dos métodos colorimétricos.

El *método de AlCl₃* que se utiliza para determinar el contenido de flavonas y flavonoles; que se basa en la formación de un complejo entre el ion de aluminio Al (III) y los grupos carbonilo e

hidroxilo de los flavonoides. La solución de ensayo, metanol y cloruro de aluminio en metanol se mezclan y se dejan reposar por 30 minutos y posteriormente se mide la absorbancia a 425 nm.

El método de Folin-Ciocalteu es útil para determinar el contenido total de fenoles totales. La solución de ensayo, agua destilada, reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio se mezclan. La muestra se deja incubar y la absorbancia se mide a 760 nm (Gómez *et al.*, 2006).

d) Espectrometría ultravioleta-visible

Los espectros ultravioleta (UV) de los flavonoides en metanol, presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos.

Las *flavonas* y *flavonoles* muestran dos bandas definidas: la banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoilo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituídos en 330-360 nm y los flavonoles en 350-385 nm. La detección de flavonoides se lleva a cabo usualmente a 250, 265, 290, 350, 370 y/o 400 nm, en caso de las antocianinas se debe considerar una longitud de onda en el intervalo 500-525 nm (Martínez, 2005; Rijke *et al.*, 2006).

e) Cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, que se hace pasar a través de una fase estacionaria inmiscible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida.

Las fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con más fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo; por el contrario, los componentes que unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Orozco, 2010).

Para la determinación de flavonoides se encuentra la cromatografía en papel (CP) y cromatografía en capa fina (CCF). Para la separación de compuestos la cromatografía de gases (CG), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CLAR-EM/EM), principalmente. La detección se logra de forma rutinaria por absorción ultravioleta que implica un detector de matriz de fotodiodos, técnicas acopladas, espectrometría de masas en

particular, se están utilizando cada vez más para trabajo de rutina (Cartaya & Reynaldo, 2001; Gómez *et al.*, 2006; Rigui *et al.*, 2013).

f) Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el *tiempo de retención* de los correspondientes picos cromatográficos.

Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (Gas Chromatography) y MS (Mass Spectrometry) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

Por lo tanto, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.

En este proceso el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (Gutiérrez & Droquet, 2002).

g) Electroforesis capilar (EC)

La electroforesis capilar (EC) es una técnica de separación utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga en un tubo hueco de diámetro muy pequeño (menos de 50 μm de diámetro), de ahí que reciba el nombre de capilar.

Es necesario aplicar una diferencia de potencial (de 100 a 500 V/cm) entre los dos extremos del capilar para que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del capilar y que se vayan

separando entre sí. El alto potencial eléctrico permite: 1) que la separación sea más sensible entre las diferentes moléculas (aumento de la resolución) y 2) que el tiempo de análisis sea más corto.

Generalmente se obtienen tiempos de análisis bastante bajos en comparación con técnicas cromatográficas, el consumo de muestra y reactivos es mucho menor, se puede emplear para separar cualquier tipo de compuesto eligiendo bien el detector; se puede acoplar a un detector UV, de fluorescencia o a un espectrómetro de masas (Castagnino, 2000).

2.3 Actividad biológica de los flavonoides

Desde el punto de vista de sus propiedades biológicas, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* ponen de manifiesto que estos compuestos tienen acciones farmacológicas. En el Cuadro 3 se muestran algunos ejemplos del uso del propóleo indicando la concentración utilizada *in vitro* e *in vivo* en ratones para tener el efecto terapéutico (Bonkanka, 2006; Sforcin & Bankova, 2011).

Se han reportado efectos antioxidantes, reducción de la formación de radicales libres, inhibición de la peroxidación lipídica (liquiritigenina), efectos antimutagénicos protección vascular, anti-aterogénica, anti-anginosa, anti-tumoral, analgésica, anti-inflamatoria, antialérgica, anti-ulcerosa y hepatoprotectora (isobutrina, hispidulina, flavanolignanos, silimarina), antiespasmódicas (apigenina, quercetina, kaenferol), diuréticas (hesperidina), antibacterianas (quercetina, rutina, crisina), antivirales *in vitro* (rutina, dihidroquercetina, 3-hidroxi y 3-metoxiflavonas no heterosídicas), antitumorales *in vitro* (tangeretina, nobiletina), entre otras (Bonkanka, 2006),

Además, algunos estudios recientes sugieren que las isoflavonas, compuestos fenólicos con estructura similar a los estrógenos, disminuyen los síntomas de la menopausia ya que se pueden unir al receptor estrogénico y mimetizar la acción de la hormona natural; así como disminuir el riesgo de desarrollo de osteoporosis (Gimeno, 2004; Martínez, 2005). En el Cuadro 4 se muestran diversas actividades biológicas de acuerdo al origen geográfico y el posible mecanismo de acción sobre diversos microorganismos y otras patologías.

Cuadro 3. Estudios realizados de las propiedades biológicas del propóleo.

Propiedad biológica	In vivo/ In vitro	Concentración de propóleo
	<i>In vivo</i>	200 mg/kg de peso
Inmunomoduladora	<i>In vitro</i>	3 – 300 µg de extracto/100 µL solvente
	<i>In vivo</i>	50 y 150 mg/kg de peso
Cáncer	<i>In vitro</i>	5 – 100 µg/100 µL de etanol
Antimicrobiana:		
• Bacterias	<i>In vitro</i>	0.4 – 14.0 g extracto/ 100 mL solvente
• Hongos		0.4 – 14.0 g extracto/ 100 mL solvente
• Virus		5 – 100 µg extracto /100 µL solvente
Diabetes	<i>In vivo</i>	100 y 300 mg/kg de peso
Úlcera	<i>In vivo</i>	50, 250 y 500 mg/kg de peso

Fuente: Sforcin & Bankova, 2011.

A continuación se mencionan brevemente las principales propiedades biológicas investigadas por diversos científicos.

Propiedad antibacteriana

Diversas investigaciones reportan que los flavonoides y el ácido cinámico, desacoplan la energía de transducción en la membrana citoplasmática inhibiendo la motilidad bacteriana y haciéndola más vulnerable al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos, provoca desorganización en el citoplasma y en la pared celular causando bacteriólisis e inhibiendo síntesis proteica (Mirzoeva *et al.*, 1997; Gutiérrez, 2011). Lo anterior se evalúa utilizando los extractos de propóleos a través del establecimiento de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) en relación con cada cepa a utilizar y mientras más cercana sea la relación CMI:CMB, más útil es el extracto para propósitos terapéuticos (Bedascarrasbure, 2006).

En México se han realizado estudios del efecto antifúngico contra cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, indicando que el ácido caféico, los flavonoides y los ésteres fenólicos son los principales responsables de la actividad biológica del producto provocando los cambios en la morfología del hongo (Quintero *et al.*, 2008; Londoño *et al.*, 2010).

Se han analizado organismos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* frente a extractos etanólicos del propóleo (EEP), encontrando una actividad antibacteriana significativamente mayor

que los extractos acuosos, y esta actividad depende de la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada (Carrillo *et al.*, 2011).

Se ha reportado actividad antiprotozoaria de EEP al 3% *in vitro* en cepas de *Trichomonas vaginalis*, utilizando animales de laboratorio infectados con *Eimeria magna* tratados con EEP y otras drogas antiprotozoarias, siendo más efectivo el efecto coccidiostático de propóleos. Preparaciones de propóleos fueron clasificados como buen coccidiostato contra *Chilomonas paramecio*, también ha sido evaluado *in vitro* sobre el crecimiento de *Giardia lamblia*. A una concentración de EEP de 11.6 mg/mL hubo un efecto de inhibición de 98% (Marcucci, 1995).

Actividad antiviral

El estudio del efecto antiviral del propóleo es importante y se ha reportado en virus de influenza aviar, Herpes, VIH, Marek, entre otros. Se realizó la evaluación *in vitro* del efecto antiviral de un propóleo de la FES Cuautitlán sobre el virus de Aujeszky mediante la infección de cultivos de la línea celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney). Se encontró que a una dosis máxima de 0.5 mg/mL de EEP, dos horas antes de realizar la infección con el virus no se inducen alteraciones morfológicas, provocando una disminución de unidades formadoras de placas (UFC) en el cultivo celular sugiriendo su utilización como tratamiento en cerdos (González, 2013).

Actividad antioxidante

Los flavonoides absorben radiación electromagnética en la zona UV-visible y de esta forma representan una protección natural para las plantas contra la radiación UV solar, al contener en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una capacidad antioxidante y presentar una barrera química de defensa contra microorganismos (hongos, bacterias y virus) (Alves *et al.*, 2011; Sforcin & Bankova, 2011).

Algunos de los antioxidantes son vitaminas (vitamina A, C y E), flavonoides (quercetina, catequina), antocianinas, carotenoides o ácidos fenólicos (ácido caféico y ácido clorogénico). Flavonoides como la catequina se encuentran en el vino tinto y manzanas; quercetina en cebollas, uvas y manzanas (Castañeda *et al.*, 2008).

Los flavonoides pueden reducir la formación de radicales libres y por lo tanto pueden tener un efecto protector sobre los lípidos séricos contra la oxidación y otros efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Isla, 2001). Obviamente existe relación entre la actividad antioxidante y los componentes químicos individuales en propóleos (Kumazawa *et al.*, 2004, Martínez, 2002).

Acción anti-inflamatoria

La actividad anti-inflamatoria observada en los propóleos parece ser debido a la presencia de flavonoides, especialmente galangina. De hecho, este flavonoide ha demostrado que inhibe la COX y la actividad lipooxigenasa, reduce la liberación de PGE₂ y la expresión de la isoforma inducible de la COX.

Además, se ha informado que el CAPE posee actividad anti-inflamatoria mediante la inhibición de la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular, la supresión de las actividades enzimáticas de la COX-1 y COX-2 e inhibición de la expresión génica para la activación de la COX-2 (Borreli, 2002).

Acción inmunomoduladora

El CAPE tuvo efectos inhibitorios sobre la transcripción de factores NF-kB y como consecuencia, inhibe la expresión de la transcripción de genes de IL-2, IL-2R (CD25), y la proliferación de células T humanas, proporcionando nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares implicados en las actividades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de este compuesto natural. En los últimos años, estudios *in vitro* e *in vivo* han proporcionado información sobre la respuesta inmune innata y adaptativa (González, 1997; Sforcin & Bankova, 2011).

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

Cuadro 4. Principales actividades biológicas y componentes de propóleos en el mundo.

Actividad	Propóleos				Microorganismo sobre el que actúan / Acción
	Europa	Brasil	Cuba	México	
Anti bacteriana	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos	Benzofenonas preniladas	CAPE	<i>Bacillus larvae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Bacteroides nodosus</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Anti fúngica y antiviral	Flavonoides	Prenilados y benzopironas	Isoflavonoides	Pinocembrina	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium</i> sp. VIH-1, virus de Aujeszky, herpes simple tipo 1 y 2.
Anti parasitaria	No evaluado	CAPE	No evaluado	CAPE	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Eimeria magna</i>
Anti inflamatoria	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres	No evaluado	No evaluado	CAPE	Supresión en la síntesis de DNA para células mononucleares y células T. CAPE: efectos inhibidores en la transcripción de factores NF-kB, en la transcripción del gen para IL-2, en la expresión del gen para IL-2R (CD 25) y la proliferación de células T. La acción moduladora en macrófagos, estimulación lítica de células NK contra células tumorales, aumento de citoquinas proinflamatorias, expresión y la producción de Th1 y Th2 (IL-4 e IL-10).
Anti cancerígena	CAPE	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos, benzofuranos	Benzofenonas preniladas	CAPE, xanthomicrol, galangina, acacentina, crisina	La acción moduladora en macrófagos, estimulación lítica de células NK contra células tumorales, aumento de citoquinas proinflamatorias, expresión y la producción de Th1 y Th2 (IL-4 e IL-10).
Anti proliferativa	Galangina, flavonoides y ácido cinámico	No evaluado	No evaluado	Pinocembrina, crisina	Expresión y la producción de Th1 y Th2 (IL-4 e IL-10).
Anti oxidante	Flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácido p-cumárico prenilados, flavonoides	No evaluado	Rutina, CAPE, galangina	Acción comparable a la Vitamina E, minimizando la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres.
Cicatrizante	No evaluado	No evaluado	Flavononas (glucósidos) metoxiflavonoides	No evaluado	Intervención de estos compuestos a nivel de mediadores de la inflamación.

CAPE: Fenetil éster del ácido caféico.

Fuente: Marcucci, 1995; Lofty, 2006; FAO, 2007; Sforcin & Bankova, 2011; Bogdanov, 2012.

Acción antitumoral

Estudios han encontrado que el CAPE presenta una fuerte actividad antitumoral. Además de la actividad citotóxica *in vitro*, también se ha informado que tiene la capacidad de disminuir la formación de tumores al bloquear completamente la activación de NF-kB por el factor de necrosis tumoral. Inhibe la 5-lipoxigenasa y 15-lipoxigenasa y bloquea por completo la producción de ERO en los neutrófilos humanos y el sistema de la xantina (Banskota, 2001).

Acción cicatrizante

Desde tiempos antiguos se ha utilizado este producto apícola para tratar heridas de diferente naturaleza observando, no solo la capacidad antibacteriana sino la actividad antiinflamatoria, que se manifiesta antes de 72 horas. Además de la estimulación de la cicatrización propiamente dicha, existiendo evidencia histológica al respecto y en la clínica, en heridas anfractuadas y quemaduras.

En la Figura 8 se muestran los resultados de una paciente que presentó infección por *S. aureus* meticilino resistente hospitalario, se le dio un mes de tratamiento con propóleo al 2% (González, 1997).



Figura 8. Cicatrización después del tratamiento propóleo.

Es importante que las empresas dedicadas a la fabricación de productos preparados a base de propóleo, conozcan las concentraciones de los componentes característicos para garantizar un producto de buena calidad y un grado razonable de actividad antibacteriana (Popova *et al.*, 2007).

2.4 Aplicaciones en Medicina Veterinaria

Kivalkina inició el estudio científico de este producto en 1947, en el Instituto Veterinario de Kazán, en la antigua Unión Soviética. Se conocía que las abejas recubrían los restos de animales muertos dentro de la colmena. Así los aislaban y evitaban su descomposición, por lo que se dedujo la existencia de algunas propiedades antimicrobianas. La aplicación de este producto en medicina

veterinaria, se ha basado en dicha propiedad en un gran número de enfermedades que afectan a los animales (Giral *et al.*, 2007).

Hay cada vez más investigadores realizando experimentos basados en propóleo (Cuadro 5) tanto en animales como en personas una alternativa natural. Hasta la fecha, los microorganismos han mostrado sensibilidad al propóleo. Por otra parte, su administración beneficia al organismo aumentando su inmunidad.

Cuadro 5. Aplicaciones del propóleo en Medicina Veterinaria.

-
- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Tratamiento de enfermedades reproductivas, fiebre aftosa, bronconeumonía, dispepsia tóxica, necrosis bacilar (Ordoñez, 2005).
• Oftalmopatías y otitis en pequeñas especies, ungüentos para queratitis (inflamación en córnea) y conjuntivitis infecciosas (Lozina <i>et al.</i>, 2006; Giral & Soto, 2007).
• Suplemento en dieta de pollos en engorda, incremento del rendimiento, la inmunidad y el potencial genético de las gallinas, oftalmopatías, otitis, mastitis en vacas, tratamiento de coccidiosis en conejos (Gutiérrez, 2011).
• Incremento de las funciones inmunológicas de pollos broiler (Ruiz, 2011). | <ul style="list-style-type: none">• Mastitis, enfermedades ginecológicas, para alimentación de cerdos débiles, profilácticos de enfermedades gastrointestinales y respiratorias de los cerdos, mejora la ganancia de peso y disminución de diarreas, profiláctico contra la fiebre paratifoidea de patos, cicatrizante, anestésico local, contra la fiebre aftosa, contra la neumonía enzoótica de los cerdos, estimulante para el crecimiento de corderos subdesarrollados, cerdos y terneros (Bogdanov, 2012).
• En perros: tratamiento de tumores venéreos transmisibles, osteosarcomas, Síndrome de Cushing, dermatofitosis, enfermedades periodontales, enfermedades metabólicas (Tovar, 2015). |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
-

2.5 Apicultura

2.5.1 Contexto internacional

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2013), reportó que en el mundo existen 139 países productores de miel de abeja, los cuales, en el año de 2008 obtuvieron más de 1.5 millones de toneladas. Los principales países productores de miel de abeja son China, Brasil, Argentina, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá, así como, los países importadores son Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Ucrania y Estados Unidos de América. Cabe señalar que el número de países consumidores de propóleo va en aumento según datos del INEGI (2011). Los datos reportados en el año 2011, indican que México ocupaba el 7° lugar en producción de miel, en el 2012 ocupó el 8° lugar, pero tuvo una mayor producción, como se indica en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Producción de miel en el 2011 y 2012.

Posición	País	Toneladas (2011)	País	Toneladas (2012)
1	China, Continental	431 000	China, Continental	436 000
2	Turquía	94 245	Turquía	88 162
3	Argentina	74 000	Argentina	75 500
4	Estados Unidos de América	67 294	Ucrania	70 134
5	Rusia	60 010	Estados Unidos de América	66 720
6	India	60 000	Rusia	64 898
7	México	57 783	India	61 000
8	Irán	47 500	México	58 602
9	Brasil	41 604	Irán	48 000
10	Ucrania	40 311	Etiopía	45 905

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2007.
<http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>

En el rubro de comercialización, en el 2011 nuestro país exportó 26 888 toneladas de miel, ocupando el 5° lugar (Cuadro 7) A pesar de los problemas sanitarios, climáticos y la baja en los precios y productos apícolas, México se sigue manteniendo como uno de los principales países productores y exportadores de miel (Martínez *et al.*, 2010).

Cuadro 7. Exportación de miel en el 2011.

Posición	Región	Toneladas	Valor (1000\$)	Valor unitario (\$/tonelada)
1	China, Continental	99 988	201 375	2014
2	Argentina	72 356	223 448	3088
3	India	28 940	76 377	2639
4	Vietnam	28 032	63 759	2275
5	México	26 888	90 359	3361
6	Brasil	22 399	70 869	3164
7	Alemania	18 946	114 352	6036
8	España	18 771	80 280	4277
9	Bélgica	16 833	54 908	3262
10	Uruguay	15 243	41 302	2710

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2007).
<http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>

2.5.2 Apicultura en México

Por sus diferentes climas y flora, que influyen sobre la composición de recursos de néctar y polen, México se divide en cinco regiones apícolas bien definidas, con diferente grado de desarrollo y variedad de tipos de mieles en cuanto a sus características de humedad, color, aroma y sabor; estas regiones son las que se indican en la Figura 9.

En la actualidad la apicultura en México es considerada como una actividad de gran importancia económica, social y ecológica, por ser una de las tres primeras fuentes captadoras de divisas del subsector ganadero (Guzmán *et al.*, 2011).

La gran fluctuación en los costos en los que se ha estado cotizando la miel de abeja, ha hecho que los apicultores le presten más atención a los otros productos de la colmena, como son el polen, la jalea real, cera, veneno y propóleo. De este último se ha incrementado la demanda en el mercado mundial, por las propiedades farmacológicas que presenta (Martínez *et al.*, 2010).



Figura 9. Regiones apícolas de México (INEGI, 2012).

La limitada extracción de propóleo en México (Cuadro 8) se ha estado realizando en forma aislada ya que se enfoca principalmente a la extracción de la miel por parte de algunos apicultores e industriales, mismos que lo han empleado en la elaboración de jarabes y tinciones principalmente, los cuales se pueden observar en anaqueles de algunas tiendas naturistas y raramente en farmacias (Martínez *et al.*, 2010).

Paralelamente el desconocimiento por parte de los apicultores de la técnica de extracción del propóleo, el valor económico y por otro lado la falta de empresas que demanden la compra, contribuyendo al lento desarrollo de su producción y utilización. Para lograr este propósito es necesario apoyar a la Industria Apícola de México realizando un trabajo científico que permita validar la calidad de los propóleos mexicanos impulsando con más conocimiento su comercialización en el mercado interno y/o externo.

Cuadro 8. Volumen de producción vendida de propóleo por entidad federativa en 2007.

NÚMERO	ENTIDAD	UNIDADES DE PRODUCCION*	%
	Estados Unidos Mexicanos	135	100
1	Michoacán	18	13.3
2	Veracruz	11	8.1
3	Colima	10	7.4
4	Puebla	10	7.4
5	Chiapas	9	6.7
6	Morelos	8	5.9
7	Zacatecas	8	5.9
8	Guerrero	7	5.2
9	Jalisco	7	5.2
10	México	7	5.2
11	Sinaloa	7	5.2
12	Chihuahua	6	4.4
13	Tlaxcala	5	3.7
14	Aguascalientes	4	3.0
	Península de Yucatán	3	2.2
15	Distrito Federal	3	2.2
16	Guanajuato	3	2.2
17	Querétaro	3	2.2
18	Yucatán	2	1.5
19	Baja California	1	0.7
20	Hidalgo	1	0.7
21	Oaxaca	1	0.7
22	Quintana Roo	1	0.7
23	San Luis Potosí	1	0.7
24	Sonora	1	0.7
25	Tamaulipas	1	0.7
26	Baja California Sur	0	0.0
27	Campeche	0	0.0
28	Coahuila	0	0.0
29	Durango	0	0.0
30	Nayarit	0	0.0
31	Nuevo León	0	0.0
32	Tabasco	0	0.0

* La unidad de producción se refiere al conjunto de terrenos, infraestructura, maquinaria y equipo, animales, y otros bienes que son utilizados durante las actividades agropecuarias y no agropecuarias por el grupo familiar que vive bajo una misma administración, y que normalmente comparte una misma vivienda.

Fuente: INEGI. Campeche. Quintana Roo. Yucatán. *Tabulados de resultados definitivos. VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007.* www.inegi.org.mx (9 de febrero de 2012).

2.6 Normas de calidad internacionales

El valor comercial del propóleo se establece con base a su calidad, la cual debe ser regulada con el establecimiento de normas.

Los estudios analíticos realizados por diversos científicos respecto a la calidad del propóleo están basados en la determinación de sus atributos sensoriales y propiedades físicas y químicas por normatividad. Diversos investigadores y apicultores se han dado a la tarea de estudiar y utilizar el propóleo para la producción de formulaciones farmacéuticas, logrando así obtener preparados especiales o tinturas, extractos, cremas, ungüentos, cápsulas, pastillas, entre otras (Martínez, *et al.*, 2010).

Los estándares oficiales utilizados para la caracterización y evaluación de la calidad de un propóleo están depositados en las regulaciones establecidas por las autoridades sanitarias propias de algunos países, la mayoría de los estándares se refieren al producto en bruto y en ocasiones a sus extractos, en el caso de Cuba realiza evaluación para extracto fluido y extracto blando (González, 1997; León, 2012). En algunos países existen normas que permiten caracterizar y evaluar la calidad del propóleo, como se muestra en el Cuadro 9.

Los estudios analíticos realizados por los países que cuentan con una normatividad respecto a la calidad del propóleo están basados en la determinación de sus atributos sensoriales y propiedades fisicoquímicas y en algunos casos, actividad antimicrobiana.

Existen parámetros como las especificaciones organolépticas (Cuadro 10), especificaciones físicas y químicas (Cuadro 11) y especificaciones antimicrobianas (Cuadro 12) que no son evaluados por todos los países (Rodríguez, 2015).

Cuadro 9. Normas de calidad internacionales para propóleos y sus extractos.

PAÍS	NORMA	PRODUCTO
Rusia	Norma RST-RSFSR-317-77 (Russian Regional Standars, 1977)	Propóleo en bruto
Hungría	Norma Húngara MsZ 08/0184-79	Extracto
Bulgaria	Norma Ramal Búlgara ON 2572483-84	Extracto
Japón	Japanese Propolis Conference (1991)	Extracto
Cuba	Norma Ramal Cubana (1994) 1) NRAG 1135 2) NRG A 1129	Propóleos. Materia prima Extractos: fluido y blando
Brasil	Reglamento del Ministerio de Agricultura: Reglamento técnico para fijar la identidad y calidad de propóleos. (1999)	Extracto
El Salvador	Norma Salvadoreña Obligatoria: Calidad de propóleo crudo NSO. 65.19.02:03	Propóleo en bruto
Argentina	Norma Argentina (2008) 1) IRAM-INTA 15935-1 2) IRAM-INTA 15935-2	Propóleo en bruto Extractos

Fuente: Rodríguez, 2015.

Cuadro 10. Especificaciones organolépticas.

Requisito	Cuba	Brasil	Argentina	El Salvador	Rusia
Color	Pardo-rojizo-oscuro				
	Verde amarillentas ^b	Amarillo, marrón, verde, marrón y otros ^a	Varias tonalidades ^{a, b}	Varias tonalidades ^a	Varias tonalidades ^a
	Varias tonalidades ^c				
Aroma	Amarillo claro, pardo, verdoso, rojizo, negro ^d				
	Resinoso Alcohólico ^{b, c}	Balsámico o resinoso ^a	Balsámico o resinoso ^{a, b}	Balsámico o resinoso ^a	Balsámico o resinoso ^a
Aspecto	Líquido transparente sin sedimentos ^b	--	--	--	Pelotas, granos o briquetas ^a
	Opaco, viscoso ^c				
Sabor	Resinoso amargo alcohólico ^b	Balsámico dulce y fuerte y picante ^a	Suave, balsámico, fuerte y picante ^{a, b}	De balsámico a fuerte y picante ^a	Amargo, algo fuerte ^a
Consistencia	Terrosa, gomosa, pegajosa ^d	Flexible y rígido ^a	Maleable o rígido ^a	Gomoso, pegajoso, duro o poroso ^a	Maleable o rígido ^a

^a Propóleo crudo, ^b Extracto fluido, ^c Extracto blando, ^d Materia prima, ^e Producto terminado.

Fuente: Rodríguez, 2015

Cuadro 11. Especificaciones físicas y químicas.

Requisito	Cuba	Brasil	Argentina	El Salvador	Japón	Rusia
Sólidos totales	3-30% ^b 70-85% ^c	--	--	< 5% ^a	> 8%	--
Impurezas mecánicas	< 5 abejas, 10% restos vegetales ^a 1% ^c	< 40% ^a	< 25% ^a	< 30% ^a	< 30% ^c	< 20% ^a
Contenido alcohólico %	70-75% ^b	--	--	--	--	--
Cera	< 10% ^{a, b}	< 25% ^a	< 35% ^a < 2% ^d	< 30% ^a	< 40% ^c	< 30% ^a
Índice de Oxidación	< 22 s ^c	< 22 s ^a	< 22 s ^a	< 22 s ^a	< 22 s ^c < 15 s ^e	< 22 s ^a
Presencia de flavonoides	(+) ^c	(+) ^a	(+) ^{a, c}	(+) ^a	(+) ^{c, e}	(+) ^a
Concentración de flavonoides	--	> 0.25% ^a	> 1% ^a < 0.25%	--	> 5% ^c	--
Espectrofotometría UV (nm)	253 ± 2 ^b	200 – 400 ^a	270 – 310 ^c	--	270–315 ^{c, e}	--
Compuestos fenólicos	--	> 0.25% ^a	> 5 % ^a	(+) ^a	> 5% ^c	> 30% ^a
Cenizas	--	< 5% ^a	< 5% ^a	--	< 5% ^c	--
Resinas	--	--	--	--	< 30% ^c	--
Formación de emulsión en agua	--	(+) ^a	(+) ^c	--	--	--
Extracto seco	--	< 11%	< 10%	--	< 8% ^{c, e}	--
Solubilidad en etanol	--	>35% ^a	>35% ^a	30-35% ^a	--	--
Humedad	--	< 8% ^a	< 10% ^a	< 8% ^a	< 10% ^c	--
Ensayo de Shinoda	--	(+) ^a	(+) ^{a, c}	--	--	--

^a Propóleo crudo, ^b Extracto fluido, ^c Extracto blando, ^d Extracto seco, ^e Producto terminado

Fuente: Rodríguez, 2015

Cuadro 12. Especificaciones antimicrobianas.

Requisito	Cuba Extracto fluido	El Salvador	Japón
Actividad antimicrobiana	Halo de inhibición <i>S. aureus</i> ATCC ^{b, c}	Bacterias mesófilas: < 10,000 UFC/g ^a	
		Coliformes fecales: 0 UFC/g ^a	
		Coliformes totales: <100 UFC/g ^a	<i>E. coli</i>
		<i>S. aureus</i> : 100 UFC/g ^a	negativo ^d
		Hongos: 1- 100 UFC/g ^a	

^a Propóleo crudo, ^b Extracto fluido, ^c Extracto blando, ^d Producto terminado (no indica UFC/g)

Fuente: Rodríguez, 2015

2.7 Determinación de la calidad del propóleo

La calidad del propóleo está directamente relacionada con los métodos de recolección, almacenamiento y conservación. En ese sentido la calidad depende del tipo de flora, características ambientales (trabajo del apicultor), almacenamiento y conservación, lugar de procedencia, región de la colmena donde se extrajo y método de recolección utilizado.

Para caracterizar una muestra de propóleo hay que determinar el porcentaje de cera, impurezas mecánicas, cantidad de compuestos fenólicos, índice de oxidación, contenidos de flavonoides, índice de yodo, humedad, cantidad de resinas, porcentaje de cenizas, evaluación de la apariencia externa, color, sabor, estructura, consistencia a temperatura ambiente e impurezas visibles (León, 2012).

El contenido de *fenoles* y *flavonoides* es un parámetro que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico. Si el propóleo se conserva más de un año, su actividad biológica comienza a decrecer, es por ello que se recomienda mantenerlos en frascos ámbar de vidrio hasta su utilización, pero existe una variación de la cantidad de compuestos biológicamente activos ya que están en función de la zona geográfica donde se encuentran las colmenas, la vegetación, la época del año, entre otros.

La caracterización de la zona de recolección es fundamental para la diferenciación del producto y conlleva una mejor ubicación a nivel comercial (Palomino, 2009; León, 2012). Resulta complicado establecer los lineamientos adecuados para determinar la calidad del propóleo, ya que existen muchos factores y una composición compleja (León, 2012).

3.0 JUSTIFICACIÓN

Este proyecto responde a la necesidad de la Industria Apícola de México para la comercialización de productos a base de propóleos de calidad, debido a que:

- La mayoría de los apicultores desconocen el valor comercial del propóleo y como consecuencia es desechado.
- La mayoría de la población está recurriendo al uso de la medicina tradicional, lo que lleva a un incremento en el consumo de propóleo en la industria farmacéutica, química, alimentaria y cosmética, debido a sus propiedades terapéuticas.
- **En México no se cuenta con un marco normativo para la constatación y control de calidad del propóleo.**

4.0 OBJETIVOS

Objetivo general

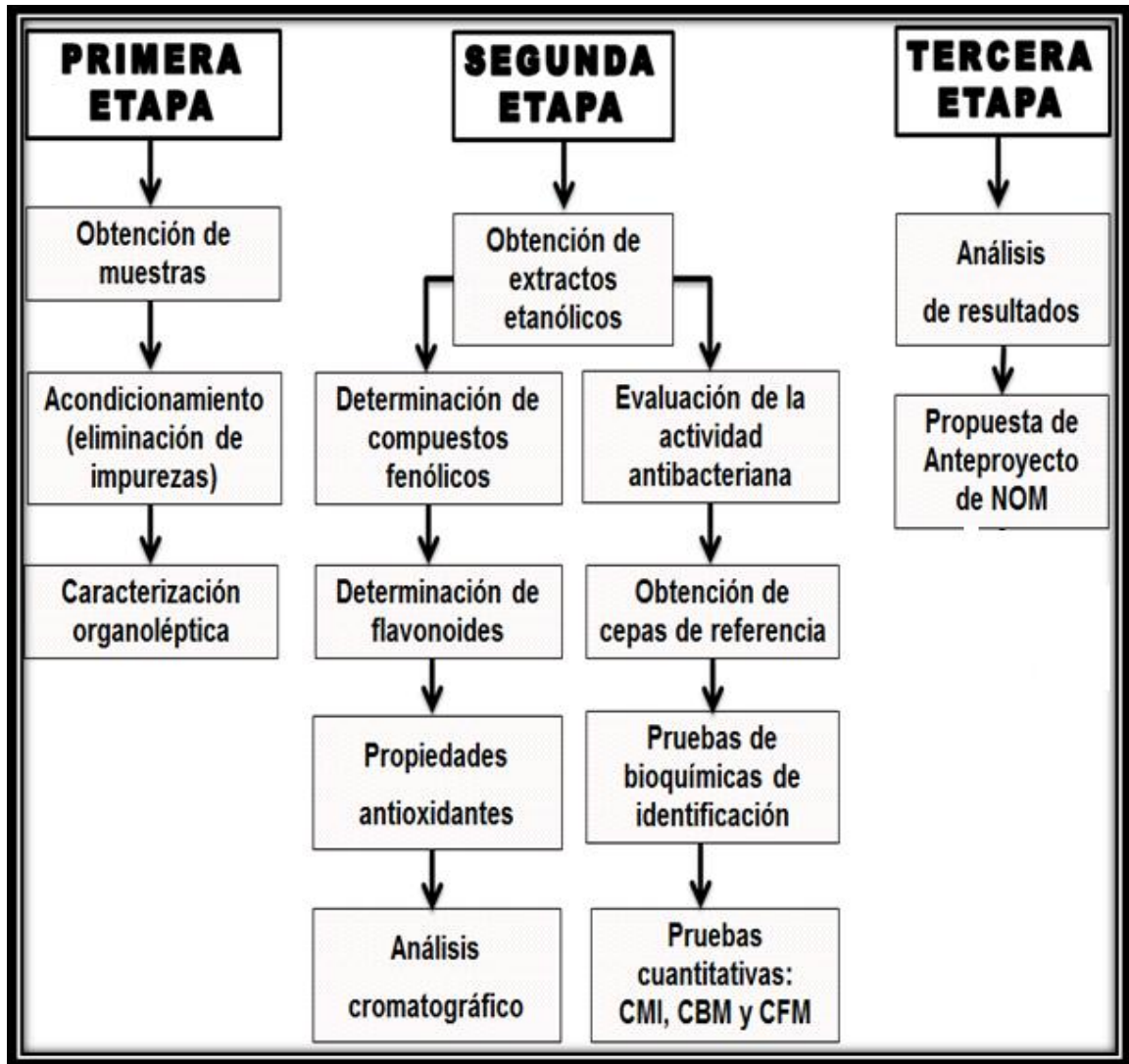
Establecer los criterios de constatación y de calidad que deben cumplir los propóleos y sus extractos para la comercialización, importación y su uso en el territorio nacional y que sea de utilidad para establecer un Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana.

Objetivos particulares

1. Recolectar muestras de propóleos del Estado de México, Puebla, Michoacán, Guanajuato y Veracruz.
2. A partir del propóleo en greña, determinar características organolépticas.
3. A partir del extracto etanólico de propóleo (EEP) determinar índice de oxidación por el método visual y por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS), actividad antioxidante (CA_{50}), concentración de fenoles y flavonoides.
4. Identificar por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) los componentes químicos de cada muestra.
5. Evaluar la capacidad antimicrobiana contra cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*.
6. Realizar la propuesta de las pruebas que sean de utilidad para el desarrollo de un Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana de calidad para los propóleos.

5.0 METODOLOGÍA

5.1 Diseño experimental



5.2 Colecta y origen de los propóleos

Se obtuvieron propóleos en grña de diferentes regiones de la República Mexicana para tener diferentes condiciones geográficas (Figura 10).

Las muestras de propóleos fueron obtenidas de ocho apiarios recolectados por los propios apicultores: Cuautitlán Izcalli, El Oro y Villa del Carbón (Estado de México), Tianguismanalco (Puebla), San José Iturbide (Guanajuato), Tlalpujahua-Senguio (Michoacán) y Tlacotalpan, Veracruz (Figura 10).

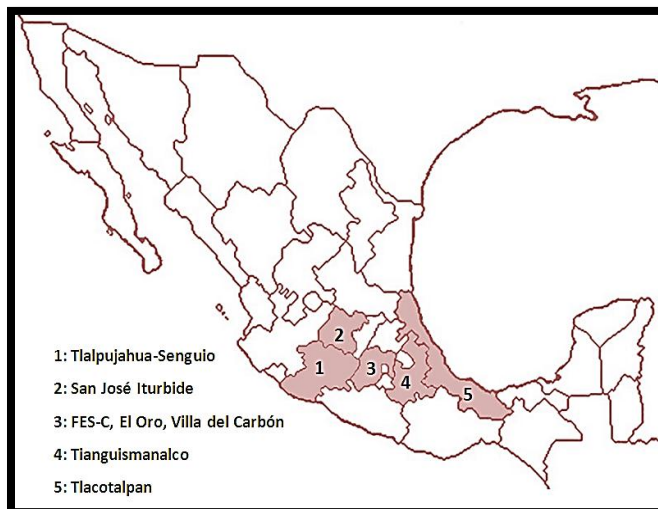


Figura 10. Zonas de recolección de los ocho propóleos analizados.

5.3 Acondicionamiento de las muestras

La muestra se acondicionó eliminando las impurezas visibles que acompañan al propóleo, tales como virutas de madera, restos de abejas, restos de pinturas, restos vegetales, entre otros.

Posteriormente se refrigeró para su adecuada conservación, ya que el propóleo a bajas temperaturas se vuelve rígido lo que favorece su maceración. Ya en éstas condiciones, debido a su consistencia, la muestra se logra fraccionar en trozos mediante molienda en un mortero de porcelana, después de la molienda debe conservarse en refrigeración. Para proteger el producto de la luz se colocó en un recipiente de vidrio color ámbar, el cual se abrió hasta el momento de realizar el análisis.

5.4 Caracterización organoléptica

Impurezas visibles. Se retiró una porción de la muestra y se colocó en un vidrio de reloj y con la ayuda de unas pinzas y una lupa, se determinaron las impurezas por observación.

Color: Para determinar el color, se colocó la muestra sobre una superficie blanca y se comparó con una escala de colores y en un ambiente con buena iluminación, asimismo se utilizó un microscopio estereoscópico con cámara digital para visualizar más definidamente los colores presentes. Se calificó el color según las tonalidades predominantes en la muestra.

Aspecto y estructura. El aspecto externo y la estructura se evaluaron mediante la observación con la ayuda de una lupa.

Olor y sabor. Para la evaluación del olor y sabor, se retiró una porción de la muestra a fin de que el envase no interfiriera en la percepción olfativa. Posteriormente, por unos segundos la muestra se

colocó en la parte media de la lengua y se analizó mediante la comparación de sus atributos de sabor con los que mejor lo distinguían.

Consistencia a temperatura ambiente. Para determinar su consistencia se retiró una porción de la muestra y se colocó en un vidrio de reloj, hasta que alcanzó la temperatura ambiente en el laboratorio. La consistencia se determinó al tocar la muestra con los dedos y comparándola con el atributo que mejor la describía.

5.5 Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP)

Este procedimiento se realizó en el Laboratorio 121 de Química Orgánica en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.

Después del acondicionamiento de las muestras, se pesó una cantidad no menor a 50 gramos. Se extrajo utilizando un proceso de maceración con etanol al 70% en una proporción 3:1 peso/volumen, por un período de 72 horas. Posteriormente se separó por filtración y el extracto resultante se concentró utilizando un Rotovapor (Modelo Büchi R-205 B-490) con unas constantes de 85 revoluciones de rotación, temperatura de vapor de 27 ° C y temperatura de baño de 55 ° C. Se dejó por un período de 5 a 7 días a sequedad utilizando una bomba de vacío (Gutiérrez, 2011).

5.6 Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos se determinó por diferencia de peso con relación al peso inicial del propóleo (Gutiérrez, 2011). El cálculo del rendimiento de cada propóleo estudiados, se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra (g)}} \times 100$$

5.7 Especificaciones físicas y químicas

5.7.1 Presencia de flavonoides

Este análisis químico fue realizado usando la metodología propuesta por la *Norma Ramal Cubana Apicultura NRAG 1129.1994*. Basado en la reacción de compuestos coloreados, por reacción de los flavonoides con acetato de plomo, que deben colorearse rápidamente de un color anaranjado-amarillento, y con hidróxido de sodio que darán un color amarillo-verdoso y se precipitarán (Anexo 1).

5.7.2 Compuestos fenólicos: método de Folin-Ciocalteu

Este análisis químico fue realizado usando la metodología propuesta por la *Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2: Extractos de propóleos*. Se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL. La concentración que se utilizó para cada extracto fue de 0.02 mg/mL y las absorbancias se interpolaron con la curva de calibración del ácido gálico (Anexo 2).

5.7.3 Cuantificación de flavonoides

Este análisis químico fue realizado usando la metodología propuesta por la *Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2: Extractos de propóleos* con algunas modificaciones. Se realizó una curva de calibración de quercetina con concentraciones de 1 a 90 mg/L. La concentración que se utilizó para cada extracto fue de 0.02 mg/mL y las absorbancias se interpolaron con la curva de calibración de quercetina (Anexo 3).

5.7.4 Propiedades antioxidantes

5.7.4.1 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Anexo 4). Se determinó la Capacidad antioxidante 50 (CA₅₀), utilizando concentraciones de 0 a 250 µg/mL. Como control positivo se utilizó la quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como control negativo se utilizaron pozos con 200 µL de metanol grado HPLC (Orozco, 2010).

5.7.4.2 Índice de oxidación por el método visual

Este análisis químico fue realizado usando la metodología propuesta por las *normas internacionales de Cuba y Argentina* (Anexo 5). Este método es utilizado tradicionalmente para determinar el tiempo en que tarda en desaparecer el color violeta del permanganato de potasio al reducirse por la presencia de compuestos oxidantes. Éste es un método que requiere la percepción visual y el resultado puede ser muy subjetivo. Es por ello que **se implementó un método espectrofotométrico** para esta determinación por ser más precisa y brindar resultados confiables.

5.7.4.3 Índice de oxidación por el método de espectrofotometría UV-VIS

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Química Experimental Aplicada ubicado en la Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. Campus 1. Bajo la responsabilidad de la M.E. Victoria Oralia Hernández Palacios.

Se establecieron las condiciones del método visual usado tradicionalmente en el espectrofotómetro ultravioleta visible (modelo LAMBDA 18, PERKIN ELMER), doble haz, $\lambda = 525$ nm, rango de lecturas de 0 a 420 s, con intervalos de 10 s, software para cinéticas. Ajuste a 0 de absorbancia con un blanco de H₂SO₄ al 20% (m/v) en agua (Anexo 6).

5.8 Especificaciones antimicrobianas

Los microorganismos utilizados para la evaluación antimicrobiana fueron *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231.

Para las bacterias, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por medio de la microtécnica de dilución en caldo. Se emplearon concentraciones de propóleo de 0.012 a 30 mg/mL de etanol al 70%. Como control negativo se colocaron 50 μ L de caldo Müeller-Hinton (MH) con 10 μ L de metanol grado HPLC. El grupo testigo se preparó colocando 50 μ L de caldo MH en las concavidades y 50 μ L de la suspensión bacteriana (10^5 UFC/mL). Una vez cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubrió con una tapa para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incubaron a 35°C/ 24 horas. Para medir la actividad respiratoria se empleó una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC) (Anexo 7).

Para la CMI de *C. albicans*, se sembró en agar dextrosa Sabouraud (SDA). Se preparó el inóculo con colonias de 24 horas de desarrollo a 35°C, se suspendieron en solución salina al 0.85% y se igualó al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland utilizando un espectrofotómetro (a 625 nm la absorbancia debe de ser de 0.08 a 0.10). Se emplearon concentraciones de propóleo de 0.012 a 30 mg/mL de etanol al 70%. Las placas se incubaron a 35°C/24 horas para una primera lectura y se reincubaron. A las 48 horas, se realizó una segunda lectura espectrofotométrica con un lector de ELISA (BIO RAD Model 680 Microplate Reader) a una longitud de onda de 490 nm. Para determinar la CFM, después del período de incubación se tomaron 10 μ L del último pozo que presentó crecimiento mínimo y de 2 siguientes de inhibición completa y se sembraron en SDA e incubaron a 35°C de 3 a 4 días (Londoño *et al.*, 2010).

5.9 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Bajo la responsabilidad de la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez. Se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en un cromatógrafo de gases (modelo 6850) acoplado a un espectro de masas (Modelo 5975C) marca Agilent Technologies. Se utilizó una columna HP-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y grosor de película de 0.25 mm.

6.0 RESULTADOS

6.1 Colecta y origen de los propóleos

En el Cuadro 13 se muestran las fechas de recolección y los gramos recolectado de cada propóleo en greña.

Cuadro 13. Cantidad recolectada de propóleos en greña.

Lugar de procedencia	Fecha de recolección	Peso (g)
Cuautitlán Izcalli, Estado de México	Abril 2013	333.3
El Oro, Estado de México	Septiembre 2013	82.0
Villa del Carbón, Estado de México	Septiembre 2012	990.6
Tlalpujahuá-Senguio, Michoacán	Mayo 2013	91.0
San José Iturbide, Guanajuato	Abril 2013	45.8
Tianguismanalco, Puebla	2010 - 2011	70.6
Tianguismanalco, Puebla	Noviembre 2012	188.6
Tlacotalpan, Veracruz	Noviembre 2009	70.5

6.2 Caracterización de los propóleos en greña

6.2.1 Especificaciones organolépticas

Los resultados de los distintos atributos sensoriales de los propóleos estudiados en este trabajo se muestran en el Cuadro 14.

El **color** constituye una de las características organolépticas más importantes para clasificar a los propóleos de orígenes diversos. Las muestras recolectadas en el Estado de México, Guanajuato y Puebla presentaron un color marrón con tintes verdes o amarillentos (75%) y los provenientes de Michoacán y Veracruz (25%) presentaron un color marrón claro con tintes amarillos y verdosos. Estas muestras además presentaron distintos grados de brillo. La ausencia de brillo (opacidad) evidenciada en algunas muestras estaría relacionada con la vegetación que rodea a la colmena y a la posibilidad de una oxidación externa de la resina (Figuras 11 a 17).

El **olor** que presentaron fue resinoso en un 62.5% y el resto un olor aromático. En relación al **sabor** los resultados muestran una tendencia a presentar sabores del tipo amargo.

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

Las pruebas de **consistencia** realizados a temperatura ambiente mostraron que el 37.5 % de las muestras son rígidas, el 50% son maleables y solo 12.5% son muy maleables.

Cuadro 14. Especificaciones organolépticas de los propóleos estudiados.

Lugar de procedencia	Color	Olor	Sabor	Aspecto	Consistencia
Cuautitlán Izcalli	Marrón verdoso, tintes amarillos	Aromático	Amargo	Trozos irregulares con brillo	Maleable
Villa del Carbón	Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Trozos irregulares con brillo	Maleable
El Oro	Marrón verdoso, tintes amarillos	Aromático	Amargo	Trozos irregulares con brillo	Muy maleable
Tlalpujahua-Senguio	Marrón claro- Marrón verdoso, tintes amarillos	Aromático	Amargo	Trozos irregulares con brillo	Maleable
San José Iturbide	Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Trozos irregulares ligeramente opacos	Maleable
Tianguismanalco 2010 - 2011	Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Trozos irregulares opacos	Rígida
Tianguismanalco 2012	Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Trozos irregulares opacos	Rígida
Tlacotalpan	Marrón claro- Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Trozos irregulares opacos	Rígida

• **Cuautitlán Izcalli, Estado de México.**

Obtenido del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4. Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

La localización geográfica es: latitud norte: 19° 40' 50", longitud occidental: 99° 12' 25", altitud: 2260 msnm. Cuenta con clima tipificado como templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media que se presenta en un 30.6% de la superficie territorial y templado subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad en un 69.4% de la superficie. Se presenta una

temperatura promedio propia del clima templado subhúmedo, cuya variación máxima alcanza los 27.8°C y como mínima de 5°C. La temperatura media anual es de 16°C.

El Municipio cuenta con una gran variedad de vegetación, principalmente constituida por bosques y pastizales. Se caracteriza por presentar pirul (*Schinus molle*), aile (*Alnus acuminata* Kunt), jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), álamo blanco (*Populus alba* L.), fresno (*Fraxinus excelsior* L), colorín (*Erythrina americana*), trueno (*Ligustrum vulgare*) en sus diferentes variedades: teja blanca (*Tilia platyphyllos* Scop.), cedro (*Cedrela odorata* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y fresno (*Fraxinus excelsior* L.), entre otros (INAFED, 2015).



Figura 11. Propóleo en greña de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
Izquierda vista macroscópica, derecha vista con microscopio estereoscópico.

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

- **El Oro, Estado de México.**

Obtenido de una zona de producción localizada en las estribaciones de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca que se localiza en la parte montañosa de la entidad, al noroeste de la capital del Estado de México, colinda con el municipio de Tlalpujahua, Michoacán. La localización geográfica es: 19° 51' 34" latitud norte, 100° 08' 49" longitud oeste; mínimas, 19° 43' 43" latitud norte y 99° 58' 54" longitud oeste. Una altura aproximada de 3200 msnm. El clima es templado subhúmedo y la precipitación pluvial media anual es de 859 mm.

Las especies de la región son pino (*Pinus* sp), ocote (*Pinus teocote* Schltdl.), encino (*Quercus rugosa*), oyamel (*Abies religiosa*), cedro (*Cedrela odorata* L.), fresno (*Fraxinus excelsior* L), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), tepozán (*Buddleia cordata* Kunth), sauce llorón (*Salix babylonica* L.), roble (*Quercus robur* L.), trueno (*Ligustrum vulgare*) y casuarinas (*Casuarina equisetifolia* L). Árboles frutales: manzana (*Malus Communis* L.), pera (*Pyrus Communis* L.), ciruelo (*Prunus domestica*), durazno (*Prunus persica*), membrillo (*Cydonia oblonga*), perón (*Capsicum pubescens*), tejocote (*Crataegus Pubescens*) y capulín (*Prunus salicifolia*). Cactáceas: cactus (*Cereus coryne*), pitaya (*Hylocereus undatus*), nopalillo (*Nopalxochia*). Hierbas medicinales: altamisa (*Artemisa vulgaris*), árnica (*Arnica montana* L.), borraja (*Borago officinalis* L.), cedrón (*Aloysia triphylla*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), romero (*Rosmarinus officinalis*), ruda (*Ruta graveolens*), tabaquillo

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

(*Solanum mauritianum*), peshtó (*Eupatorium deltoideum*), epazote de perro (*Chenopodium ambrosioides*), pericón (*Hypericum tomentosum* L.), hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* Cav.), toronjil (*Melissa officinalis*), manzanilla (*Melissa officinalis*), té de monte (*Satureja macrostema*), ajeno (*Artemisia absinthium* L.), marrubio (*Marrubium vulgare* L.), prodigiosa (*Kalanchoe pinnata*), yerbabuena (*Mentha sativa*) y doradilla (*Ceterach officinarum*) (INAFED, 2015).



Figura 12. Propóleo en greña de El Oro, Estado de México.
Izquierda vista macroscópica, derecha vista con microscopio estereoscópico.
Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

- **Villa del Carbón, Estado de México.**

Obtenido de apiarios de Villa del Carbón. Se localiza al noreste del Estado con las coordenadas extremas máximas 19° 54' 24" latitud norte y 99° 39' 07" longitud oeste; coordenadas mínimas 19° 36' 48" latitud norte y 99° 22' 21" longitud oeste y a 2600 msnm. El clima es templado con invierno frío en donde se presentan heladas fuertes en febrero, marzo, agosto y septiembre. La temperatura media es de 20°C con humedad constante. En lo que se refiere a los vientos, existen un 22% de calma, la velocidad de los vientos es de 1 m/s en todas direcciones, sin embargo los vientos predominantes vienen de norte a sur.

Es abundante el oyamel (*Abies religiosa*), encino (*Quercus rugosa*), pino (*Pinus* sp), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), pirul (*Schinus molle* L.), sauce llorón (*Salix babylonica* L.), plantas silvestres, hortalizas y huertos, hasta las que provienen de la siembra de milpas (INAFED, 2015).



Figura 13. Propóleo en greña proveniente de Villa del Carbón.
Izquierda vista macroscópica, derecha vista con microscopio estereoscópico. Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

- **Tianguismanalco, Puebla**

Obtenido del apiario del paraje de San Isidro Tepoxtla en el municipio de Tianguismanalco, Puebla. Una cosecha corresponde a la recolección realizada en el lapso del año 2010 a 2011 y la otra corresponde a la recolección del 15 de noviembre al 15 de diciembre del 2012.

La localización geográfica de este municipio es entre los paralelos 18° 56' y 19° 04' de latitud norte; los meridianos 98° 24' y 98° 35' de longitud oeste y una altitud entre 1 940 y 2 220 msnm. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (91%), semifrío subhúmedo con lluvias en verano (6%) y templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (3%). Presenta un rango de temperatura de 6 a 18°C, un rango de precipitación de 900 a 1 100 mm. La vegetación predominante bosque de encinos y pino (50%) y pastizales (2%) (INEGI, 2009).

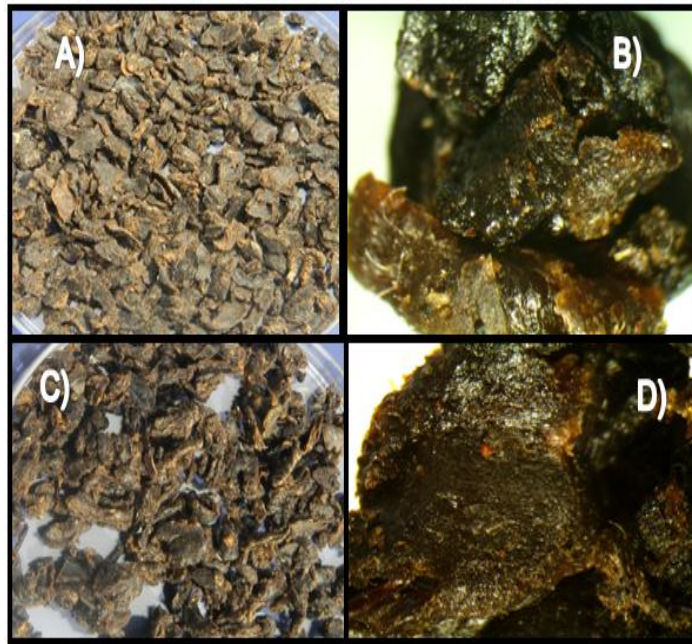


Figura 14. Propóleo en greña de Tianguismanalco, Puebla. A) y B) Cosecha 2010-2011; C) y D) Cosecha 2012. Izquierda vista macroscópica, derecha vista con microscopio estereoscópico.

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

- **San José Iturbide, Guanajuato.**

Fue obtenido de un apiario localizado en la localidad de El Capulín, situado en el Municipio de San José Iturbide en el Estado de Guanajuato.

Tiene las coordenadas: al norte 21° 07', al sur 20° 53' de latitud norte; al este 100° 14'; al oeste 100° 32' de longitud oeste y una altura de 2100 msnm. La temperatura promedio es de 17.8 °C, la mínima es de 15.5 °C; la máxima es de 23.5 °C. La precipitación total promedio (1970-1995) es de 100 milímetros.

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

La flora del municipio está constituida por especies forrajeras como el zacatón (*Sporobolus airoides*), gramilla (*Cynodon dactylon*), popotillo plateado (*Andropogon barbinodis*) y zacate lobero (*Lycurus phleoides*), nopal (*Opuntia ficus-indica* L.), huizache (*Acacia farnesiana*), mezquite (*Prosopis glandulosa*), maguey verde (*Agave potatorum*), granjeno (*Celtis pallida*), ocotillo (*Fouquieria splendens*), palma china (*Yucca filifera*), cactus órgano (*Pachycereus marginatus*), sangre de drago (*Croton lechleri* M.), garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), capulín (*Prunus capuli* Cav.), pirul (*Schinus molle* L.), entre otros (INAFED, 2015).

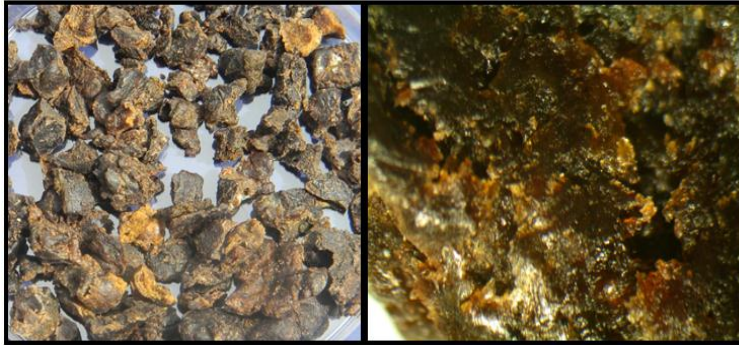


Figura 15. Propóleo en greña de San José Iturbide, Guanajuato.
Izquierda vista macroscópica, derecha vista con microscopio estereoscópico.
Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

- **Tlalpujahuá-Senguio, Michoacán.**

La zona de producción se localiza en las estribaciones de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca que incluyen localidades en los municipios de Tlalpujahuá y Senguio, cuyas coordenadas son de 19°18' a 19° 45' de latitud norte y de 100° 08' a 100° 24' de longitud oeste. Tiene una altitud de 2500 msnm.

El clima es templado frío con lluvias en verano entre 700 y 1200 mm anuales. La vegetación predominante son los pinares, conformados por *Pinus pseudostrabus*, se incluyen también *P. montezumae*, *P. leiophylla*, *P. patula* y *P. teocote*; especies herbáceas como *Alchemilla*, *Bracharis*, *Arenaria*, *Bidens*, *Eupatorium*, *Festuca*, *Muhlenbergia*, *Senecio*, *Sporobolus*, *Stevia*. Los agrosistemas incluyen reforestaciones de *Pinus* y *Cupresus*, huertas de caducifolios; para primavera-verano el sistema dominante es maíz para grano con punta de riego, también existe maíz de temporal, avena y trigo, para otoño-invierno básicamente se cultiva avena forrajera y en menor proporción trigo para grano. La actividad apícola incluye cosecha a finales de mayo y noviembre (INEGI, 2009).



Figura 16. Propóleo en greña proveniente de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán.
Izquierda vista macroscópica, derecha vista con microscopio estereoscópico.

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

- **Tlacotalpan, Veracruz.**

Se ubica en el sureste de Veracruz en las coordenadas latitud de 18° 36' 47"N, longitud 95° 39' 23" O, a una altura de 10 msnm. La temperatura del municipio promedio anual es de 25°C, su clima es cálido-regular, y tiene una precipitación media anual de 18 mm aproximadamente.

Debido a su ubicación, se presentan frentes fríos principalmente de octubre a abril, con vientos que soplan de norte a sur, conocidos como "Nortes", que alcanzan velocidades de hasta los 30 m/s. En general, septiembre es el mes que presenta el mayor número de tormentas, lo cual influye en la circulación y modifican la posición de la termoclina haciéndola más profunda.

La vegetación que se localiza en esta región es de tipo caducifolia, encontrándose arboles como encino (*Quercus rugosa*), fresno (*Fraxinus excelsior* L.), sauce (*Salix alba*), álamo (*Populus alba*), naranjo (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus limonum* Risso), entre otros. En el ramo agropecuario la producción principal es de almendra, cacahuate, coco, plátano, piña y guayaba ((INAFED, 2015).



Figura 17. Propóleo en greña proveniente de Tlacotalpan, Veracruz.
Izquierda vista macroscópica, derecha vista con microscopio estereoscópico.

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

Entre las **impurezas mecánicas** (Cuadro 15) se encontraron abejas o restos de éstas, virutas de madera, restos vegetales, piedras, arena, papel, entre otros. La mayoría de las muestras presentaron un contenido de impurezas mecánicas < 25%, sin considerar las muestras de El Oro y Tlacotalpan porque se recibieron limpias (acondicionadas).

6.3 Caracterización de los extractos etanólicos

La coloración de los extractos fue del ámbar claro al café (Figura 18); la intensidad del color está íntimamente relacionada con el contenido de los compuestos bioactivos (Lozina, 2010).

En el Cuadro 15 se muestran valores del **rendimiento** de los extractos etanólicos, siendo más elevados en propóleos del Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Veracruz (38.5% a 50.9%), mientras que muestras de Villa del Carbón y Puebla presentan rendimientos más bajos (25.5% a 34.2%), lo cual puede relacionarse con la concentración de compuestos fenólicos y/o flavonoides.

Cuadro 15. Porcentaje de impurezas mecánicas y de rendimiento de EEP.

Lugar de procedencia	Impurezas mecánicas (%)	Gramos recolectados	Cantidad utilizada (g)	Extracto etanólico de propóleo (g)	Rendimiento (%)
Cuautitlán Izcalli	30%	333.3	234	119.1	50.9
Villa del Carbón	27%	990.6	200	61.7	30.9
El Oro	24%	82.0	50	19.5	38.5
Tlalpujahuá-Senguio	12%	91.0	70	30.3	43.2
San José Iturbide	13%	45.8	35	13.8	39.4
Tianguismanalco 2010 – 2011	21%	70.6	51	17.5	34.2
Tianguismanalco 2012	23%	188.6	135	34.5	25.5
Tlacotalpan	2.85%	70.6	50	19.7	39.4

* Porcentaje de rendimiento con base al peso seco del propóleo colectado.



Figura 18. Tonalidad de los ocho extractos etanólicos de propóleos.

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

6.4 Presencia de flavonoides

Las muestras de propóleo al contacto con acetato de plomo forman un precipitado amarillo con diferentes intensidades de color de acuerdo a la cantidad de flavonoides como flavandioles, flavonoles, lignanos o terpenos (Figura 19).



Figura 19. Identificación de flavonoides con acetato de plomo al 10%.

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

Con hidróxido de sodio al 10% se observa una coloración de naranja a amarilla en diferentes intensidades que indica la presencia de flavonas y flavonoles (Figura 20).



Figura 20. Identificación de flavonoides con hidróxido de sodio al 20%.

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

La mayoría de los propóleos presentaron algún cambio de color o formación de precipitado, exceptuando el propóleo de Tlacotalpan, Veracruz.

Al ser una prueba de tipo cualitativo por observación directa en un cambio de coloración, se considera una prueba de rápida para la detección de flavonoides (Anexo 1).

6.5 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

El contenido de fenoles de cada extracto es expresado en “unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto seco, (mg/g)”, los datos de la curva de calibración del material de referencia de *ácido gálico* se detallan en el Anexo 2.

En el caso de flavonoides el material de referencia utilizado es la *quercetina* y los detalles de la curva de calibración se muestran en el Anexo 3 (Lozina *et al.*, 2010).

Respecto al contenido de fenoles y flavonoides encontrados en las muestras analizadas (Cuadro 16) se pueden definir dos grupos, uno formado por muestras procedentes del Estado de México y Michoacán (niveles altos) y el otro constituido por muestras de Puebla y Veracruz (niveles más bajos), el porcentaje encontrado en cada muestra analizada se muestra en la Figura 21.

Cuadro 16. Concentración y porcentaje de fenoles totales y de flavonoides.

Lugar de procedencia	Fenoles (mg ácido gálico/g EEP)	% Fenoles	Flavonoides (µg quercetina/g EEP)	% Flavonoides
Cuautitlán Izcalli	191.2 ± 2.90	19.2 ± 2.90	40.4 ± 9.7	4.04 ± 9.7
Villa del Carbón	68.9 ± 0.0008	6.9 ± 0.0008	6.7 ± 1.8	0.67 ± 1.8
El Oro	63.8 ± 0.0029	6.4 ± 0.0029	19.5 ± 2.4	1.94 ± 2.4
Tlalpujahua-Senguio	182.9 ± 0.0027	18.3 ± 0.0027	28.7 ± 2.6	2.87 ± 2.6
San José Iturbide	52.2 ± 0.0013	5.2 ± 0.0013	9.9 ± 0.7	0.99 ± 0.7
Tianguismanalco 2010 – 2011	49.7 ± 0.0013	5.0 ± 0.0013	3.4 ± 0.5	0.34 ± 0.5
Tianguismanalco 2012	39.6 ± 0.0016	4.0 ± 0.0016	2.9 ± 0.4	0.29 ± 0.4
Tlacotalpan	11.9 ± 0.0002	1.2 ± 0.0002	5.1 ± 0.5	0.51 ± 0.5

Los valores representan la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.

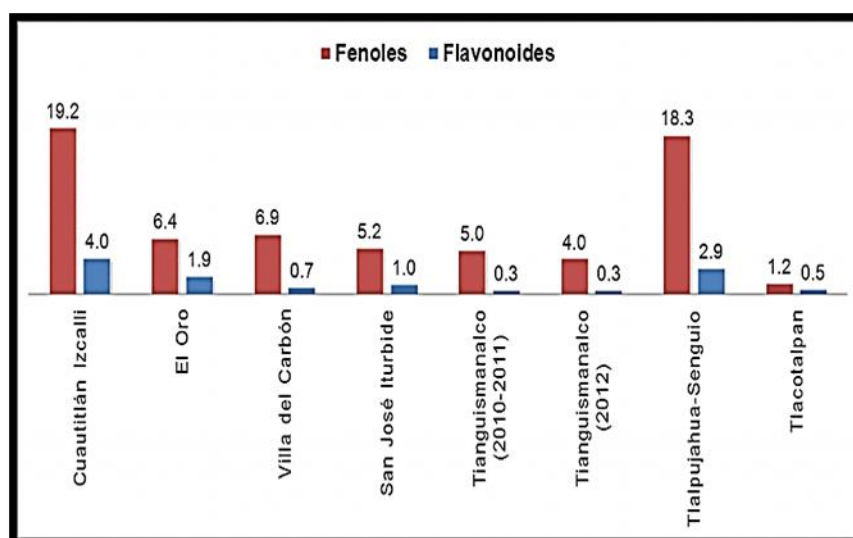


Figura 21. Porcentaje de fenoles totales y flavonoides en EEP.

6.6 Propiedades antioxidantes

6.6.1 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó con los extractos etanólicos de cada propóleo. La quercetina (control positivo) mostró una capacidad antioxidante (CA_{50}) de 1.37 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22).

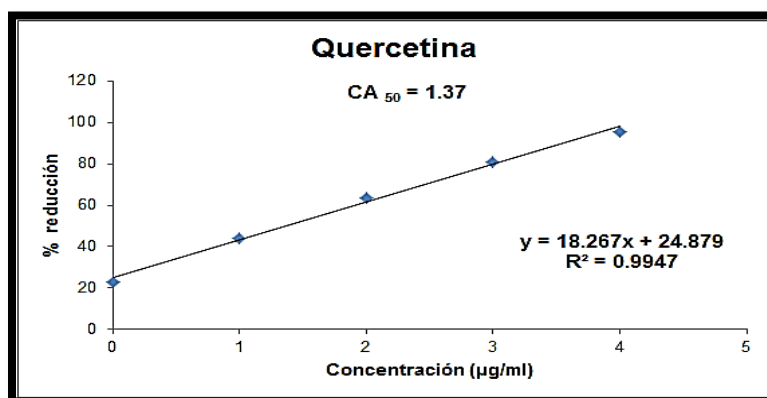


Figura 22. Actividad antioxidante de la quercetina.

Con respecto a los extractos de los propóleos, no todos presentaron una actividad similar, ya que no se unen eficientemente al radical libre del DPPH. Zavaleta *et al.* (2005) menciona que la mayor o menor actividad, no siempre está en relación con la concentración de polifenoles sino más bien la posición del grupo hidroxilo (Cuadro 17).

Cuadro 17. Actividad antioxidante en relación a la cantidad de flavonoides.

Lugar de procedencia	CA_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	% Flavonoides
Cuautitlán Izcalli	86.6	4.04 \pm 9.7
Villa del Carbón	52.6	0.67 \pm 1.8
El Oro	48.0	1.94 \pm 2.4
Tlalpujahuá-Senguio	26.0	2.87 \pm 2.6
San José Iturbide	83.5	0.99 \pm 0.7
Tlanguismanalco 2010 – 2011	189.3	0.34 \pm 0.5
Tlanguismanalco 2012	277.9	0.29 \pm 0.4
Tlacotalpan	950.4	0.51 \pm 0.5

6.6.2 Índice de oxidación por el método visual y por espectrofotometría UV-VIS

No existen reportes en México de una técnica espectrofotométrica para la determinación del índice de oxidación de algún compuesto, por lo que estos se consideran los primeros datos al respecto.

Los propóleos de Cuautitlán Izcalli, El Oro, Villa del Carbón y Michoacán presentaron tiempos menores de oxidación que los propóleos de Guanajuato, Puebla y Veracruz, lo que indica que presentan mayor concentración de compuestos fenólicos (Cuadro 18).

Cuadro 18. Índice de oxidación por método visual y por espectrofotometría UV-VIS

Lugar de procedencia	Método visual (segundos)	Método UV-VIS (segundos)
Cuautitlán Izcalli	168	140
Villa del Carbón	283	230
El Oro	70	123
Tlalpujahua-Senguio	377	247
San José Iturbide	1479	> 420
Tianguismanalco 2010 – 2011	2975	> 420
Tianguismanalco 2012	3347	> 420
Tlacotalpan	2894	> 420

Se observa que las muestras del Estado de México (Cuautitlán Izcalli, El Oro, Villa del Carbón) y Michoacán presentan tiempos dentro del rango establecido en la adaptación de este método (420 segundos). En el caso de las muestras de Guanajuato, Veracruz y Puebla se obtuvieron tiempos mayores a 420 segundos.

Los espectrogramas de absorción (Figura 23) nos proporcionan información de cómo se realiza la reacción entre el KMnO_4 y los compuestos oxidantes presentes en la muestra, se puede observar una disminución gradual en la absorbancia, lo que significa que el KMnO_4 se está decolorando al estar reaccionando con los compuestos oxidantes presentes, o sea, el tiempo de reacción del KMnO_4 va a depender de la cantidad de compuestos fenólicos presentes. Existe una disminución gradual en la absorbancia de las muestras del Estado de México (Cuautitlán Izcalli, El Oro, Villa del

Carbón) y Michoacán (Tlalpujahua-Senguio), mientras que las muestras de Guanajuato, Veracruz y Puebla no presentan el mismo comportamiento.

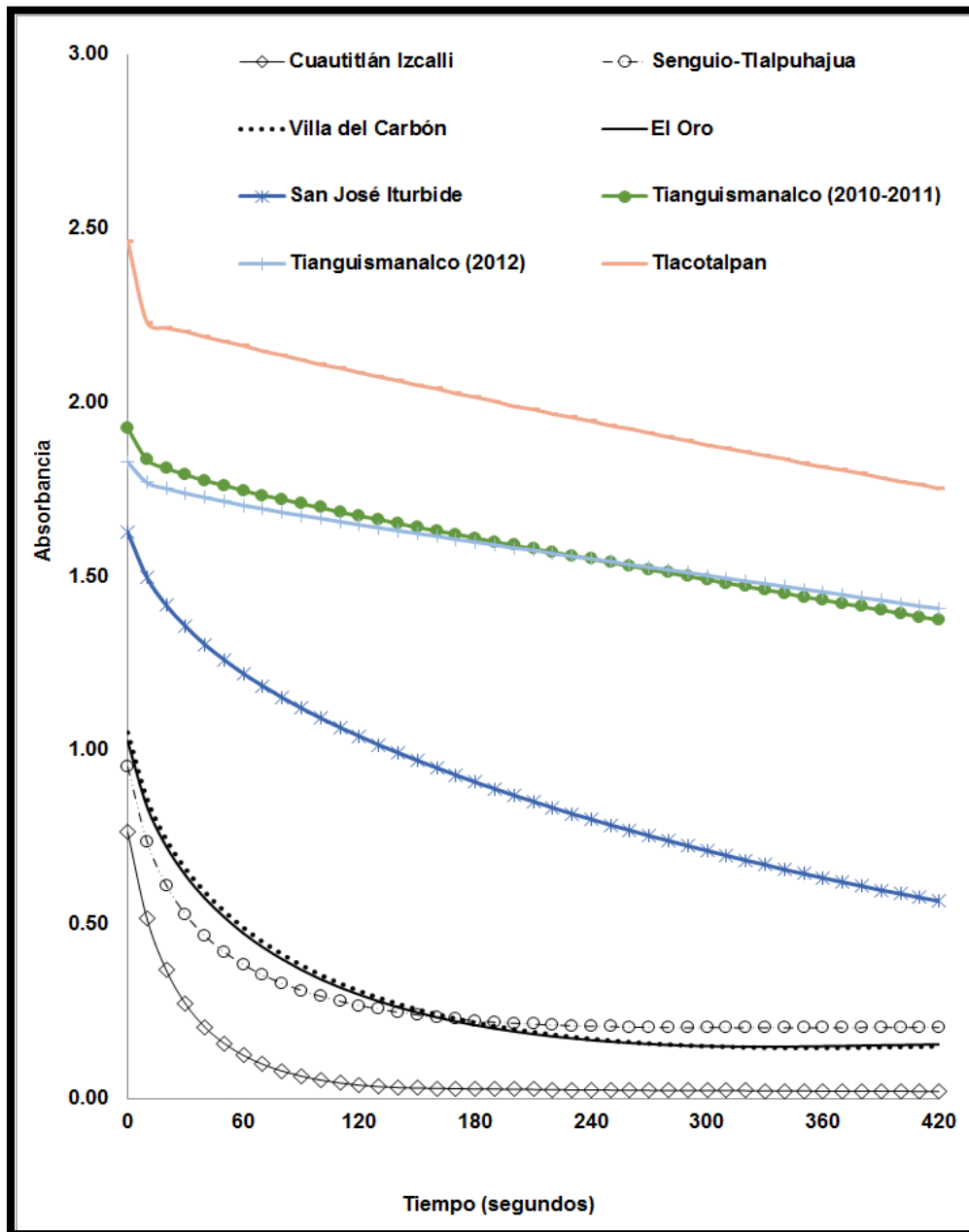


Figura 23. Espectrograma de absorción UV-VIS de cada propóleo analizado a una absorbancia de 525 nm.

Los datos obtenidos de las muestras del Estado de México y Michoacán en ambos métodos fueron comparados estadísticamente por el método de ANOVA, apoyados en el Programa Estadístico R.2.9.1, empleando un nivel de significancia de $p = 0.1294$ ($p < 0.05$). Se encontró que *no hay una diferencia significativa* entre el método visual y la espectroscopía Ultravioleta-Visible (Figura 24).

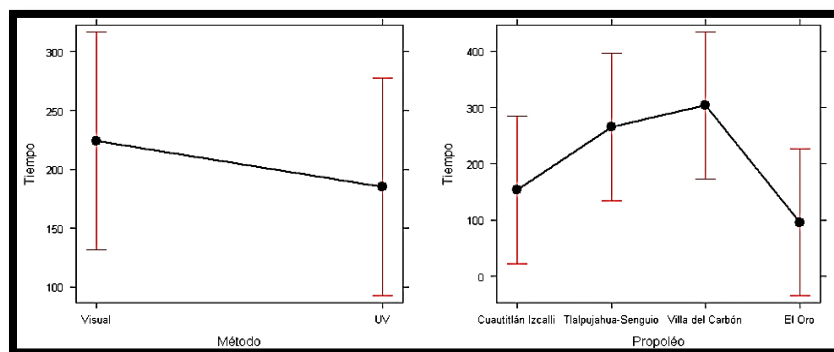


Figura 24. Comparación del índice de oxidación de los propóleos con mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides, por el método visual y espectrofotometría UV-VIS.

6.7 Evaluación antimicrobiana

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la *Concentración Mínima Inhibitoria* (CMI) (Cuadro 19 y Figura 25). La concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la *Concentración Mínima Bactericida* (CMB) o *Concentración Mínima Fungicida* (CMF) (Cuadro 19 y Figura 26). En todos los casos, esta prueba se realizó por triplicado, utilizando las cepas de referencia ATCC de cada microorganismo.

Cuadro 19. Efecto de los extractos de propóleos frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* por la técnica de microdilución en caldo.

Lugar de procedencia	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Cuautitlán Izcalli	0.19	0.37	3.75	15	0.75	1.5
Villa del Carbón	0.46	0.93	7.5	30	24	>24
El Oro	0.93	1.87	7.5	30	1.8	7.5
Tlalpujahua-Senguio	0.37	0.75	7.5	30	0.75	3.0
San José Iturbide	0.46	0.93	3.75	15	12	24
Tianguismanalco 2010 – 2011	30	> 30	15	30	7.5	30
Tianguismanalco 2012	15	30	15	>30	3.75	15
Tlacotalpan	30	> 30	15	30	15	30

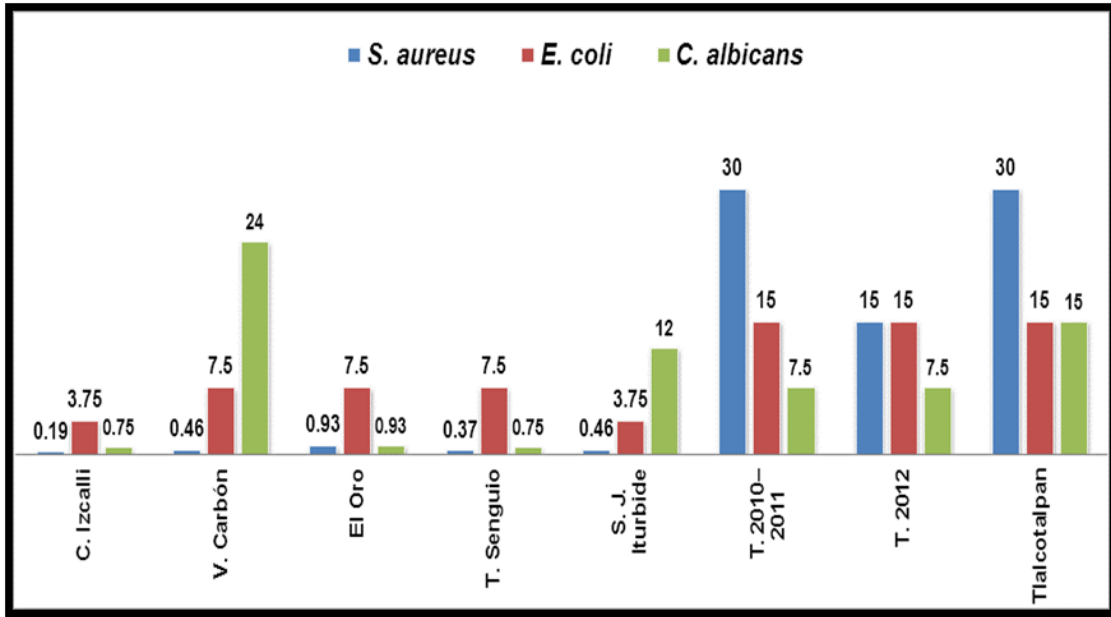


Figura 25. Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL) de los EEP sobre cepas de referencia de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*.

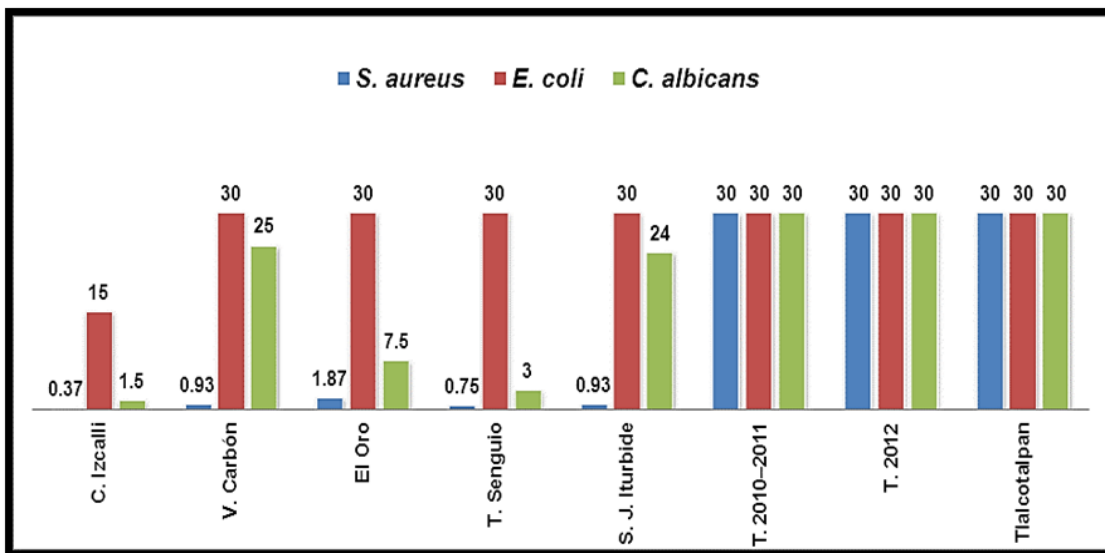


Figura 26. Concentración Mínima Bactericida y Fungicida (mg/mL) de EEP sobre cepas de referencia de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*.

6.8 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

De acuerdo al análisis realizado por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se observa una diferencia en cuanto a la cantidad y composición química entre los EEP.

En el Cuadro 20 se indican todos los compuestos propuestos por la base de datos (> 90%) del equipo en las ocho muestras de propóleos analizadas, excepto para el propóleo de Tianguismanalco 2010, donde la base de datos no identificó ningún compuesto.

Se pueden contabilizar 20 picos para el propóleo de Cuautitlán Izcalli, 37 en El Oro, 15 en Villa del Carbón, 34 en Michoacán, 50 en Guanajuato, 27 en Puebla 2010-2011, 28 en Puebla 2012 y 28 en Veracruz.

Los cromatogramas obtenidos (Figuras 27 a 33) y los compuestos propuestos por espectrometría de masas para cada extracto etanólico de propóleo (Cuadro 21 a 27) utilizando como herramienta la base de datos, se presentan a continuación.

Cuadro 20. Compuestos propuestos por la base de datos de los ocho EEP.

	Nomenclatura de la base de datos	Nomenclatura común	TR (min)
1	Phenylethyl Alcohol	Alcohol feniletílico	4.265
2	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, (1S-endo)-	Borneol	4.710
3	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-, (1S)-	Verbenona	5.132
4	2-Methoxy-4-vinylphenol	2-Metoxi-4-vinilfenol	6.087
5	Dodecanoic acid	Ácido laúrico	7.897
6	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	Amorfeno	8.206
7	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)]-	β-cadineno	8.449
8	1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro-7a-methyl-, cis-	(1E)-1-etiliden-7a-metiloctahidro-1H-indeno	8.592
9	n-Hexadecanoic acid	Ácido palmítico	10.147
10	Hexadecanoic acid, ethyl ester	Palmitato de etilo	10.259
11	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	Aromadendreno	10.319
12	Hexadecanal	Hexadecanal	10.408
13	n-Nonadecanol-1	1-Nonadecanol	10.687
14	cis-Vaccenic acid	Ácido vaccénico	10.948
15	7,10,13-Hexadecatrienoic acid, methyl ester	Metil éster del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico	10.978
16	Oleic Acid	Ácido oleico	11.025
17	Octadecanoic acid	Ácido esteárico	11.031
18	Ethyl Oleate	Éster etílico del ácido oleico	11.037
19	1,19-Eicosadiene	1,19-Eicosadieno	11.263
20	Ferruginol	Ferruginol	11.809
21	Naphthalene, decahydro-1,1,4a-trimethyl-6-methylene-5-(3-methylene-4-pentenyl)-, [4aS-(4a.alpha.,5.alpha.,8a.beta.)]-	Esclareno	11.957
22	2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-, (E)-	Cardamonina	12.111
23	Alloaromadendrene oxide-(1)	1,1,7-Trimetildecahidroespiro[ciclopropa[e]azuleno-4,2'-oxirano]	12.159
24	Phenol, 3-pentadecyl-	3-Pentadecilfenol	12.283
25	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	Selineno	12.432
26	4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (S)-	Pinocembrina	12.450
27	4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl-	Tectocrisina	12.800
28	Eicosane	Eicosano	13.263
29	Squalene	Escualeno	13.293
30	Azacyclotridecan-2-one, 1-(3-aminopropyl)-	1-(3-aminopropil)azacyclotridecan-2-ona	13.298
31	4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavanone	Sakuranetina	13.370
32	Geranylgeraniol	Geranilgeraniol	14.580
33	2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,5,7-trimethoxy-4H-chromen-4-one	3,5,7,4'-Tetrametoxiquercetina	14.847
34	Lup-20(29)-en-3-one	Lupenona	16.011
35	α-Amyrin	α-Amirina	16.213
36	Olean-12-ene	12-Oleaneno	16.231
37	Taraxasterol	Taraxasterol	16.361
38	2(1H)Naphthalenone,3,5,6,7,8,8a-hexahydro-4,8a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)-	4,8a-dimetil-6-(1-metiletenil)-3,5,6,7,8,8a-hexahidro-2(1H)-Naftalenona	16.385
39	9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol,(3.beta.)-	Cicloartenol	16.504
40	Lupeol	Lupeol	16.533

Cuadro 21. Constituyentes del EEP de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	10.259	0.45	Palmitato de etilo
2	11.025	0.47	Éster etílico del ácido oleico
3	12.467	58.48	Pinocembrina
4	13.162	9.55	Tectocrisina
5	13.298	2.60	1-(3-aminopropil)azaciclotridecan-2-ona

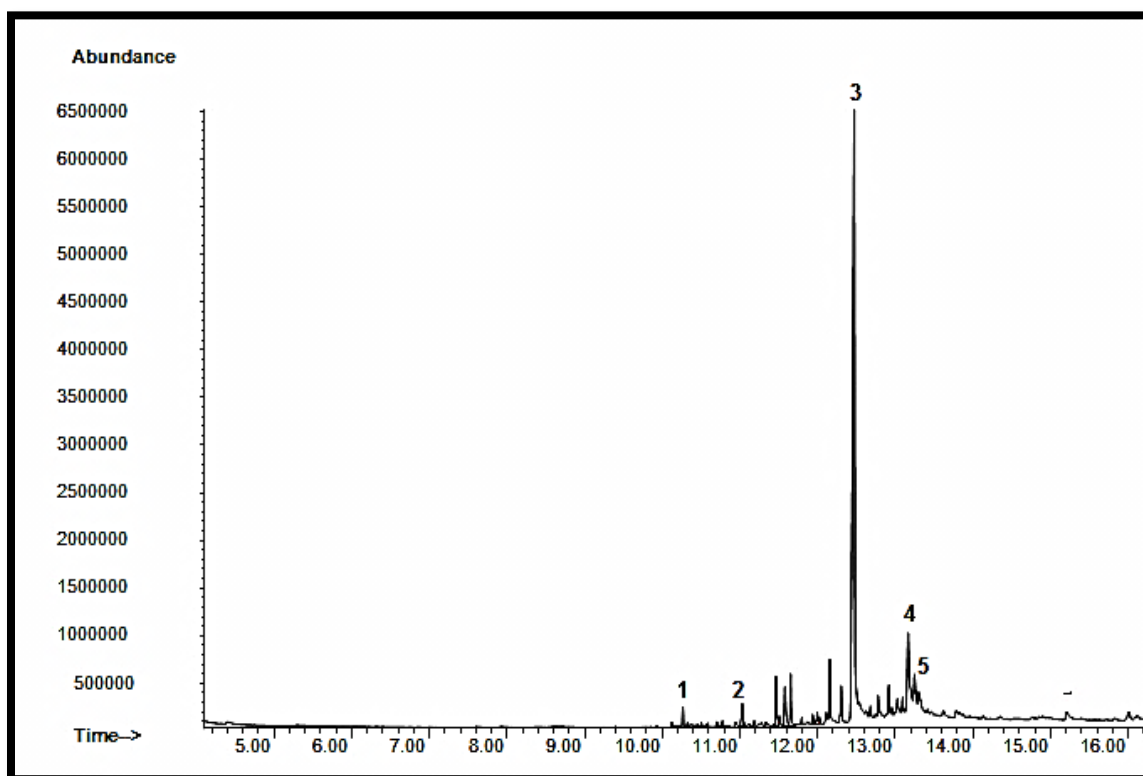


Figura 27. Cromatograma del EEP de Cuautitlán Izcalli, Edo de México.

Cuadro 22. Constituyentes del EEP de Villa del Carbón, Estado de México.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	4.71	1.97	Borneol
2	10.948	0.84	Ácido vaccénico
3	12.456	3.78	Pinocembrina
4	16.361	1.48	Taraxasterol

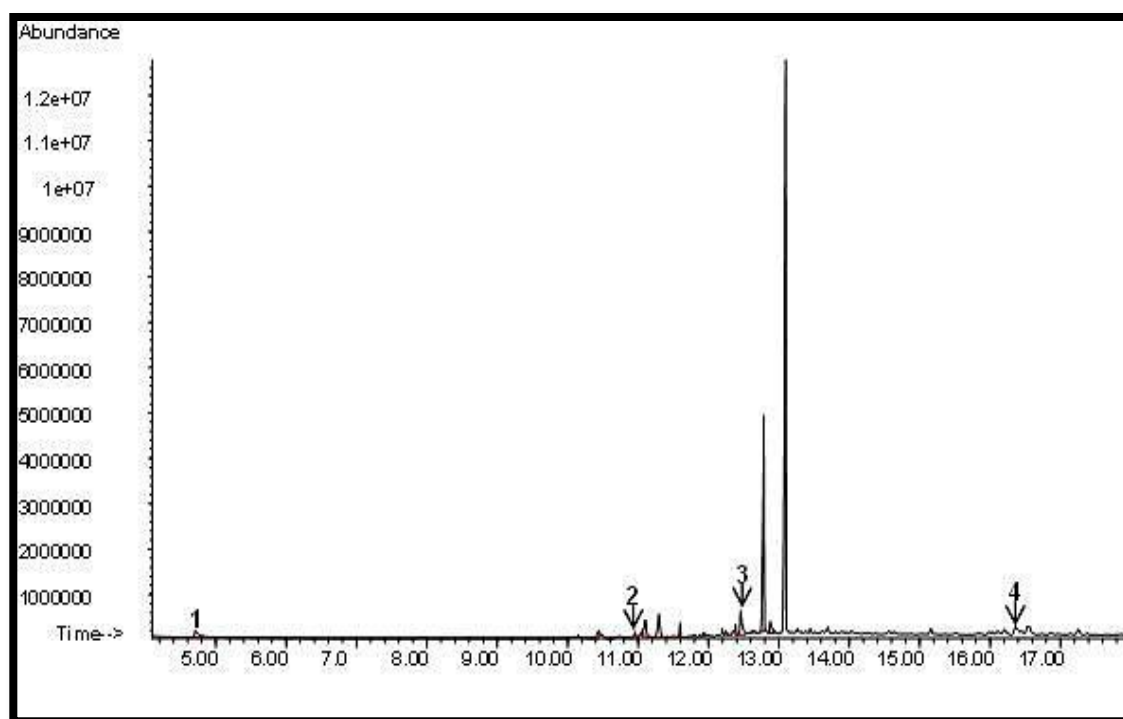


Figura 28. Cromatograma del EEP de Villa del Carbón, Estado de México.

Cuadro 23. Constituyentes del EEP de El Oro, Estado de México.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	4.265	3.18	Alcohol feniletílico
2	6.087	3.00	2-Metoxi-4-vinilfenol
3	8.206	0.25	Cadideno: 7- <i>epi</i> - α -cadineno
4	8.449	0.36	Cadideno: cadina-3,9-dieno
5	8.592	1.07	(1 <i>E</i>)-1-etiliden-7 <i>a</i> -metiloctahidro-1 <i>H</i> -indeno
6	10.159	1.89	Ácido palmítico
7	10.408	0.35	Hexadecanal
8	10.954	0.58	Ácido oleico
9	10.978	0.48	Metil éster del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico
10	11.031	0.52	Ácido esteárico
11	11.263	0.40	1,19-Eicosadieno
12	12.111	10.23	Cardamonina
13	12.283	0.70	3-Pentadecilfenol
14	12.45	22.67	Pinocembrina
15	12.8	11.95	Tectocrisina
16	13.37	2.23	Sakuranetina

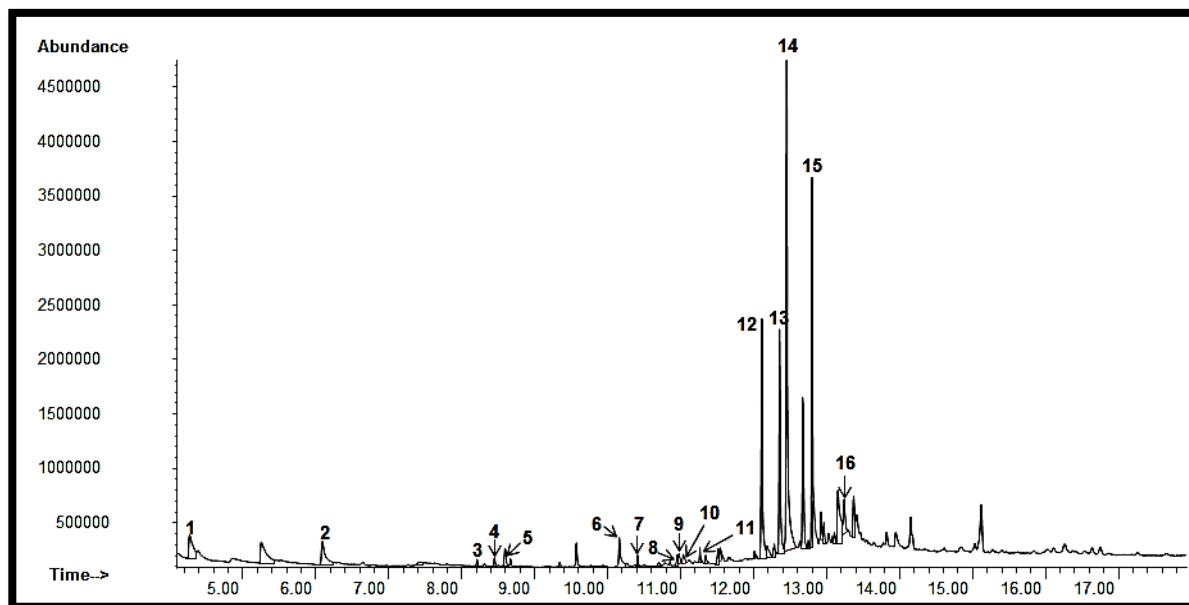


Figura 29. Cromatograma del EEP de El Oro, Estado de México.

Cuadro 24. Constituyentes del EEP de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	7.903	0.45	Ácido dodecanoico (ácido laúrico)
2	8.586	0.47	(1E)-1-etiliden-7a-metiloctahidro-1H-indeno
3	10.265	1.68	Palmitato de etilo
4	10.722	15.75	Aromadendreno
5	10.96	0.95	Ácido oleico
6	11.037	5.37	Éster etílico del ácido oleico
7	11.957	27.06	Esclareno
8	12.117	10.53	Cardamonina
9	12.159	0.72	1,1,7-Trimetildecahidroespiro[ciclopropa[e]azuleno-4,2'-oxirano]
10	12.45	7.61	Pinocembrina
11	12.628	0.73	Eicosano
12	14.847	0.36	3,5,7,4'-Tetrametoxiquercetina
13	16.023	4.15	Lupenona

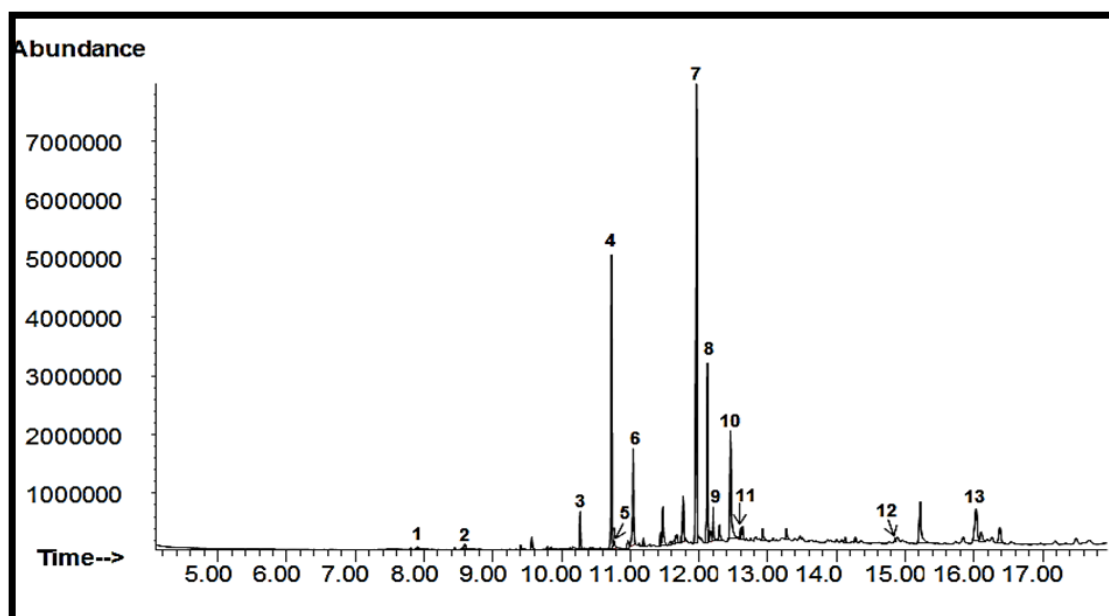


Figura 30. Cromatograma del EEP de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán.

Cuadro 25. Constituyentes del EEP de San José Iturbide, Guanajuato.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	7.897	4.4	Ácido laúrico
2	10.147	1.15	Ácido palmítico
3	10.319	0.33	Aromadendreno
4	12.432	5.02	Selineno

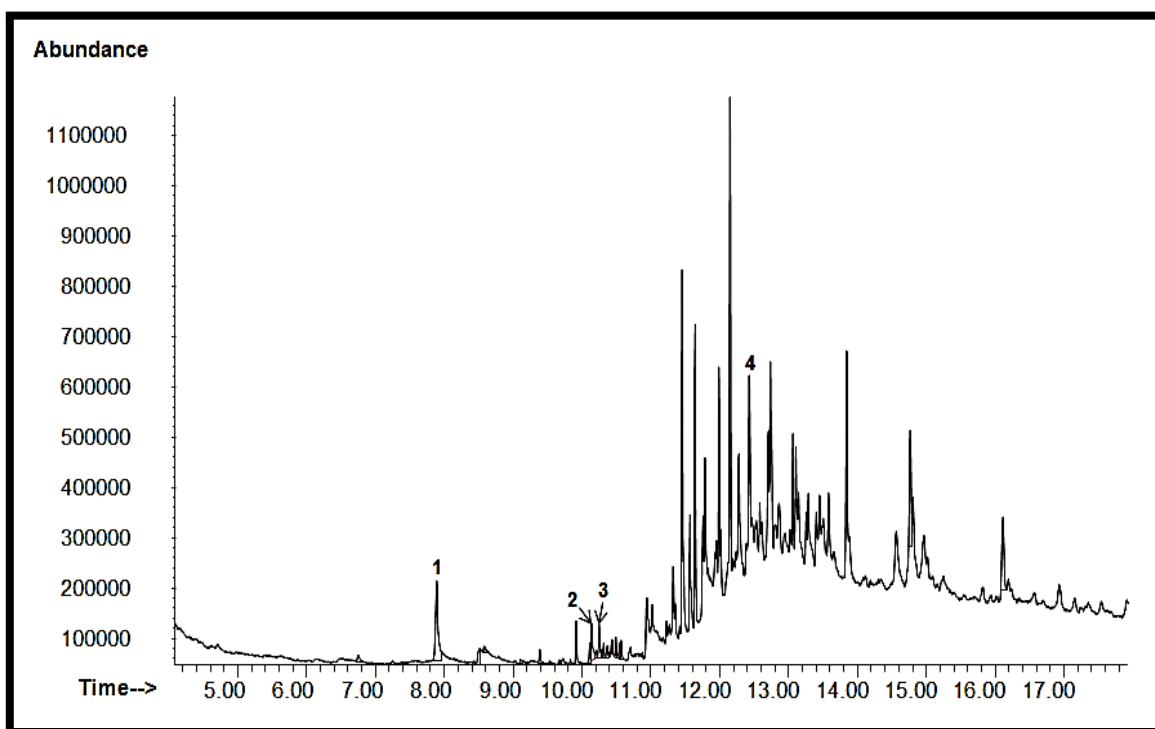


Figura 31. Cromatograma del EEP de San José Iturbide, Guanajuato.

Cuadro 26. Constituyentes del EEP de Tianguismanalco 2012, Puebla.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	7.915	1.25	Ácido laúrico
2	10.259	0.62	Palmitato de etilo
3	10.687	0.93	11-Nonadecanol
4	10.948	4.97	Ácido vaccénico
5	11.025	1.40	Ácido oleico
6	14.58	17.85	Geranilgeraniol
7	16.011	15.70	Lupenona
8	16.213	12.67	α -Amirina
9	16.533	16.31	Lupeol

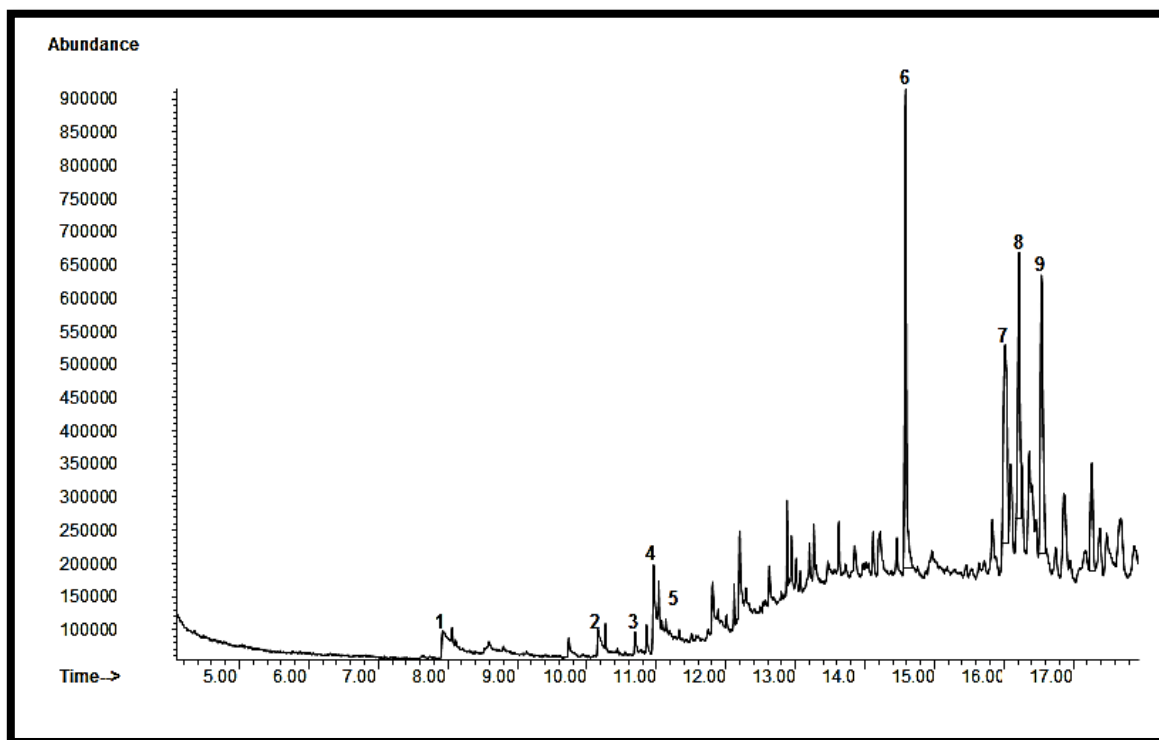


Figura 32. Cromatograma del EEP de Tianguismanalco 2012, Puebla.

Cuadro 27. Constituyentes del EEP de Tlacotalpan, Veracruz.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	5.132	0.21	Verbenona
2	11.809	0.46	Ferruginol
3	13.293	1.42	Escualeno
4	16.231	9.76	12-Oleaneno
5	16.385	5.19	4,8a-Dimetil-6-(1-metiletetil)-3,5,6,7,8,8a-hexahidro-2(1H)-Naftalenona
6	16.504	5.98	Cicloartenol

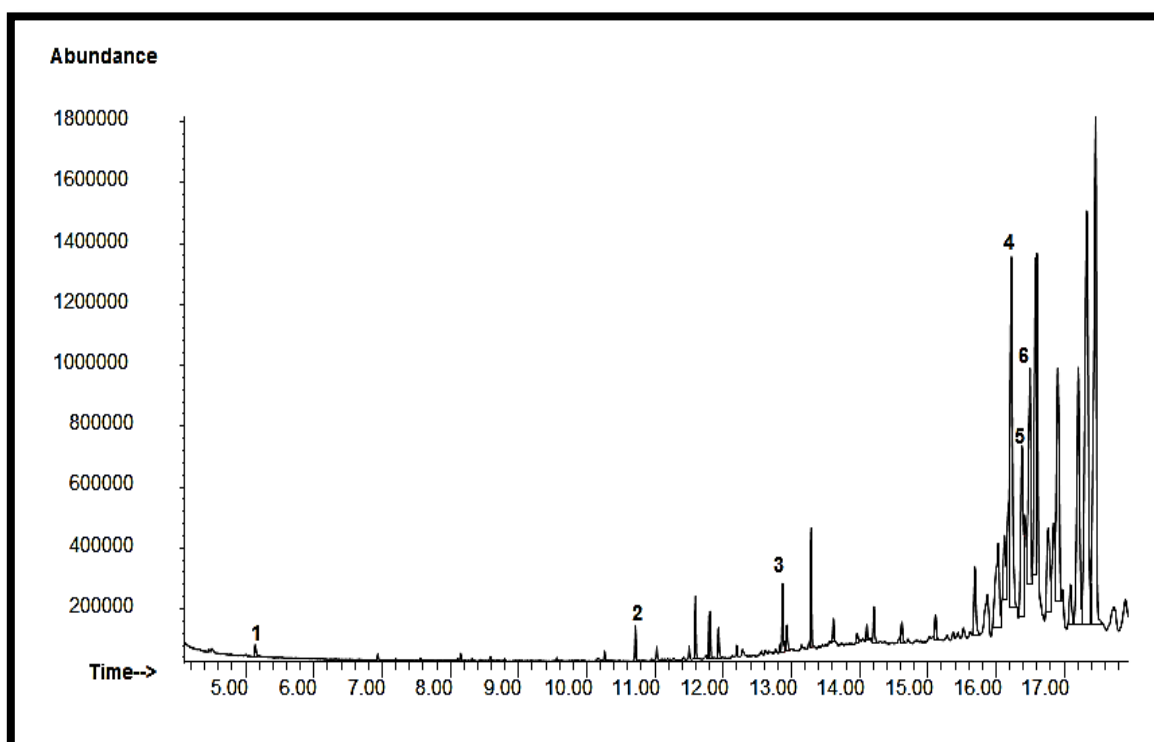


Figura 33. Cromatograma del EEP de Tlacotalpan, Veracruz.

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

Cuadro 28. Compuestos orgánicos identificados en los ocho EEP.

COMPUESTO	ABUNDANCIA PORCENTUAL							
	TR (min)	CI	EO	VC	TS	SJI	T 12	TL
Ácidos grasos								
Ácido palmítico	10.147	*	1.89	*	*	1.15	*	*
Palmitato de etilo	10.259	0.45	*	*	1.68	*	0.62	*
Ácido vaccénico	10.948	*	*	0.84	*	*	4.97	*
Ácido oleico	11.025	*	0.58	*	0.95	*	1.40	*
Ácido esteárico	11.031	*	0.52	*	*	*	*	*
Ácido laúrico	7.897	*	*	*	0.45	4.40	1.25	*
Hexadecanal	10.408	*	0.35	*	*	*	*	*
Metil éster del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico	10.978	*	0.48	*		*	*	*
Éster etílico del ácido oleico	11.037	0.47	*	*	5.37	*	*	*
Alcoholes								
Alcohol feniletílico	4.265	*	3.18	*	*	*	*	
1-Nonadecanol	10.687	*	*	*	*	*	0.93	
Cetonas								
1-(3-aminopropil)azaciotridecan-2-ona	13.298	2.6	*	*	*	*	*	*
Cardamonina	12.111	*	10.2	*	10.5			
Flavonoides								
Pinocembrina	12.450	58.5	22.7	3.78	7.61	*	*	*
Sakuranetina	13.370	*	2.2	*	*	*	*	*
Tectocrisina	12.800	9.6	12.0	*	*	*	*	*
3,5,7,4'-Tetrametoxiquercetina	14.847	*	*	*	0.36	*	*	*
Fenoles								
2-Metoxi-4-vinilfenol	6.087	*	3.0	*	*	*	*	*
Ferruginol	11.809	*	*	*	*	*	*	0.46
3-Pentadecilfenol	12.283	*	0.7	*	*	*	*	*
Hidrocarburos								
1,19-Eicosadieno	11.263	*	0.4	*	*	*	*	*
Eicosano	13.263	*	*	*	0.73	*	*	*
4,8a-dimetil-6-(1-metileténil)-3,5,6,7,8,8a-hexahidro-2(1H)-Naftalenona	16.385	*	*	*	*	*	*	5.19
(1E)-1-etiliden-7a-metiloctahidro-1H-indeno	8.592	*	1.07	*	0.47	*	*	*
Escualeno	13.293	*	*	*	*	*	*	1.42

CI: Cuautitlán Izcalli; **EO:** El Oro; **VC:** Villa del Carbón; **TS:** Tlalpujahua-Senguio; **SJI:** San José Iturbide; **T12:** Tianguismanalco 2012; **TL:** Tlacotalpan.

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

Cuadro 28. Compuestos orgánicos identificados en los ocho EEP (continuación...)

COMPUESTO	ABUNDANCIA PORCENTUAL							
	TR (min)	CI	EO	VC	TS	SJI	T 12	TL
Terpenos								
Esclareno	11.957	*	*	*	27.1	*	*	*
Geranilgeraniol	14.580	*	*	*	*	*	17.8	*
Verbenona	5.132	*	*	*	*	*	*	0.21
Borneol	4.710	*	*	1.97	*	*	*	*
Amorfenol	8.206	*	0.25	*	*	*	*	*
β -cadineno	8.449	*	0.36	*	*	*	*	*
Selineno	12.432	*	*	*	*	5.02	*	*
Aromadendreno	10.319	*	*	*	15.8	0.33	*	*
1,1,7- Trimetildecahidroespiro[ciclopropa[e]azuleno- 4,2'-oxirano]	12.159	*	*	*	0.72	*	*	*
Cicloartenol	16.504	*	*	*	*	*	*	6.0
Lupenona	16.011	*	*	*	4.15	*	15.7	*
α -Amirina	16.213	*	*	*	*	*	12.7	*
12-Oleaneno	16.231	*	*	*	*	*	*	9.8
Taraxasterol	16.361	*	*	1.48	*	*	*	*
Lupeol	16.533	*	*	*	*	*	16.3	*

CI: Cuautitlán Izcalli; **EO:** El Oro; **VC:** Villa del Carbón; **TS:** Talpujahuá-Sengio; **SJI:** San José Iturbide; **T12:** Tianguismanalco 2012; **TL:** Tlacotalpan.

En el Anexo 8 se presenta la estructura química, fórmula química y las propiedades más relevantes de cada compuesto.

El resumen de los resultados obtenidos de la concentración de compuestos fenólicos, propiedades antioxidantes, CG-EM y actividad antibacteriana, se muestran en el Cuadro 29.

Cuadro 29. Resultados del contenido de fenoles y flavonoides, propiedades antioxidantes, actividad antimicrobiana y CG-EM de los ocho propóleos estudiados.

Lugar de procedencia	Fenoles (%)	Flavonoides (%)	CA ₅₀ (µg/mL)	Índ. oxidación UV-VIS (s)	CG-EM	S. aureus		E. coli		C. albicans	
						CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Cuautitlán Izcalli	19.2 ± 2.90	4.04 ± 9.7	86.6	140	Pinocembrina (58.48%) Tectocrisina (9.55%)	0.19	0.37	3.75	15	0.75	1.5
Villa del Carbón	6.9 ± 0.0008	0.67 ± 1.8	52.6	230	Pinocembrina (3.78%)	0.46	0.93	7.5	30	24	>24
El Oro	6.4 ± 0.0029	1.94 ± 2.4	48.0	123	Pinocembrina (22.67%) Tectocrisina (11.95%) Cardamonina (10.23%)	0.93	1.87	7.5	30	1.8	7.5
Tlalpujahua-Senguio	18.3 ± 0.0027	2.87±2.6	26	247	Esclareno (27.06%) Aromadendreno (15.75%) Cardamonina (10.53%)	0.37	0.75	7.5	30	0.75	3.0

Cuadro 29. Resultados del contenido de fenoles y flavonoides, propiedades antioxidantes, actividad antimicrobiana y CG-EM de los ocho propóleos estudiados (continuación).

Lugar de procedencia	Fenoles (%)	Flavonoides (%)	CA ₅₀ (µg/mL)	Índ. oxidación UV-VIS (s)	CG-EM	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
						CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMF (mg/mL)
San José Iturbide	5.2 ± 0.0013	0.99 ± 0.7	83.5	> 420	Selineno (5.02%) Ácido láurico (4.4%)	0.46	0.93	3.75	15	12	24
Tianguismanalco 2010 – 2011	5.0 ± 0.0013	0.34±0.5	189.3	> 420	No identificado	30	> 30	15	30	7.5	30
Tianguismanalco 2012	4.0 ± 0.0016	0.29±0.4	277.9	> 420	Geranilgeraniol (17.85%) Lupeol (16.31%) Lupenona (15.7%) α-amirina (12.67%)	15	30	15	>30	3.75	15
Tlacotalpan	1.2 ± 0.0002	0.51±0.5	950.4	> 420	12-Oleaneno (9.76%) Cicloartenol (5.98%)	30	> 30	15	30	15	30

7.0 DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue establecer los criterios de constatación y de calidad que deben cumplir los propóleos y sus extractos para la comercialización, importación y su uso en el territorio nacional y que sea de utilidad para establecer una Norma Oficial Mexicana.

Las muestras de propóleos fueron provenientes de Cuautitlán Izcalli, El Oro y Villa del Carbón (Estado de México), Tianguismanalco (Puebla), San José Iturbide (Guanajuato), Tlalpujahua-Senguio (Michoacán) y Tlacotalpan, Veracruz.

El propóleo en bruto fue manejado para convertirlo en extracto, siendo el propóleo de mejor **rendimiento (50.9%)** el de Cuautitlán Izcalli, debido a que se tiene un mejor control en el manejo de las colmenas y en el método de recolección, además de que se trabajó inmediatamente, lo que evitó la oxidación de las resinas presentes.

Se dice que una sustancia tiene **propiedades antioxidantes** cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de una entidad molecular inestable, *los radicales libres*, sin perder su propia estabilidad electroquímica. Los radicales libres no sólo dañan las membranas de las células, sino que llegan a destruir y mutar la información genética de las células (ácidos nucleicos), facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades (Fernández, 2011).

Quiñones *et al.* (2012) mencionan que flavonoides como la catequina o la quercetina pueden directamente neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS), como el O_2^- , el H_2O_2 o el HClO. La quercetina y la miricetina son los flavonoides que poseen mayor actividad neutralizadora de radicales libres. El grupo fenólico que poseen puede actuar directamente capturando electrones desapareados de las ROS, y genera así especies menos reactivas.

Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones, y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados. Además, flavonoles como la quercetina pueden quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando así la formación de las ROS producidas por la reacción de Fenton (Figura 34) (Quiñones, 2012).



Figura 34. Reacción de Fenton: quelación de hierro por flavonoides.

La mayor o menor actividad, no siempre va aparejada con la concentración de polifenoles, cuando se evalúa la capacidad de secuestro de radicales libres no siempre es importante el contenido de polifenoles sino más bien la posición del grupo hidroxilo (Zavaleta *et al.*, 2005).

En nuestro trabajo, el propóleo de Michoacán presenta la mayor actividad antioxidante (26 µg/mL) pero no la mayor cantidad de fenoles ni de flavonoides. Por el contrario, los propóleos de Puebla 2012 (277.9 µg/mL) y Veracruz (950.4 µg/mL) presentaron la menor actividad antioxidante y menor cantidad de fenoles (4.0 y 1.2 % respectivamente).

Una de las propiedades más importante del propóleos es su **actividad antimicrobiana** para el tratamiento de infecciones en seres humanos y animales, las cuales están determinadas por la presencia de fenoles y flavonoides, compuestos que predominaron en los propóleos del estado de México.

Esta actividad se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides pinocembrina, galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, éster bencil del ácido p-cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeíco (García *et al.*, 2007).

Los extractos de propóleos se han evaluado frente a microorganismo de referencia, Gram positivas como el *Staphylococcus aureus*, Gram negativas como *Escherichia coli* y levaduras como *Candida albicans*.

El género *Staphylococcus* es representante de bacterias patógenas Gram positivas, considerada como comensal de la piel y causante de muchas infecciones entre ellas las del aparato respiratorio. Algunas cepas de *S. aureus*, denominadas epidémicas, tienen la capacidad de distribuirse de manera exitosa dentro de los hospitales y causar infecciones serias en los pacientes (Ortega, 2010). El fenotipo que se ha visto asociado más frecuentemente con esta resistencia en el hospital es el de resistencia a metilicina. La gran mayoría de los SAMR no sólo son resistentes a todos los β-lactámicos, sino también a múltiples antibióticos (Velázquez, 2005).

En el caso de *Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son inofensivas. Sin embargo, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) serotipo O157: H7, es el más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos (OMS, 2011).

Candida albicans es componente habitual de la microbiota cutánea, tracto gastrointestinal y genital. Del 2 al 15% de los enfermos colonizados desarrollan candidiasis diseminada. Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves. La

mayoría de estas infecciones se originan de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) aunque no se descarta la participación de fuentes externas.

La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *C. albicans* observándose un porcentaje mayor por el serotipo B. Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune.

Los casos registrados de candidosis muestran que el sexo no influye en la frecuencia, a excepción de la candidosis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección. Estas infecciones representan un importante problema clínico-epidemiológico en las unidades de cuidados intensivos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos. En la población pediátrica ocupan el 2° lugar en fallecimientos entre todas las causas de sepsis (Cantón y Viudes, 2001).

Estudios con propóleos mexicanos han demostrado actividad contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, reportando una CMI de < 0.125 mg/mL (Londoño, 2010) y para bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* se reportó una CMI de \geq 0.45 mg/mL (Martínez, 2010) y *Pasteurella multocida* una CMI de \geq 0.3 mg/mL (Gutiérrez, 2011).

Nuestros resultados confirman aquellos que en la literatura enfatizan la baja sensibilidad de las especies Gram negativas comparadas con las Gram positivas. La bacteria *E. coli* requiere concentraciones más elevadas de EEP que lo necesario para inhibir *S. aureus*. El propóleo de mayor actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli* fue el de Cuautitlán Izcalli con una CMI de 1.9 mg/mL y 3.75 mg/mL, respectivamente.

Estudios realizados con propóleos mexicanos han demostrado actividad antimicótica en contra de las levaduras como *Candida albicans*, encontrando que el efecto fue fungistático a concentraciones superiores a 0.6 mg/mL y el efecto fungicida fue 2.4 mg/mL (Quintero *et al.*, 2008).

Otro estudio reporta que la CMI fue de 0.25 mg/mL y la CMF fue de 0.5 mg/mL observando la inducción de la inhibición del tubo germinativo, impidiendo la transición de levadura a micelio, cambios en la pared celular de las levaduras, con sitios de gemación irregulares y perturbación de la división resultando en defectos en la textura de la pared de las células hijas (Londoño *et al.*, 2010).

El propóleo de Cuautitlán Izcalli tuvo una CMI de 0.75 mg/ mL y una CMF de 1.5 mg/mL, siendo el mejor propóleo para el tratamiento contra esta levadura.

Los principales **flavonoides** detectados fueron **pinocembrina** y **tectocrisina**; el primero uno de los flavonoides más importantes aislados de una gran variedad de plantas (Figura 35).

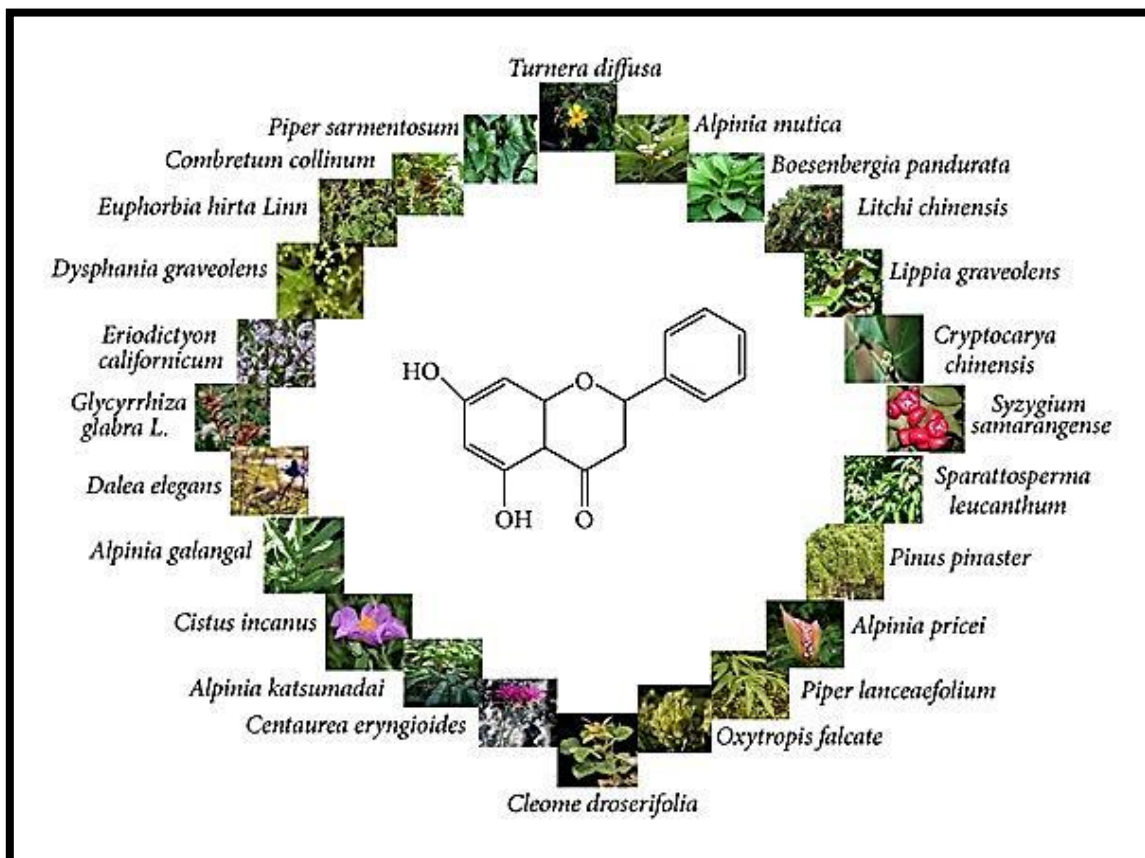


Figura 35. Estructura química y principales fuentes naturales de pinocembrina (Rasul et al., 2013).

Debido a sus amplias actividades farmacológicas (Anexo 8), la pinocembrina es un candidato farmacológico potencialmente prometedor, pero son necesarios estudios adicionales y ensayos clínicos para determinar sus sitios intracelulares específicos de acción y objetivos derivados con el fin de validar sus aplicaciones médicas (Rasul et al., 2013).

Es necesario destacar que el contenido de flavonoides en los productos elaborados a base de propóleo varían mucho, así como la actividad antimicrobiana hacia bacterias Gram positivas y levaduras. Es por ello que se requiere un análisis cromatográfico y determinar su actividad antimicrobiana, para establecer si el producto que se encuentra disponible en el mercado tiene dichas propiedades.

La *pinocembrina* se encontró en los propóleos de Cuautitlán Izcalli (58.48%), Villa del Carbón (3.78%) y El Oro (22.67%) como compuesto mayoritario. La *tectocrisina* se identificó únicamente en los propóleos de Cuautitlán Izcalli (9.55%) y de El Oro (11.95%).

La pinocembrina es una flavanona, siendo de los principales flavonoides aislados de una gran variedad de plantas y la *tectocrisina* es una flavona metilada con gran potencial antioxidante pues se ha demostrado la supresión de especies reactivas de oxígeno, así como su actividad antibacteriana (Figura 36) (Rasul *et al.*, 2013).

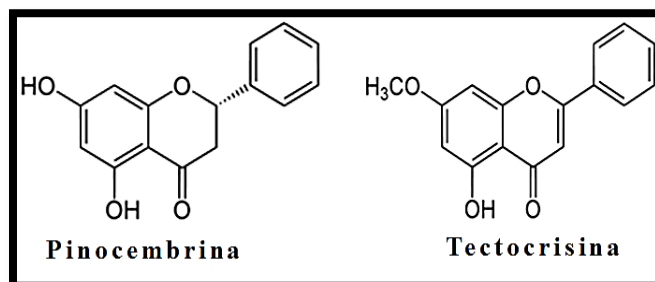


Figura 36. Compuestos identificados en los propóleos del Estado de México.

Para la muestra de Cuautitlán Izcalli se observa que presenta la mayor cantidad de fenoles (19.2%) y de flavonoides (4.04%) siendo la pinocembrina el compuesto mayoritario, lo que se relaciona con los resultados obtenidos para CMI y CMB al ser el mejor propóleo contra los microorganismos estudiados.

El propóleo de Villa del Carbón presenta bajas cantidades de fenoles (6.9%) y flavonoides (0.67%), identificando solo pinocembrina (3.78%) y terpenos, ambos poseen actividad antimicrobiana, pero solo se logró la acción contra *S. aureus* (CMI de 0.46 mg/mL y CMB de 0.93 mg/mL), el efecto bactericida para *E. coli* y *C. albicans* requiere concentraciones mayores a 20 mg/mL, de acuerdo a los resultados obtenidos por la microtécnica de dilución en caldo.

El propóleo de El Oro tuvo un 1.94% de flavonoides, que corresponden a pinocembrina y tectocrisina. La cantidad de fenoles fue de 6.4% y el compuestos con esta característica en su estructura es la cardamonina (10.23%), alcohol fenilético (3.18%) y el 2-metoxi-4-vinilfenol (3.0%).

Estos compuestos con estructuras fenólicas le proporciona la característica antioxidante y la presencia de actividad bacteriostática frente a *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*. Sin embargo, no presenta actividad bactericida para *E. coli* en mínimas concentraciones.

El propóleo del estado de Michoacán presentó como compuestos mayoritarios (Figura 37) al *esclareno* (27%), un diterpeno muy común en la resina de *Pinaceae*; al *aromadendreno*, en un 15.75%, un sesquiterpeno que utilizan las plantas como mecanismo de defensa contra

microorganismos y en un 10.53% se identificó una chalcona conocida como *cardamonina* con actividad antibacteriana y pinocebrina (7.61%) (Pubchem; Cho, 2009; Mulyaningsih, 2010).

Estos compuestos le confieren la mejor actividad antioxidante de todos los propóleos analizados, ya que sus valores de CA₅₀ fueron los más bajos (26 µg/mL), pero solo presentó actividad contra *S. aureus*.

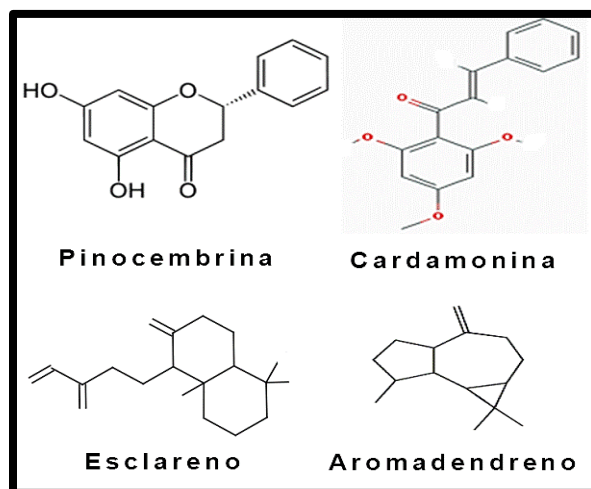


Figura 37. Compuestos identificados en el propóleo de Tlalpujahua-Senguio, Michoacán.

En el propóleo del estado de Guanajuato se identificó *selineno* (5.02%) y ácido láurico (4.40%) (Figura 38). El primero, un sesquiterpene con actividad antibacteriana contra *S. aureus* y el segundo con propiedades antimicrobianas (inhibe la expresión de factores de virulencia en *S. aureus*) y antivirales (Mora, 2003; Pino *et al.*, 2009).

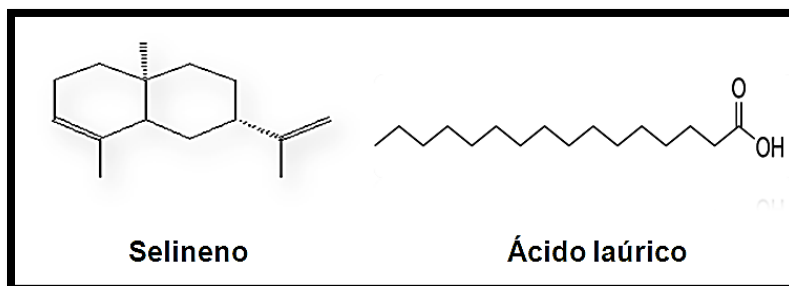


Figura 38. Compuestos identificados en el propóleo de San José Iturbide, Guanajuato.

Los compuestos encontrados en el propóleo del estado de Puebla, cosecha 2012, fueron terpenos como el *geranilgeraniol* (17.85%) un isoprenoide con actividad antibacteriana (Inoue *et al.*, 2005; Gallo & Sarachine, 2009; Menna *et al.*, 2008; Giriwono *et al.*, 2013), *lupeol* (16.31%) y *lupenona* (12.70%) ambos con actividades antiprotozoarias, antimicrobianas, antiinflamatorias, antitumorales, quimio preventivas y analgésicas de amplio espectro (Figura 39) (Saleem *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2013).

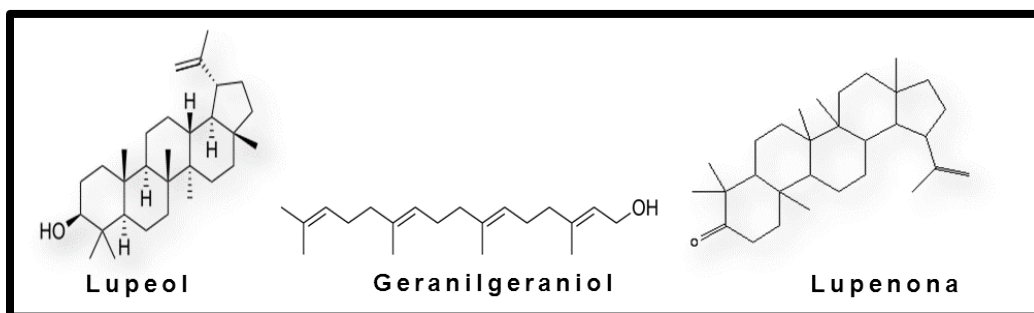


Figura 39. Compuestos identificados en el propóleo de Tianguismanalco 2012, Puebla.

En el propóleo del estado de Veracruz, predominaron dos compuestos, el 12-oleaneno (9.76%) y el *cicloartenol* (5.9%) ambos triterpenos pentacíclicos involucrados en la biosíntesis de otros estanoles y esteroides (Figura 40) (National Institute of Standards and Technology, 2011).

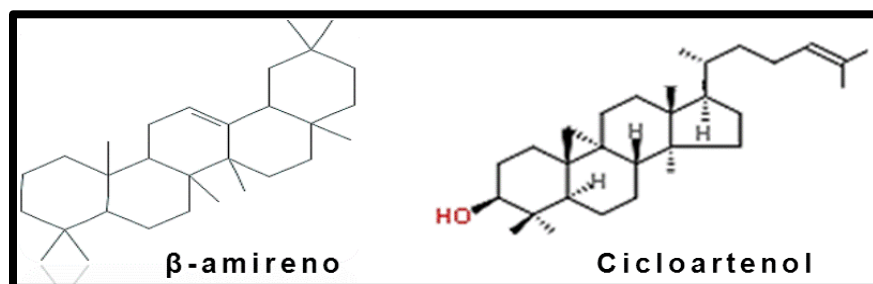


Figura 40. Compuestos identificados en el propóleo de Tlacotalpan, Veracruz.

Los propóleos de Puebla y Veracruz tuvieron una disminuida actividad antimicrobiana debido a que presentan <5% de compuestos fenólicos y <1% de flavonoides, lo cual se corrobora con los resultados de la CG-EM que identificó terpenos, ácidos grasos, alcoholes y fenoles pero en concentraciones mínimas. Los cromatogramas evidencian que no existen similitudes en los perfiles químicos de los extractos; estas diferencias, como se mencionó previamente, se presentan como resultado de las diferencias en la vegetación circundante a los apiarios.

En general, la identificación a partir del análisis de los espectros de masas (Cuadro 28), y en una mezcla compleja como el propóleo, puede resultar una tarea ardua debido al número de isómeros y la presencia de diferencias mínimas en los espectros de los constituyentes. Se detectaron en los propóleos estudiados más de 50 constituyentes, destacándose la presencia de ácidos grasos y sus ésteres, alcoholes, fenoles, cetonas, flavonoides, hidrocarburos, triterpenos pentacíclicos y diterpenos.

El contenido de fenoles y flavonoides (compuestos farmacológicamente activos) en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material, como su potencial de actividad

biológica; normatividades de otros países como Argentina y Brasil establecen valores de estos compuestos con el fin de definir requisitos mínimos de calidad.

Los compuestos fenólicos, entre los cuales se incluyen los flavonoides, representan un índice inequívoco de la calidad del producto final. Cuanto mayor sea el porcentaje de estas fracciones, mayor será también la pureza y calidad del propóleo (Palomino *et al.*, 2010).

Se han realizado diversas investigaciones sobre los propóleos mexicanos que incluyen desde los efectos estacionales en la composición química del propóleo hasta la búsqueda de nuevos componentes y diversas aplicaciones en la industria, como se menciona a continuación.

Valencia *et al.*, (2012) evaluaron el efecto estacional sobre la composición química y la actividad biológica (antiproliferativo y actividades antioxidantes) de propóleos de Sonora. Sin observar diferencias significativas.

Tolosa & Cañizares (2002) estudiaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y acuosos de propóleos de Campeche frente a *S. aureus*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* y *S. pyogenes*. La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos oscilo entre 0.93 a 3.75 mg/mL, en los extractos acuosos fue de 7.5 a 15 mg/mL. La especie bacteriana más sensible resultó ser la *P. aeruginosa* (0.93 a 3.75 mg/mL) y la *S. typhi* la menos sensible (3.75 a 7.5 mg/mL).

Velázquez *et al.*, (2007) evaluaron la actividad antibacterial de un extracto metanólico de Sonora contra *S. aureus* (ATCC 6538P), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *E. coli* (ATCC 25922) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 27853) y su actividad antioxidante. Sus resultados muestran que presentan buena actividad contra *S. aureus* con una CMI de 100 µg/mL y actividad antioxidante (90.4%).

Carrillo *et al.*, (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y acuosos de propóleos de la Huasteca Potosina frente a *E. coli*, *S. typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. agalactiae*. La CBM del extracto etanólico fue 0.93 mg/mL para las Gram positivas y 7.5 mg/mL para las Gram negativas; en el extracto acuoso fue 20 mg/mL para Gram positivas y 30 mg/mL para Gram negativas.

León (2012) estudió un propóleo del Distrito Federal utilizando técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas; aisló e identificó acacetina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina, los cuales probó frente a *S. mutans* y *P. gingivalis* con CMI para acacetina y 4',7-dimetilnaringenina de 250 µg/mL y 500 µg/mL, respectivamente. Para la 4',7-dimetilapigenina la CMI de 1000 µg/mL para ambas bacterias. Concluyendo una actividad moderada sobre estas cepas.

Guerrero (2013) realizó el estudio químico del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas. Aisló flavonoides (1.6%) y diterpenos labdánicos (4.6%) que presentan actividad biológica, aportando información a los apicultores para el uso del propóleo en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Lotti *et al.*, (2010) analizaron propóleos de Yucatán utilizando Resonancia Magnética Nuclear-2D y Espectrometría de masas de ionización por electrospray. Aislaron tres nuevos componentes, 1-(3',4'-dihidroxi-2'-metoxifenil)-3-(fenil) propano, (Z)-1-2'-metoxi-4'5'-dihidroxifenil)-2-(3-fenil) propeno y 3-hidroxi-5,6-dimetoxiflavan, junto con flavanonas, isoflavonas y pterocarpanos

Dos nuevos fenilalilflavanonas, (2R, 3R) -6 [1 (4'-hidroxi-3'-metoxifenil) prop-2-en-1-il] pinobanksina (1) y (2R, 3R) -6 [1-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil) prop-2-en-1-il] pinobanksina 3-acetato (2) se aislaron de un extracto metanólico de un propóleo de Sonora, los cuales presentaron actividad citotóxica contra cáncer pancreático con la concentración de 17.9 M y 9.1 M, respectivamente, a la que 50% de las células murieron (Li *et al.*, 2011).

Vargas *et al.* (2014) estudiaron un extracto de propóleo natural y comercial para establecer su eficacia como antioxidante natural y aditivo en alimentos (antimicrobial). Encontraron quercetina, pinocebrina y kaempferol que le confieren propiedades antimicrobianas y ofrece posibilidades para la aplicación del propóleo en la prevención del deterioro oxidativo de alimentos.

El conocimiento de la composición química se considera un aspecto muy importante, ya que permite correlacionar su composición química con la actividad biológica de los mismos.

La importancia de estandarizar los propóleos según sus metabolitos ha cobrado importancia con el transcurso del tiempo. Las tendencias más actuales en la investigación de los propóleos van dirigidas al desarrollo de estudios biológicos con muestras caracterizadas químicamente, bioensayos realizados con principios activos aislados de los extractos, así como estudios biológicos comparativos de propóleos de diferente composición química y origen geográfico.

Por lo tanto, con estos resultados se pueden **proponer las pruebas mínimas necesarias para establecer los criterios de constatación y de calidad** que deben cumplir los propóleos y sus extractos para su uso en medicina veterinaria y medicina humana. Así mismo serán de utilidad para la comercialización, importación y su uso en el territorio nacional, en base a la normatividad establecida por países latinoamericanos como Brasil, Cuba, Argentina y El Salvador.

8.0 CONCLUSIONES

- México es un país que por su extensión geográfica ofrece una gran variedad de especies botánicas que dependen de la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, entre otras condiciones geográficas, lo que implica una variación en la composición química de los propóleos estudiados.
- La emergencia de microorganismos resistentes a antibióticos, tanto en el hombre como en los animales, hace necesario desarrollar tratamientos alternativos para prevenir el riesgo de infección por microorganismos resistentes, de alto riesgo para la salud pública.
- Los propóleos presentaron diferentes características organolépticas, químicas y antimicrobianas.
- Las muestras con niveles altos de fenoles y flavonoides fueron las provenientes del Estado de México y Michoacán, presentando mejores propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.
- Los propóleos de Puebla, Guanajuato y Veracruz presentaron niveles bajos de fenoles y flavonoides, como consecuencia esto provoca una disminución en sus propiedades antioxidantes y actividad antibacteriana como lo mostraron los resultados obtenidos.
- El método visual para la determinación del índice de oxidación es un método que requiere la percepción visual y el resultado puede ser muy subjetivo, por lo que se implementó un método espectrofotométrico (espectrofotometría UV-VIS) para resultados más precisos y confiables.
- Se presentó la **Propuesta para el acuerdo por el que se establecen las determinaciones para la constatación y control de calidad del propóleo** en la Reunión Ordinaria del Comité de Salud y Producción Apícola realizada en Julio del 2014 en las instalaciones de SAGARPA para analizar la posible integración de un Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana para determinar la calidad de los propóleos.



Dr. Francisco Suárez Güemez
Presidente del Consejo Consultivo Nacional de Salud Animal
PRESENTE

Por este conducto hacemos de su conocimiento el siguiente documento como parte de la:

**PROPUESTA PARA EL ACUERDO POR EL QUE SE ESTABLECEN LAS PRUEBAS
ANALÍTICAS PARA LA CONSTATACIÓN Y CALIDAD DEL PROPÓLEO**

Agradecemos su atención a la presente.

Atentamente

Miembros y entidades participantes

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

- Dr. Tonatíuh Alejandro Cruz Sánchez
- QFB Betsabé Rodríguez Pérez
- M en A. Liborio Carrillo Miranda
- Dr. José Guillermo Penieres Carrillo
- MVZ Raúl García Tinajero

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. María Margarita Canales Martínez.

Universidad Autónoma de Campeche. Dr. Luis Roberto Martínez Pérez de Ayala.

Organización Nacional de Apicultores. Ing. Porfirio Galindo Aguiar.

ccp Dra. Laura Espinosa Montaño, Coordinadora del Comité de Salud y Producción Apícola.

*Recibido
Dra. Laura B. Espinosa M.
Coordinadora del Comité
de Salud y Producción
Apícola
3/07/2014*

8.1 PROPUESTA PARA EL ACUERDO POR EL QUE SE ESTABLECEN LAS PRUEBAS ANALÍTICAS PARA LA CONSTATAción Y CALIDAD DEL PROPÓLEO.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

1.1 Establecer los criterios de constatación y de calidad que deben cumplir los propóleos y sus extractos para la comercialización, importación y su uso en el territorio nacional.

1.2 Este Acuerdo es aplicable a todos los propóleos producidos por las abejas (*Apis mellifera*), y a los extractos derivados de los propóleos.

1.3 Este Acuerdo se aplica tanto al propóleos en bruto como a los extractos.

2. REFERENCIAS

El presente acuerdo se complementa con las siguientes normas vigentes:

2.1 **Reglamento técnico para fijar la identidad y calidad de propóleos.** (Brasil)

2.2 **Normas IRAM-INTA 15935-1- 2008.** Parte 1: Propóleo en bruto. (Argentina)

2.3 **Normas IRAM-INTA 15935-2- 2008.** Parte 2. Extractos de propóleos. (Argentina)

2.4 **NRAG 1129.1994.** Extracto fluido y extracto blando. (Cuba)

2.5 **NSO.65.19.02:03.** Calidad de propóleo crudo. Diario oficial tomo N° 360. (El Salvador)

2.6 **RST-RSFSR-317-77.** Propóleos. Métodos analíticos para el control de su calidad. (Rusia)

3. DEFINICIONES

Propóleos en bruto.

Conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas de consistencia viscosa recogidas por las abejas *Apis mellifera* de algunas especies vegetales (pino, sauce, abedul, varias especies de álamo, fresno, roble y similares).

Extracto de propóleos.

Producto semielaborado que contiene básicamente propóleos, alcohol etílico y/o agua, que se obtiene procesando el propóleos con un solvente de manera de extraer los componentes biológicamente activos. Posteriormente, se evapora el solvente trabajando a una temperatura baja y controlada, de manera de no afectar los compuestos bioactivos, del que se pueden desarrollar una gran variedad de productos.

NOTA: En este documento solamente se describirán las pruebas mínimas necesarias para determinar la calidad del producto.

4. ESPECIFICACIONES

4.1 Características organolépticas.

Color. Amarillo, pardo, verdoso, marrón, rojizo y otros similares, variando conforme a su origen botánico.

Aroma. Característico de este producto: resinoso o balsámico, dependiendo de su origen botánico.

Sabor. Variable, de suave, balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.

Consistencia (a temperatura ambiente). Maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico.

4.2 Requisitos físico-químicos.

a) Cualitativos.

- Presencia de flavonoides.

b) Cuantitativos.

- Cuantificación de compuestos fenólicos.
- Cuantificación de flavonoides.
- Índice de oxidación.
- Actividad antioxidante.

4.3 Requisitos antimicrobianos

Inhibición de crecimiento: *Staphylococcus aureus*.

4.4 Pruebas complementarias.

a) Análisis cromatográfico

Identificación de compuestos fenólicos: quercetina, pinocembrina, naringenina, catequina, crisina, entre otros.

Una **aportación** de este proyecto es la **aprobación del anteproyecto de norma** denominado *“Propuesta para el acuerdo por el que se establecen las pruebas analíticas para la constatación y calidad del propóleo”* presentado ante el Comité de Salud y Producción Apícola de la SAGARPA y CONASA.

CONSEJO TÉCNICO
CONSULTIVO
NACIONAL DE
SANIDAD ANIMAL 

México, D.F., 25 de septiembre de 2014.

Dr. Tonatihu A. Cruz Sanchez
Presente

Con relación a la propuesta de elaborar un anteproyecto de norma de calidad de los propóleos, que tuvo a bien exponer al Comité de Salud y Producción Apícola y en particular al documento entregado al final de dicha reunión, me permito comunicarle lo siguiente:

En la pasada reunión del Comité se comentó que en su mayoría el documento reúne lo necesario para ser presentado como anteproyecto de norma; realizar una reunión para la discutir su contenido, como se había acordado, no sería necesario de momento, ya que las argumentaciones a favor o en contra de algún contenido, se podrían emitir y analizar durante el proceso de integración del Proyecto de Norma.

Por tal motivo, se acordó que la Coordinación General de Ganadería de la SAGARPA gestionará la inclusión del Anteproyecto de Norma en el Programa de Normalización 2015. Una vez que el Programa se publique en el Diario Oficial de la Federación, se deberá integrar el Grupo de Trabajo para elaborar la norma, en el cual esperamos contar con la participación de usted y de su equipo.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente


MVZ SALVADOR CAJERO AVELAR
Secretario del Comité

c.c.p. Dra. Laura Espinosa Montaño, Coordinadora del Comité, Presente.
Archivo.

PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

La Coordinación General de Ganadería de la SAGARPA informó que gestionará la inclusión del Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana en el Programa de Normalización 2015, una vez que dicho programa se publique en el Diario Oficial de la Federación, por tal razón es importante seguir realizando los trámites para el cumplimiento del objetivo de este trabajo.

Asimismo, se debe destacar la inclusión de pruebas analíticas para determinar la presencia de contaminantes en el propóleo, como son los metales pesados, incluyendo al plomo y arsénico.

Es importante realizar la difusión de las propiedades del propóleo, pero lo es más el dar a conocer que se requiere el control de calidad para la elaboración de productos de alta calidad a base de propóleo entre los involucrados con la actividad apícola como son apicultores, el sector público, el sector privado y la sociedad en general.

Por otro lado, es conveniente realizar investigaciones para determinar la forma de mejorar o incrementar la actividad biológica de propóleos que no contienen en su composición química flavonoides o compuestos fenólicos y evitar pérdidas económicas para la apicultura en México.

Dichas investigaciones pueden estar basadas en la Química Computacional que ha sido utilizada en los últimos tiempos para la modificación de moléculas químicas para la elaboración de nuevos productos farmacéuticos (Diseño de fármacos por computadora).

Iniciar las investigaciones para la implementación del control de calidad de otros productos derivados de la colmena como son polen, jalea real y veneno de abeja (apitoxinas) que también son utilizados en la medicina alternativa.

10. ANEXOS

Anexo 1. Prueba cualitativa de flavonoides

Fundamento

Para el aislamiento de flavonoides se recurre a la extracción con solventes de polaridad creciente o directamente con álcali, como el hidróxido de sodio; el material se purifica mediante extracciones repetidas y precipitaciones con acetato de plomo ya que separa los di- y polihidroxifenoles de los monohidroxilados, que quedan en solución (Marcano, 2002). En contacto con hidróxido de sodio se presenta un color amarillo intenso característico de flavonas y flavonoles.

Material

- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Embudos grandes y pequeños
- Papel filtro Whatman
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- Probeta graduada de 100 mL
- Pipetas graduadas de 10 mL

Reactivos

- Agua destilada
- Acetato de plomo
- Alcohol etílico
- Hidróxido de sodio

Preparación de reactivos

Acetato de plomo Pb (C₂H₃O₂)₂ al 10%. Pesar 5 g y disolver en 15 mL de agua destilada caliente, posteriormente aforar a 100 mL. Caducidad de 6 meses.

Hidróxido de sodio (NaOH) al 20%. Pesar 10 g y disolver en 25 mL de agua destilada. Agitar después de enfriar y aforar a 100 mL.

Procedimiento

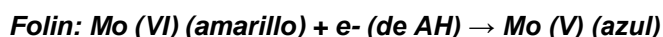
1. Pesar 200 mg de la muestra en crudo o EEP y añadir 5 mL de alcohol etílico.
2. Colocar la mezcla a baño María por 3 minutos, dejar enfriar la solución y filtrar por gravedad.
3. Tomar 1 mL del filtrado y añadir 10 mL de alcohol etílico y agitar cuidadosamente.
4. Añadir 1 mL de la solución preparada a dos tubos de ensaye marcados como a) y b).
5. Tubo a): añadir una gota de NaOH al 20% y observar un cambio de coloración que va del amarillo a naranja de acuerdo a la cantidad de flavonoides presentes.
6. Tubo b): añadir 500 µL (0.5 mL) de Pb (C₂H₃O₂)₂ al 10%, y esperar el cambio de coloración que va de un amarillo y la presencia de un precipitado.

Anexo 2. Compuestos fenólicos: Método de Folin-Ciocalteu

Fundamento

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{I}_3\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$. El método de Folin-Ciocalteu mide la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes.

El reactivo contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.



La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por g de muestra (Orozco, 2010).

Material

- Gradillas
- Micropipetas de volumen variable
- Puntas para micropipetas
- Piseta
- Pipeta graduada de 2 mL
- Espátula
- Espectrofotómetro UV- VIS
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 1000 mL
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- Vaso de precipitados de 50 mL
- Celdas de cuarzo
- Cronómetro
- Balanza analítica

Reactivos

- Agua destilada
- Estándar puro de ácido gálico
- Metanol, grado HPLC
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)

Preparación de reactivos

- *Solución stock de ácido gálico (0.2 mg/mL)*. Disolver 1 mg de ácido gálico en 5 mL de agua. Mantener en refrigeración.

- *Carbonato de sodio, Na₂CO₃ (200 g/L).* Disolver 200 g de carbonato de sodio anhidro en 700 mL de agua caliente. Dejar enfriar y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento

Curva de calibración.

- A partir de la solución stock, preparar las siguientes concentraciones 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL, como se indica en el Cuadro 30.

Preparación de las muestras.

- Preparar una solución estándar de 0.02 mg/mL de cada muestra de propóleo.

Curva de calibración

El *ácido gálico* es una molécula que por su estabilidad y estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo hidroxilo (Figura 41). Se utiliza como material de referencia o patrón para determinar el contenido de fenoles mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.

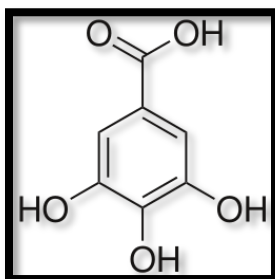


Figura 41. Estructura del ácido gálico.

En la Cuadro 30 se indican el rango de concentraciones preparadas y los sistemas que serán leídos en el espectrofotómetro.

Cuadro 30. Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.

	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6
Estándar ácido gálico (µL)	31.5	62.5	125	250	500	1000
Agua destilada (µL)	968.5	937.5	875	750	500	--
Concentración (mg /mL)	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
Dilución	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2	--

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

Al tener los sistemas anteriores preparados se procede de la siguiente manera:

1. Tomar 1 mL y se transfiere a un tubo de ensaye que contenga 6 mL de agua destilada.
2. Adicionar 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos, se observará un cambio de color a verde.
3. Adicionar 1.5 mL de Na_2CO_3 (200 g/L) y completar con agua destilada hasta un volumen de 10 ml, se observará un cambio de color a azul.
4. Esperar 2 horas a temperatura ambiente para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm.
5. Realizar la prueba por triplicado y considerar el promedio.
6. Con los resultados obtenidos se grafica la concentración del ácido gálico contra vs la absorbancia, realizar una análisis de regresión lineal e interpolar la absorbancia de la muestra a evaluar (Figura 42).
7. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o en porcentaje.

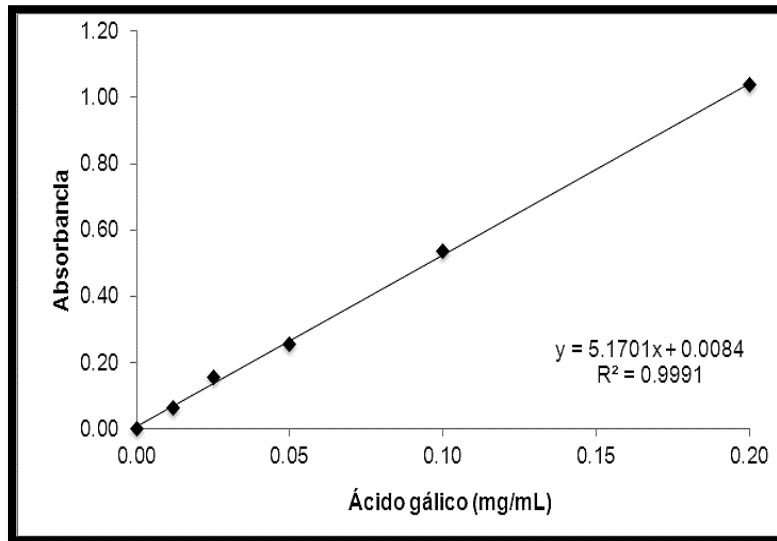


Figura 42. Curva de calibración de ácido gálico.

Anexo 3. Cuantificación de flavonoides

Fundamento

El principio básico es la formación de complejos estables de ácidos con el grupo ceto C-4 y/o del C-3 ó C-5 del grupo hidroxilo de las flavonas y flavonoles, así como complejos lábiles ácidos con los grupos *orto*-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides.

La quercetina (Figura 43) es la más adecuada para la construcción de la curva de calibración debido a sus propiedades antioxidantes (Kiranmai *et al.*, 2011).

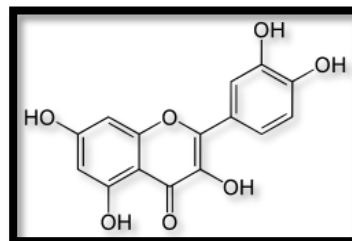


Figura 43. Estructura de la quercetina.

Material

- Gradillas
- Micropipetas de volumen variable
- Puntas para micropipetas
- Piseta
- Pipeta graduada de 2 mL
- Espátula
- Espectrofotómetro UV- VIS
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 1000 mL
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- Vaso de precipitados de 50 mL
- Celdas de cuarzo o placas de ELISA de fondo plano
- Cronómetro
- Balanza analítica

Reactivos

- Agua destilada
- Estándar puro de quercetina
- Cloruro de aluminio, $AlCl_3$
- Metanol, grado HPLC

Preparación de reactivos

- *Solución stock de quercetina (1 mg/mL).* Disolver 10 mg de quercetina en MeOH y aforar a 10 mL. Conservar en la oscuridad y refrigerada.
- *Cloruro de aluminio, $AlCl_3$ (2%).* Disolver 2 g de cloruro de aluminio en agua destilada y aforar a 100 mL, con mucho cuidado ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico.

Preparación de la curva de calibración.

- A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas como se muestran en el Cuadro 31.

Procedimiento

1. Adicionar a cada tubo 3 mL de $AlCl_3$ y esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción.
2. Calibrar el espectrofotómetro a 0 de absorbancia con MeOH a longitud de onda de 415 nm.

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

3. Graficar la concentración de quercetina vs absorbancia, realizar un análisis de regresión lineal e interpolar la absorbancia de la muestra a evaluar (Figura 44).
4. El contenido total de flavonoides se expresa como μg de equivalentes de quercetina/g de extracto.

Cuadro 31. Curva de calibración para cuantificación de flavonoides.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Stock de quercetina (μL)	MeOH (μL)
1	3	2997
2	6	2994
3	9	2991
4	12	2988
5	15	2985
6	18	2982
7	21	2979
8	24	2976
9	27	2973
10	30	2970
20	60	2940
30	90	2910
40	120	2880
50	150	2850
60	180	2820
70	210	2790
80	240	2760
90	270	2730

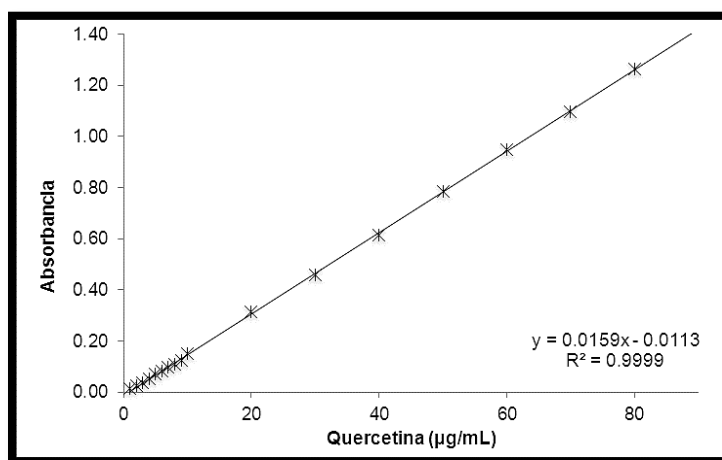


Figura 44. Curva de calibración de quercetina.

Anexo 4. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Fundamento

La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles (Figura 45). El nuevo radical formado (A) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas (Castañeda *et al.*, 2008).

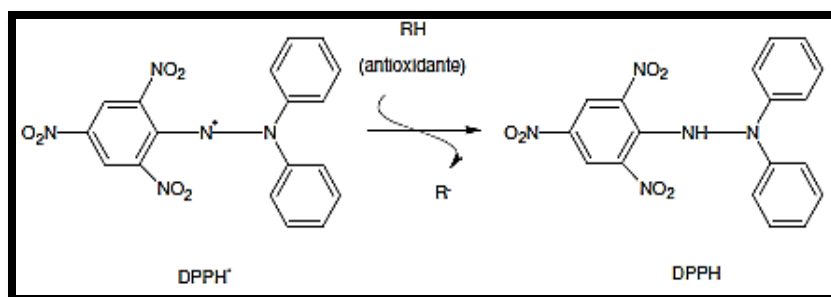


Figura 45. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Material

- Gradillas
- Micropipetas de volumen variable
- Puntas para micropipetas
- Piseta
- Pipeta graduada de 2 mL
- Espátula
- Espectrofotómetro UV- VIS
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 1000 mL
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm
- Vaso de precipitados de 50 mL
- Celdas de cuarzo
- Cronómetro
- Balanza analítica

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

Reactivos

- Agua destilada
- Estándar puro de quercetina
- Reactivo de DPPH
- Metanol, grado HPLC

Preparación de reactivos

- *Solución stock de quercetina (1 mg/mL)*. Disolver 10 mg de quercetina en 10 mL de MeOH grado HPLC. Conservar en la oscuridad y refrigerada.
- *Solución de DPPH (100 µM)*. Pesar 2 mg de reactivo de DPPH y aforar a 50 mL con MeOH grado HPLC.

Preparación de las muestras: Preparar una solución stock de 1 mg/mL utilizando MeOH grado HPLC.

Procedimiento

- Preparar los sistemas de acuerdo al Cuadro 32, en tubos de 13 x 100 mm.
- Proteger de la luz y dejar que se lleve a cabo la reacción por 30 minutos.
- Calibrar el espectrofotómetro UV-VIS con metanol a una longitud de onda de 517 nm.
- Determinar la absorbancia de cada tubo y del DPPH (100 µM), graficar la concentración (µg/mL) vs absorbancia para obtener la ecuación de la recta.
- Para obtener el % de reducción se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción} = \frac{\text{Absorbancia DPPH} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia DPPH}} \times 100\%$$

- Graficar la concentración (µg/mL) vs % reducción; la CA₅₀ se calcula interpolando en la gráfica.

Cuadro 32. Preparación de muestras para evaluar CA₅₀.

Concentración (µg/mL)	Muestra (µL)	MeOH (µL)
0	0	1000
1	4	1996
3	12	1988
5	20	980
10	40	960
20	80	920
40	160	840
60	240	760
80	320	680
100	400	600
120	480	520
140	560	440
160	640	360
180	720	280
200	800	200
250	1000	0

Anexo 5. Índice de oxidación por el método visual (tradicional)

Fundamento

El permanganato de potasio (KMnO_4) es un agente oxidante de color violeta intenso formado por iones potasio (K^+) y permanganato (MnO_4^-), que se vuelve incoloro al reducirse al catión Mn^{2+} en una solución ácida, a esta determinación se le denomina *índice de oxidación* y es evaluada de manera visual (Skoog *et al.*, 2005; Palomino, 2009; Solomons, 2004).

Procedimiento

1. Pesar 0.2 g de EEP y se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.
2. Añadir 5 mL de etanol, de modo que cubra la muestra y se deja **reposar una hora***.
3. Añadir 100 mL de agua destilada y agitar hasta homogeneizar la mezcla y filtrar a gravedad.
4. Tomar 10 mL de esta solución y aforar a 100 mL con agua destilada.
5. Tomar 2 mL de la solución diluida, y añadir 1 mL de ácido sulfúrico al 20% y agitar un minuto.
6. Añadir una gota de KMnO_4 de **concentración 0.1 N***, sin tocar las paredes.
7. Cronometrar y registrar el **tiempo en que tarda en desaparecer el color rosa**.
8. Reportar el promedio de las determinaciones en segundos (s).

**Nota. Parámetros a evaluar para realizar la adaptación al método espectrofotométrico.*

Anexo 6. Índice de oxidación por el método de espectrofotometría UV-VIS (Implementación de la técnica)

El método visual para la determinación del índice de oxidación es un método que requiere la percepción visual y el resultado puede ser muy subjetivo, por lo que se implementó un método espectrofotométrico (espectrofotometría UV-VIS) para resultados más precisos y confiables.

Material

- Matraz Erlenmeyer de 125 mL
- Embudo
- Papel filtro
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- Matraz aforado de 1000 mL
- Vaso de precipitados de 10 mL
- Varilla de vidrio de 3 mm de diámetro
- Cronómetro
- Agitador
- Pipetas graduadas de 2 y 5 mL

Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol etílico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Permanganato de potasio

Equipo

- Espectrofotómetro ultravioleta visible (modelo LAMBDA 18, PERKIN ELMER)

Condiciones del método

Determinación de la longitud de onda (λ) de máxima absorción para KMnO_4 .

Se realizaron barridos en el equipo a un intervalo de 300 a 800 nm, utilizando dos concentraciones diferentes de KMnO_4 . Para elegir la longitud de onda de trabajo, se obtuvo el espectro de absorción del KMnO_4 a partir de una concentración de 0.015 N. Determinando una longitud de onda de máxima absorción de 525 nm (Figura 46).

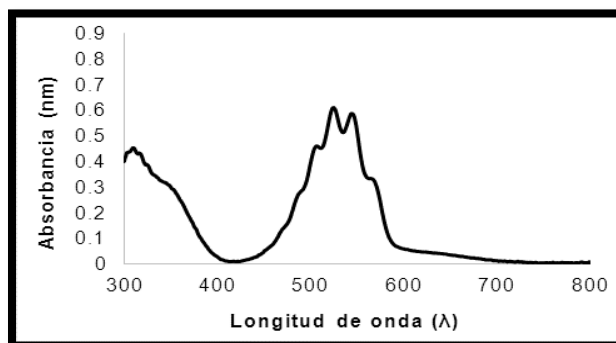


Figura 46. Espectro de absorción del KMnO_4 (barrido).

Determinación de la concentración óptima de $KMnO_4$

Con la finalidad de obtener lecturas de absorbancia un rango de 0.2 a 0.0, se utilizaron dos concentraciones de $KMnO_4$ [0.015 N] y [0.010 N] utilizando propóleo de Cuautitlán Izcalli por tener la mayor cantidad de compuestos fenólicos. Los espectros de absorbancia se muestran en la Figura 47.

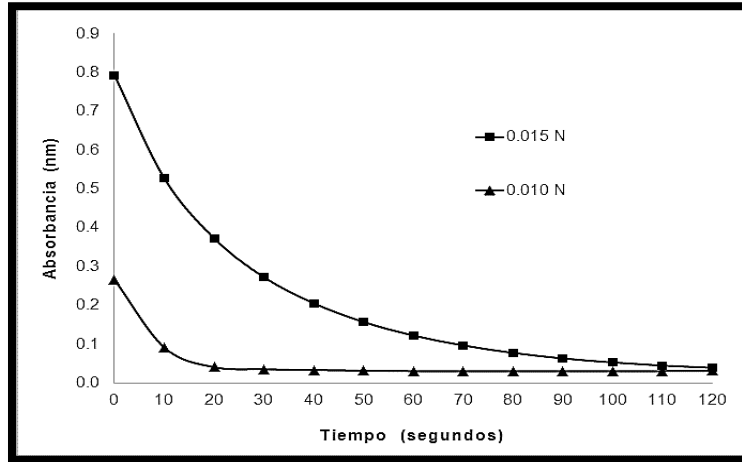


Figura 47. Comportamiento de absorbancias en función de la concentración de $KMnO_4$.

Tiempo de reposo

Se procesó la muestra de Cuautitlán Izcalli, por triplicado, evaluando el comportamiento de la absorbancia al dejar la muestra en reposo por una hora en alcohol etílico y cuando era procesada de manera inmediata. No existe variación en los resultados esperados como se observa en el espectro de absorbancia (Figura 48).

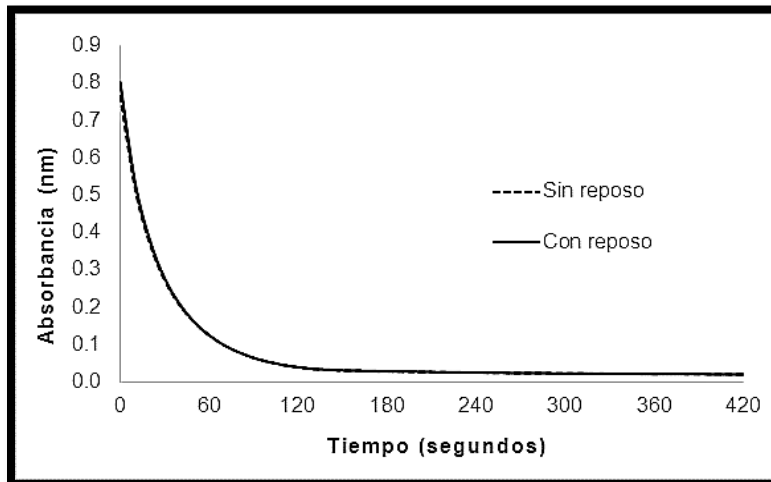


Figura 48. Comparación de tiempos de reposo antes de la determinación del índice de oxidación.

Procedimiento

1. Pesar 0.2 g de EEP en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y cubrir con 5 mL de alcohol etílico.
2. Adicionar 100 mL de agua destilada, agitar y filtrar a gravedad.
3. Tomar 10 mL de esta solución y aforar a 100 mL con agua destilada, de los cuales se toman 2 mL que se colocan en una celda de cuarzo.
4. Añadir 1 mL de KMnO_4 [0.015 N], aforado con H_2SO_4 al 20% (m/v).
5. Colocar la tapa de la celda y dar un giro para mezclar.
6. Realizar las lecturas por triplicado.

Índice de oxidación por el método visual (adaptación al método espectrofotométrico).

Procedimiento

1. Pesar 0.2 g de EEP en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y cubrir con 5 mL de alcohol etílico.
2. Adicionar 100 mL de agua destilada, agitar y filtrar a gravedad.
3. Tomar 10 mL de esta solución y aforar a 100 mL con agua destilada
4. En un vaso de precipitados de 10 mL, colocar 2 mL de la solución anterior y 1 mL de KMnO_4 [0.015 N] aforado con H_2SO_4 al 20% (m/v) y agitar con ayuda de una barra magnética.
5. Poner en marcha el cronómetro para verificar el tiempo que tarda en decolorarse el KMnO_4 .
6. Realizar las lecturas por triplicado.

Anexo 7. Microtécnica de dilución en caldo

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se utilizó la microtécnica de dilución en caldo (Koneman *et al.*, 1985).

Fundamento

Con este método se evalúa cuantitativamente la actividad antibacteriana de los extractos o compuestos puros; éstos se incorporan al caldo a diferentes concentraciones. Se determina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). La susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una placa estéril de 96 pocillos (placa de ELISA) colocando caldo Müeller-Hinton con la concentración del extracto o compuesto a evaluar en las concavidades apropiadas. Posteriormente se utilizan sales de tetrazolio para medir la actividad respiratoria (Figura 49) (McFaddin, 2003).

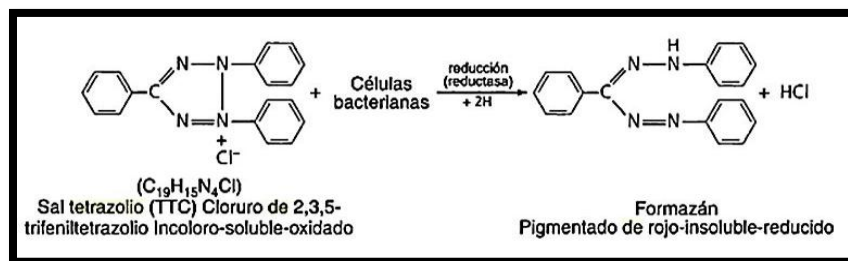


Figura 49. Reacción de reducción de una sal de tetrazolio.

Procedimiento

Preparación de reactivos.

- Estándar N° 0.5 de MacFarland: añadir 0.5 mL (500 µL) de sulfato de bario (BaSO₄) y aforar a 100 mL de H₂SO₄ [0.36 N].
- Azul de tetrazolio (TTC) 0.08%: Pesar 0.08 g y disolver en 100 mL de agua destilada.

Preparación de medios de cultivo. De acuerdo al proveedor.

Preparación de la suspensión.

- Realizar pruebas de identificación de la cepa de referencia ATCC antes de realizar la suspensión.
- Tomar una asada de las colonias sembradas previamente en AST o SDA.
- El tubo de cultivo se incubó a 35°C/24 horas, en caso de levaduras se incubó 48 horas utilizando caldo Sabouraud.
- Pasado este tiempo, se prepara la suspensión a una concentración de aproximadamente 1.5 x 10⁸ UFC/mL, equivalente en turbidez al estándar N° 0.5 de MacFarland.
- La comparación de la turbidez se realiza a 640 nm en el espectrofotómetro.

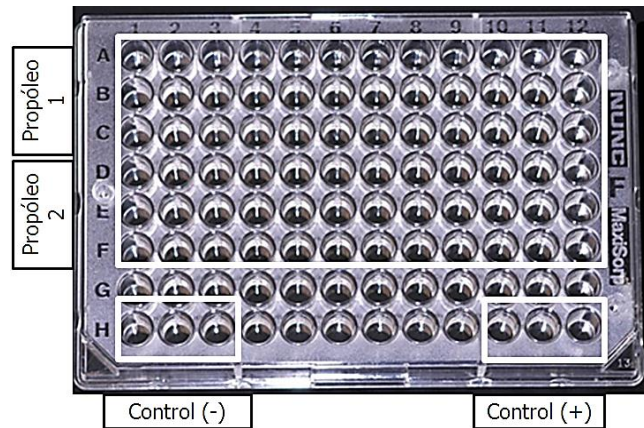
QFB Betsabé Rodríguez Pérez

Stock de extracto etanólico de propóleo.

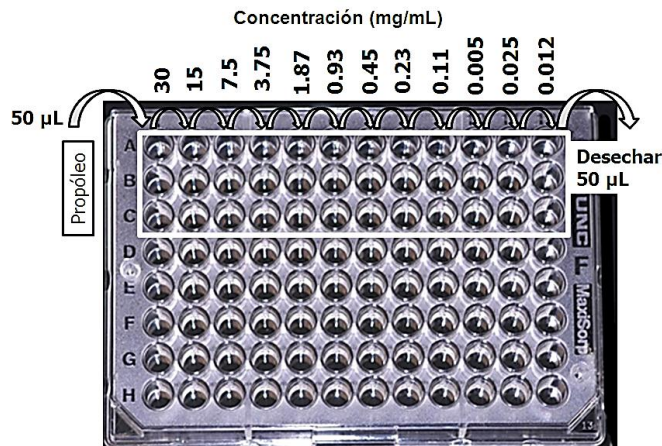
- Pesar 15 mg y disolver 1 mL de etanol para obtener una concentración de 15 mg/mL.
- Tomar 100 μ L del stock y añadir a un tubo que contenga 1 mL de caldo MH para una concentración final de 1.5 mg/mL (Solución A).

Preparación de la microplaca.

- Utilizar una placa de ELISA estéril de 96 pocillos como se muestra en la imagen.
- Añadir 50 μ L de caldo MH en los pocillos que se marcan en el recuadro.
- En la fila A, B y C se utilizará una muestra de propóleo; la fila D, E y F se utiliza para una muestra diferente y la fila H se usa para los controles.



- Añadir 50 μ L de la solución A y colocarlos en A:1, B:1 y C:1, que tendrán una concentración de 1.5 mg/mL, mezclar perfectamente con el caldo MH.
- Tomar 50 μ L con ayuda de una pipeta multicanal y transferir dicho volumen a la siguiente columna. Así sucesivamente hasta llegar a la columna 12, donde se desecharán los últimos 50 μ L, como se muestra en el esquema, con el objetivo de realizar la dilución de la muestra.
- Añadir 50 μ L de la suspensión bacteriana a todos los pocillos utilizados.
- Sellar con papel parafilm e incubar 37°C por 24 horas.



Medición de la actividad respiratoria.

- Después de incubar la microplaca, añadir 50 μ L de azul de tetrazolio al 0.08% a cada pozo inoculado, mezclar perfectamente, tapar e incubar a 37°C / 30 minutos.
- En los pozos donde hay microorganismos, se observa disminución en el color y la formación de un botón rojo en el fondo de la concavidad representando la CMI (Figura 50).

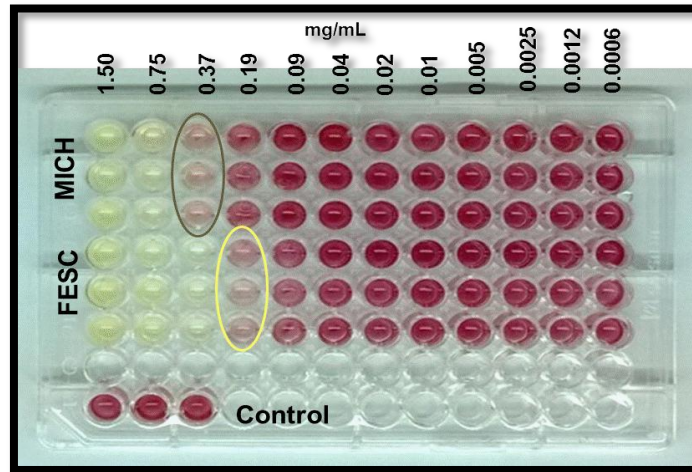


Figura 50. Determinación de la CMI por microtécnica de dilución en caldo.

Se muestra en elipse verde el pozo en donde disminuye la intensidad del color para el propóleo de Tlalpujahuá-Senguio (Michoacán) y en color amarillo para el propóleo de Cuautitlán Izcalli (FESC).

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez

- Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara y representa la CMB (Figura 51).

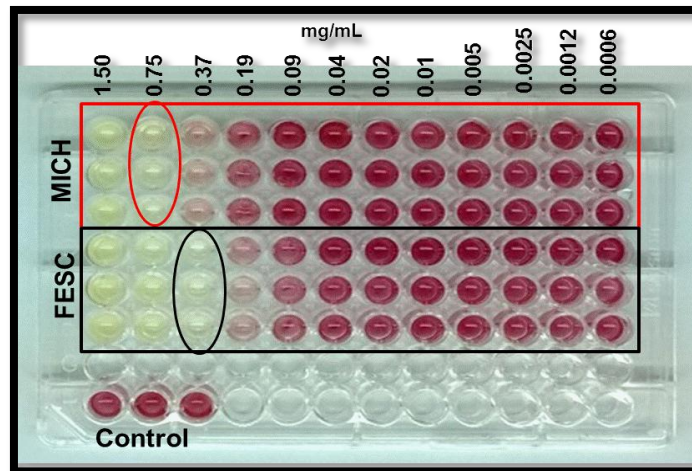


Figura 51. Determinación de la CMB por la microtécnica de dilución en caldo.

Se muestra en elipse de color rojo el pozo en donde no hay crecimiento del microorganismo para el propóleo de Tlalpujahuá-Senguio (Michoacán) y en color negro para el propóleo de Cuautitlán Izcalli (FESC).

Foto: Betsabé Rodríguez Pérez.

Anexo 8. Características de los compuestos identificados por CG-EM

1) Alcohol fenetílico (Merck Index, 7185)

Nombre químico:

2-Feniletanol, bencilmetanol.

Otros nombres

Alcohol β-feniletílico, bencilcarbinol, β-hidroxietilbenceno.

Fórmula molecular

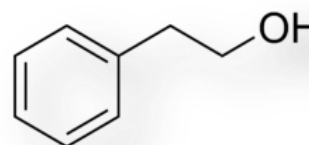
C₈H₁₀O

Peso molecular

122.16 g/mol

Características

Es un alcohol primario con olor, presente en gran número de aceites esenciales de vegetación como rosa, clavel, jacinto, pino carrasco, azahar, neroli y champaca. Es un antimicrobiano, antiséptico y desinfectante que se utiliza también como una esencia aromática y conservante en productos farmacéuticos y de perfumería (National Center for Biotechnology Information).



2) Borneol (Merck Index, 1338)

Nombre químico

endo-1, 7,7-Trimetilbicyclo [2.2.1]heptan-2-ol.

Otros nombres

endo-2-Borneol; *endo*-2-camfanol, *endo*-2-hidroxicanfano, alcohol bornilo, alcanfor de Borneo, alcanfor de Sumatra, alcanfor de Bhimsain

Fórmula molecular

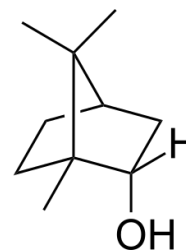
C₁₀H₁₈O

Peso molecular

154.25 g/mol

Características

Monoterpeno bicíclico fácilmente oxidado a cetona (alcanfor). El grupo OH⁻ está en posición de *endo*. El borneol existe como dos enantiómeros, el de origen natural es D-(+)-Borneol siendo ópticamente activo y se encuentra en los aceites esenciales de la valeriana (*Valeriana officinalis*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y lavanda (*Lavandula officinalis*). El borneol libre y el isoborneol se utilizan en perfumería y la fabricación de incienso. Es utilizado para la analgesia y anestesia en la medicina tradicional china y japonesa, componente de aceites esenciales, repelente de insectos y antiséptico (Granger *et al.*, 2005). Además tiene propiedades antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas, bacterias Gram-negativas, levaduras y hongos (Santoyo *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011).



3) Verbenona (Merck Índice ,9862)

Nombre químico

(1*R*)-*cis*- 4,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona

Otros nombres

2-Pinen-4-ona

Fórmula molecular

C₁₀H₁₄O

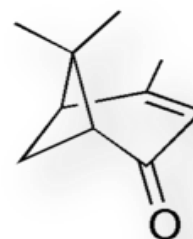
Peso molecular

150.21 g/mol

Características

Monoterpeno, específicamente una cetona bicíclica que se encuentra naturalmente en una variedad de plantas. Es el componente principal del aceite de verbena española (*Verbena triphylla* L., *Verbenaceae*); también se encuentra en el aceite de romero.

Su principal función en las plantas es actuar como feromona para los insectos. Por tener un olor agradable se utiliza en perfumería, aromaterapia, té de hierbas, especias, hierbas medicinales. También puede tener propiedades antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas, bacterias Gram-negativas, levaduras y hongos (Santoyo *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011).



4) 2-Metoxi-4-vinilfenol (NIS)

Otros nombres

4-Etenil-2-metoxifenol, 4-hidroxi-3-metoxiestireno, 4-vinilguayacol, *p*-vinilguayacol, *p*-vinatecol-*o*-metiléter.

Fórmula molecular

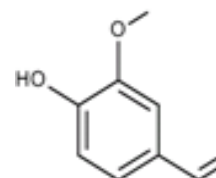
C₉H₁₀O₂

Peso molecular

150.17 g/mol

Características

Es un fenol muy utilizado en la industria química, farmacéutica y clínica. Se utiliza como fungicida, bactericida, sanitizante, antiséptico, desinfectante y agente aromatizante. Es uno de los compuestos responsables del aroma natural de trigo sarraceno (Janes, 2009), presenta propiedades antioxidantes (López, 2014). Algunos insectos como *Rhynchophorus ferrugineus* (Picudo Rojo) lo usan para la señalización química (feromonas).

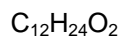


5) Ácido dodecanoico (Merck Índice ,5254)

Otros nombres

Ácido láurico, ácido laurosteárico, ácido dodecáico, ácido *n*-dodecanóico.

Fórmula molecular

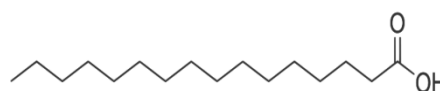


Peso molecular

200.32 g/mol

Características

Ácido graso saturado de cadena con un ligero olor a jabón que suelen proceder de las semillas de diferentes tipos de palmeras. A pesar del grado de saturación de los aceites láuricos y sus monoglicéridos, presentan propiedades antimicrobianas y antivirales, por lo que se ha extendido su uso como ingrediente de fórmulas especiales para soporte nutricional de pacientes con patologías que cursan con cuadros de malabsorción (desnutrición, SIDA, fibrosis quística, etc.) entre otras aplicaciones (Mora, 2003).



Inhibe la expresión de factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* y la inducción de resistencia a la vancomicina en *Enterococcus faecalis*, presumiblemente mediante el bloqueo de la transducción de señales (Ruzin & Novick, 2000).

6) Cadinenos (Merck Índice ,1610)

Nombre químico

α -cadineno: 1*S*,4*aR*,8*aR*)-4,7-dimetil-1-(prop-2-il)-1,2,4a,5,6,8a-hexahidronaftaleno.

γ -cadineno: (1*S*,4*aR*,8*aR*)-7-metil-4-metilideno-1-(prop-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno.

δ -cadineno: (1*S*,8*aR*)-4,7-dimetil-1-(prop-2-il)-1,2,3,5,6,8a-hexahidronaftaleno.

Fórmula molecular

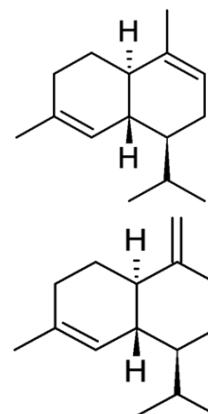


Peso molecular

204.35 g/mol

Características

Cadineno es el nombre químico de un número de isómeros de hidrocarburos que se producen en una amplia variedad de aceites esenciales de plantas (*Juniperus oxycedrus* L). Químicamente son sesquiterpenos bicíclicos. Debido al gran número de isómeros de doble enlace y estereoquímicas conocidos, esta clase de compuestos se ha subdividido en cuatro subclases basadas en la estereoquímica relativa en el grupo isopropilo y los dos átomos de carbono de cabeza de puente.



7) (1E)-1-Etiliden-7a-metiloctahidro-1H-indeno ^(PubChem)

Otros nombres

cis-1-etilideneoctahidro-7a-metil-1*H*-indeno, (3*E*)-3-etilideno-3a-metil-2, 4, 5, 6, 7, 7a-hexahidro-1*H*-indeno.

Fórmula molecular

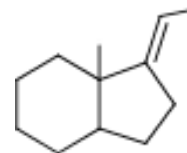
C₁₂H₂₀

Peso molecular

164.28 g/mol

Características

Es un hidrocarburo bicíclico.



8) Ácido hexadecanoico ^(Merck Índice ,6947)

Otros nombres

Ácido palmítico, ácido hexadecílico, ácido cetílico.

Fórmula molecular

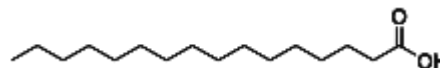
C₁₆H₃₂O₂

Peso molecular

256.42 g/mol

Características

Se produce como el éster de glicerilo en muchos aceites y grasas. Es el segundo ácido graso que se produce durante la lipogénesis y a partir de él se pueden formar otros ácidos grasos de cadena más larga o con dobles enlaces (insaturaciones).



9) Palmitato de etilo ^(Pubchem)

Otros nombres

Éster etílico del ácido hexadecanoico, hexadecanoato de etilo.

Fórmula molecular

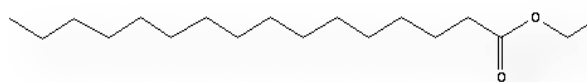
C₁₈H₃₆O₂

Peso molecular

284.47 g/mol

Características

Se utiliza como fragancias en cosméticos y saborizante.



10) Aromadendreno ^(PubChem)

Otros nombres

3,3,11-Trimetil-7-metilenotriciclo[6.3.0.02.4]undecano. 1,1,7-Trimetil-4-methylenoperhidrociclopropano[e]azuleno.

Fórmula molecular

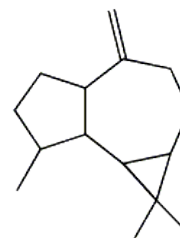
C₁₅H₂₄

Peso molecular

204.35 g/mol

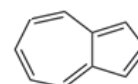
Características

Es un sesquiterpeno tricíclico que utilizan las plantas como mecanismo de defensa (*Salvia officinalis*). Se han reportado propiedades sinérgicas con el 1,8-cineol, a partir del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, contra los agentes patógenos susceptibles y resistentes a los antibióticos como *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA) y *Enterococcus faecalis* vancomicina-resistente (VRE) (Mulyaningsih *et al.*, 2010).

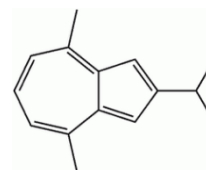


Azuleno

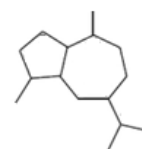
Dos terpenoides, vetivazuleno (4,8-dimetil-2-isopropilazuleno) y el guayazuleno (1,4-dimetil-7-isopropilazuleno), que poseen un esqueleto afín al azuleno, se encuentran en la naturaleza, como componentes del aceite esencial de guayaco, propóleo y de algunos invertebrados marinos, posee **propiedades antiinflamatorias** que ayudan a la regeneración de los tejidos más deteriorados.



Azuleno



Vetivazuleno



Guayazuleno

11) **Hexadecanal** ^(PubChem)

Otros nombres

n-hexadecanal; 1-hexadecanal; Palmitinaldehído, *n*-hexadecan-1-al; Hexadecanaldehído; aldehído de ácido palmítico.

Fórmula molecular

C₁₆H₃₂O

Peso molecular

240.42 g/mol

Características

Es utilizado para la producción de lípidos y ácidos grasos. Se cuenta con una patente en la que se utiliza para el tratamiento de resistencia a la insulina y la miocardiopatía (US2006079542) y otra como parte de la composición de feromonas en cítricos como la naranja (US2006280765).



12) **1-Nonadecanol** ^(NIST)

Otros nombre

Nonadecanol; Nonadecan-1-ol.

Fórmula molecular

C₁₉H₄₀O

Peso molecular

284.52 g/mol

Características

Propiedades antimicrobianas y citotóxicas (Kuppuswamy & Arockiasamy, 2013).



13) Ácido vaccénico (Merck Index, 9810)

Otros nombres

Ácido *trans*-11-octadecenoico.

Fórmula molecular

$C_{18}H_{34}O_2$

Peso molecular

282.45 g/mol

Características

Encontrado en la mantequilla y la grasa de otros animales. Promotor del factor de crecimiento en ratas. Es producido por la hidrogenación del ácido linoleico en el rumen, puede ser desaturado en el C9 por las enzimas desaturasas intestinales y/o hepáticas de los rumiantes, transformándose en ácido linoleico conjugado (ALC) (forma 9*cis*-11*trans*), por ello se encuentra en los humanos en tejidos y secreciones (leche), aunque en menor proporción que en los rumiantes.

Al consumir carne de rumiantes (o productos lácteos), conteniendo ácido vaccénico, éste sería transformado a ALC por la desaturación enzimática, proceso que incrementaría el aporte de ALC proveniente de la carne y de la leche de rumiantes (Sanhueza *et al.*, 2002).



14) Metil éster del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico (Pubchem)

Otros nombres

7Z,10Z,13Z-Hexadecatrienoato de metilo.

Fórmula molecular

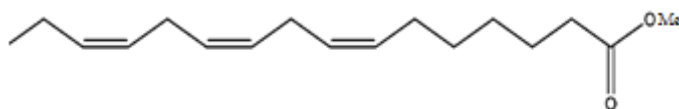
$C_{17}H_{28}O_2$

Peso molecular

264.40 g/mol

Características

Éster de ácido graso.



15) Ácido oleico (Merck Index, 6788)

Otros nombres

Ácido *cis*-9-octadecenoico. 18:1 *cis*-9

Fórmula molecular

$C_{18}H_{34}O_2$

Peso molecular

282.46 g/mol

Características

Es un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales como el aceite de oliva, del aguacate, entre otros. Ejerce una acción beneficiosa en los vasos sanguíneos reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares.

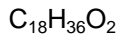


16) Ácido esteárico ^(Merk Index, 8761)

Otros nombres

Ácido octadecanoico

Fórmula molecular



Peso molecular

284.48 g/mol

Características

Es un ácido graso saturado presente en aceites, grasas animales y vegetales. Es parecido a la cera a T° ambiente. Algunas de sus sales, principalmente de sodio y potasio, tienen propiedades como tensoactivas. Es muy usado en la fabricación de velas, jabones y cosméticos.

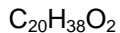


17) Éster etílico del ácido oleico ^(Merk Index, 8761)

Otros nombres

Oleato de etilo.

Fórmula molecular

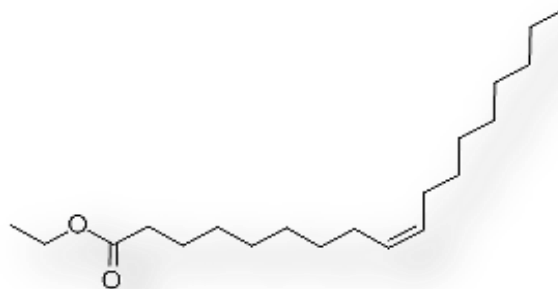


Peso molecular

310.51 g/mol

Características

El oleato de etilo ha sido identificado como un cebador de feromonas en las abejas (Leoncini *et al.*, 2004).



18) 1,19-Eicosadieno ^(NIST)

Otros nombres

1,19-Icosadieno; icos-1,19-dieno

Fórmula molecular



Peso molecular

278.52 g/mol

Características

Este compuesto se detectó por CG-EM en el aceite esencial de *R. officinalis* presentando actividad antibacteriana contra *Lactococcus garvieae* (Mahmoodi *et al.*, 2012).



19) Ferruginol ^(PubChem)

Otros nombres

(4bS, 8aS)-4b, 8,8-Trimetil-2-(prop-2-il)-5,6,7,8,9,10-hexahidrofenantren-3-ol.

Fórmula molecular

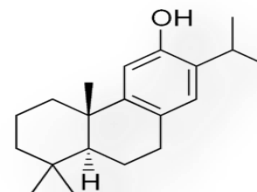
C₂₀H₃₀O

Peso molecular

286.23 g/mol

Características

Es un fenol natural y un diterpeno (un compuesto químico que contiene una subestructura terpenoide) que ha sido aislado a partir de las agujas de los secuoya *Sequoia sempervirens*. Investigaciones indican que tiene propiedades antitumorales, antibacterianas, efectos gastroprotectores (Flores *et al.*, 2001).



20) Esclareno ^(PubChem)

Otros nombres

1,1,4a-Trimetil-6-metileno-5-(3-metileno-4-penten-1-il)-[4aS-(4α, 5α, 8αβ)]-decahidronaftaleno. (4aS,5S,8aS)-1,1,4a-Trimetil-6-metileno-5-(3-metilenopent-4-en-1-il)decahidronaftaleno. labda-8(17),13(16),14-trieno.

Fórmula molecular

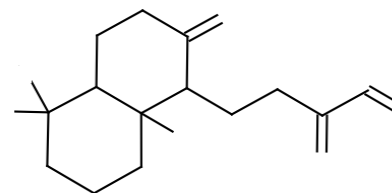
C₂₀H₃₂

Peso molecular

272.47 g/mol

Características

Es un diterpeno presente en las resinas de *Pinaceae*.



21) Cardamonina ^(PubChem)

Otros nombres

2',4'-Dihidroxi-6'-metoxichalcona. 1-(2,4-Dihidroxi-6-metoxi-fenil)-3-fenilprop-2E-enona.

Fórmula molecular

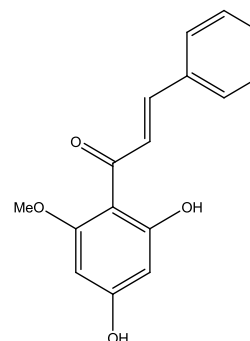
C₁₆H₁₄O₄

Peso molecular

270.28 g/mol

Características

Es una chalcona de las especies *Aplinia* (*Zingiberaceous*). Inhibe la pigmentación en los melanocitos por la inhibición de la vía de señalización de Wnt/b-catenina por un mecanismo que involucra la degradación mediada por proteosomas de β-catenina (vía independiente de GSK-3b). Muestra actividad anti-inflamatoria por la inhibición del NF-κB y fosforilación del IκBα, inhibe la producción de TXB₂ a través de las vías de la COX-1 y COX-2 (Cho *et al.*, 2009).



22) 1,1,7-Trimetildecahidroespiro[ciclopropano[e]azuleno-4,2'-oxirano] (PubChem)

Otros nombres

1,1,7-trimetildecahidroespiro [ciclopropano[e]azuleno-4,2'-oxirano]. Óxido de alloaromadendreno.

Fórmula molecular

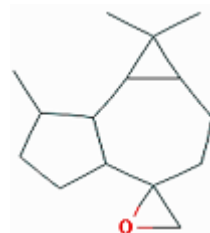
C₁₅H₁₄O

Peso molecular

220.35 g/mol

Características

Se utiliza como antagonista de calcio.



23) 3- Pentadecilfenol (PubChem)

Otros nombres

3-Pentadecilfenol. Hidrocarbinol. 3-*n*-Pentadecilfenol. Hidroginkgol. Tetrahydroanacardol. *m*-Pentadecilfenol.

Fórmula molecular

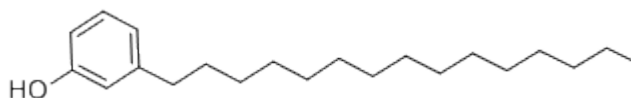
C₂₁H₃₆O

Peso molecular

304.50 g/mol

Características

Es un lípido fenólico presente en el corteza de la nuez de *Anacardium occidentale*. Es un inhibidor en la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa; se propone como tratamiento en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Stasiuk *et al.*, 2008).



24) α-Selineno (PubChem)

Otros nombres

4a,8-Dimetil-2-(1-metiletenil)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno. 2-Isopropenil-4a,8-dimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno.

Fórmula molecular

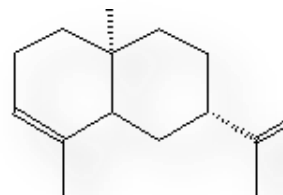
C₁₅H₂₄

Peso molecular

204.35 g/mol

Características

Sesquiterpeno más común junto con su isómero β. Se encuentra en el aceite esencial de la especie *Piper lanceaefolium*, que tiene actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Pino *et al.*, 2009).



25) Pinocebrina (PubChem)

Otros nombres

Dihidrocrisina. Galangina flavanona. 2S-Pinocebrina. (S)-5,7-Dihidroxi-7-metoxi-2-fenil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona.

Fórmula molecular

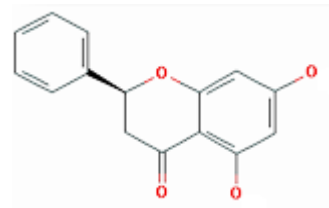
$C_{15}H_{12}O_4$

Peso molecular

256.25 g/mol

Características

Es una flavanona con actividad antibacteriana, antioxidante, antiparasitaria, antifúngica contra *C. albicans* (López *et al.*, 2002), inducción de la apoptosis y la detención del ciclo celular en células de carcinoma de colon humano por las hojas *Corema álbum* (León, 2012).



26) Tectocrisina (Merk Index, 2261)

Otros nombres

5-Hidroxi-2-fenil-7-metoxi-4H-1-benzopiran-4-ona. 5-Hidroxi-7-metoxiflavona.

Fórmula molecular

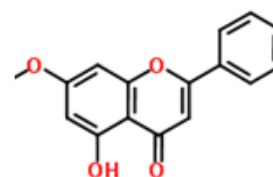
$C_{15}H_{10}O_4$

Peso molecular

254.22 g/mol

Características

Tiene actividad fitoestrogénica, potencial antioxidante, que se ha demostrado a través de su capacidad para inhibir la xantina-oxidasa y, por consiguiente, suprime la formación de ácido úrico y ciertas especies reactivas de oxígeno. También puede inhibir, bajo ciertas condiciones, la peroxidación lipídica y actividad ansiolítica, propiedades anti-inflamatorias mediante la disminución derivada de la COX-2 PGE₂ y la reducción de la activación de NF-κB (During & Larondelle, 2013).



27) Eicosano (NIST)

Otros nombres

n-Eicosano; *n*-Icosano; Icosano

Fórmula molecular

$C_{20}H_{42}$

Peso molecular

282.54 g/mol

Características

Es un hidrocarburo alifático de tipo parafínico.



28) Escualeno (Merk Index, 8727)

Otros nombres

Espinaceno; Supraeno.

Fórmula molecular

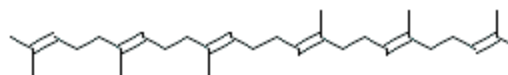
$C_{30}H_{50}$

Peso molecular

410.71 g/mol

Características

Es un hidrocarburo precursor de triterpenos y esteroides. Se utiliza como bactericida, intermedio en la construcción de productos farmacéuticos, materiales colorantes orgánicos, productos químicos de caucho, compuestos aromáticos y agentes activos de superficies.



29) 1-(3-Aminopropil)azaciclotridecan-2-ona (PubChem)

Otros nombres

Ninguno.

Fórmula molecular

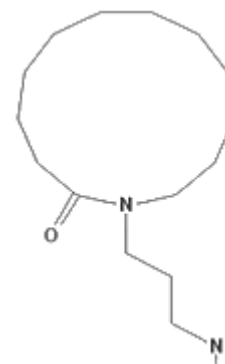
$C_{15}H_{30}N_2O$

Peso molecular

254.41 g/mol

Características

Es una aminoacetona alifática heterocíclica con propiedades anticancerígenas, analgésicas, herbicidas, pesticidas, principalmente.



30) Sakuranetina (Merk Index, 8289)

Otros nombres

7-metil éter de la naringenina. 5-Hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-croman-4-ona.

Fórmula molecular

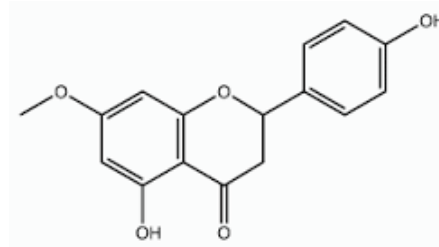
$C_{16}H_{14}O_5$

Peso molecular

286.28 g/mol

Características

Es una flavonona proveniente de *Baccharis retusa* (Asteraceae) presente en la fitoalexina del arroz; con actividad antiinflamatoria, antimutagénico, antimicrobiana, participa en la homeostasis de la glucosa, entre otros. (Shimizu *et al.*, 2012).



31) Geraniol-geraniol (PubChem)

Otros nombres

3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2E,6E,10E,14-tetraen-1-ol.

Fórmula molecular

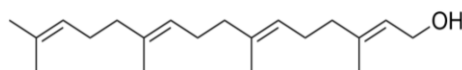
C₂₀H₃₄O

Peso molecular

290.48 g/mol

Características

Es un isoprenoide presente en frutas, vegetales y granos, incluyendo arroz. Presenta acciones antiinflamatorias inhibiendo la activación de NF-kB (Giriwono et al, 2013); acción contra *Trypanozoma cruzi* (Menna et al., 2008); antitumoral y actividad contra *S. aureus* (Inoue et al., 2005), entre otras.



32) 3,5,7,4'-Tetrametoxiquercetina (PubChem)

Otros nombres

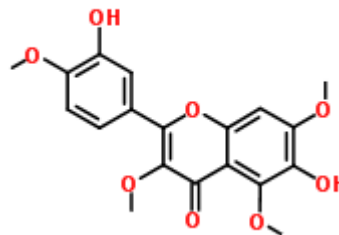
3, 5, 7, 4'-Tetrametil éter de la quercetina.

Fórmula molecular

C₁₉H₁₈O₇

Peso molecular

358.34 g/mol



33) Lupenona (NIST)

Otros nombres

Lup-20(29)-en-3-ona; Lupenona; Lupen-3-ona

Fórmula molecular

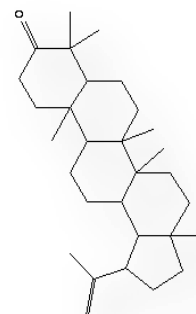
C₃₀H₄₈O

Peso molecular

424.70 g/mol

Características

Es un triterpeno pentacíclico presente en *Fluorencia resinosa* (Compositae). Dentro de sus propiedades se encuentra la inhibición del dolor o efecto antinociceptivo (Talla et al., 2013); disminuye la acumulación y la expresión de genes marcadores adipogénicas de lípidos (Ahn & Sub, 2013); efecto sinérgico contra epimastigotes formas de *T. cruzi* (Polanco et al., 2013), entre otros.



34) α -Amirina (Merk Index, 653)

Otros nombres

Urs-12-en-3 β -ol. α -Amirenol. **Viminalol.**

Fórmula molecular

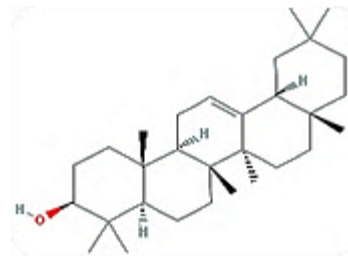
C₃₀H₅₀O

Peso molecular

426.72 g/mol

Características

Es un triterpeno pentacíclico ampliamente distribuido en la naturaleza y aislado de una variedad de fuentes vegetales como en el té de diente de león. Se produce principalmente como acetato en látex de árboles de caucho, en el látex de *Ficus variegata*, *Moraceae*, *Balanophora elongata*, *Balanophoraceae* y en *Erythroxylum coca*. Presenta propiedades analgésicas de amplio espectro, que puede implicar la inhibición de la proteína quinasa A (PKA), actúa como antihiper glucemiante e hipolipidémico (Almeida *et al.*, 2012).



35) 12-Oleaneno (NIST)

Otros nombres

β -amireno. (6aR,6bS,8aR,12aS,14aR,14bS)-

4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-octametil-

1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a-

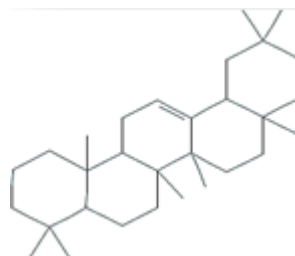
tetradecahidropiceno.

Fórmula molecular

C₃₀H₅₀

Peso molecular

410.72 g/mol



36) Taraxasterol (Merck Index, 9031)

Otros nombres

Isolactucero. Antesterina. Taraxasterina. α -Lactucero. (3 β , 18 α , 19 α)-Urs-20(30)-en-3-ol.

Fórmula molecular

C₃₀H₅₀O

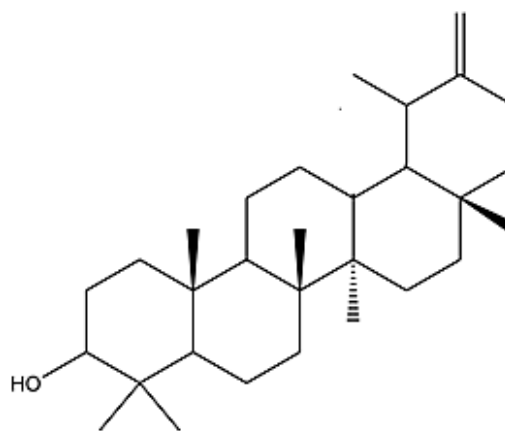
Peso molecular

426.71 g/mol

Características

Es un triterpeno pentacíclico, se ha aislado de la hierba china *Taraxacum officinale*. Respuesta inflamatoria inhibe NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β e IL-6 en la producción inducida por LPS en macrófagos de una manera dependiente de la dosis.

Otros estudios revelaron que el taraxasterol impide la translocación de NF- κ B inducida por LPS de citoplasma en el núcleo (Zhang *et al.*, 2012).



37) 4,8a-Dimetil-6-(1-metiletenil)-3,5,6,7,8,8a-hexahidro-2(1H)-Naftalenona ^(NIST)

Otros nombres

4,8a-Dimetil-6-(1-metiletenil)-3,5,6,7,8,8a-hexahidro-2(1H)-naftalenona.

Fórmula molecular

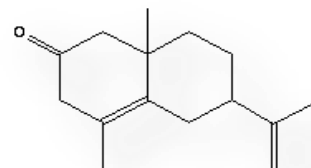
$C_{15}H_{22}O$

Peso molecular

218.33 g/mol

Características

Es un hidrocarburo alifático bicíclico



38) Cicloartenol ^(NIST)

Otros nombres

(3 β)-9 β ,19-Ciclolanost-24-en-3-ol

Fórmula molecular

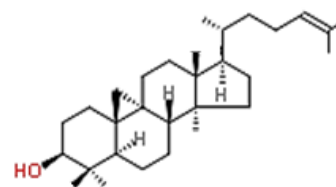
$C_{30}H_{50}$

Peso molecular

426.71 g/mol

Características

Es un triterpeno pentacíclico que se encuentra en las plantas. Presenta propiedades antitumorales, antiinflamatorias, bactericidas y fungicidas



39) Lupeol ^(Merck Index, 5478)

Otros nombres

Farganasterol, Lup-20(29)-en-3 β -ol, monoginol B, β -viscol. Lupenol.

Fórmula molecular

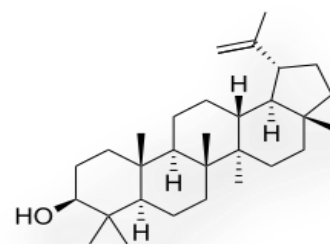
$C_{30}H_{50}O$

Peso molecular

426.71 g/mol

Características

Es el triterpeno pentacíclico más abundante en la vegetación. Se produce en la piel de las semillas de lupinus en el chicle, en el látex de los árboles de higo y de las plantas de cauchos. Tiene una farmacología compleja en los seres humanos, mostrándose como antiprotozoario, antimicrobiano, antiinflamatorio (funciona principalmente sobre el sistema interleucina), antitumoral y propiedades quimio-preventivas (Gallo & Sarachine, 2009). Es un inhibidor eficaz en modelos de laboratorio del cáncer de próstata y de piel (Saleem *et al.*, 2004).



11. REFERENCIAS

- Ahn, Eun-Kyung & Sub Oh, Joa. (2013). Lupenone Isolated from *Adenophora triphylla* var. japonica Extract Inhibits Adipogenic Differentiation through the Downregulation of PPAR γ in 3T3-L1 Cells. *Phytotherapy. Research*, 27(5), 761 – 766.
- Almeida Santos, F.; Torres Frota, J.; Rodrigues Arruda, B.; Sousa de Melo, T.; Almeida da Silva, A.; de Castro Brito, G., Chaves, M. & Satyanarayana Rao, V. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, 11 (98), 2 – 8.
- Alves Ferreira, E. M.; Guzmán, D.; Figueroa, J.; Tello, J. & De Oliveira, D. (2011). Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: apidae*) de la región Andina Colombiana. *Acta Biológica Colombiana*, 16, 175 - 184.
- Ávalos García, A. & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolitos secundarios de las plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*, 2, 119 – 145.
- Bankova, Vassya. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114–117.
- Banskota, A. H.; Tezuca, Y. & Kadota, S. (2001). Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. *Phytotherapy research*, 15, 561 – 571.
- Bedascarrasbure E. (2006). *Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos*. Revisión y actualización de componentes y propiedades químicas. Argentina: Magna.
- Bogdanov, S. (2012). *Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review*. Recuperado el 15 de junio de 2012 de <http://www.bee-hexagon.net>
- Bonkanka Tabares, C. (2006). *Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal*. Tesis de doctorado, Universidad de la Laguna, Madrid, España.
- Borrelli, F.; Maffia, P.; Pinto, L.; Ianaro, A.; Russo, A.; Capasso, F. & Ialenti, A. (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 1, S53 – S63.
- Burdock G. A. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347 - 363.
- Cantón E. & Viudes A. (2001). Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18, 51 - 55.
- Carranza-Salinas, S. (2014). *Miel del Jardín S. de R. L. Mi. Apiarios Carranza*. Recuperado el 29 de agosto de 2014 de <http://www.sicde.gob.mx>
- Carrillo, M.; Castillo, L. & Mauricio, R. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica*, 22, 21 - 28.
- Cartaya, O. & Reynaldo, I. (2001) Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22, 5 – 14.

- Castagnino, Juan Miguel. (2000). Electroforesis capilar. *Bioquímica*, 25 (1), 13 – 32.
- Castaldo S. & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 (1), S1 – S6.
- Castañeda C. B.; Ramos, LL. E. & Ibáñez, V. L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 8 (1), 56 - 72.
- Chaillou, L., Herrera, H. & Maidana, J. (2004). Estudio del propóleo de Santiago del Estero, Argentina. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24, 11 – 15.
- Chil, N.; Pavón, S.; Galvéz, H.; Cuéllar, C. & Ávila, B. (2002). Estudio de algunos parámetros para la caracterización del extracto blando de propóleo procedente de la región de Manzanillo como materia prima para la industria nacional. *Revista Cubana de Química*, XIV, 34 - 41.
- Cho, M.; Ryu, M.; Jeong, Y.; Chung, Y.; Kim, D., Cho, H.; Kang, S.; Han, J.; Chang, M.; Lee, C.; Jin, M.; Kim, H. & Oh, S. (2009). Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390 (3), 500 – 505.
- Confederación Brasileña de Apicultura (1999). *Regulamentos técnicos para Fixação de identidade e qualidade de própolis*. Recuperado el 15 de enero de 2013 de <http://www.apacame.org.br>
- Diário Oficial da república Federativa do Brasil. (2001). *Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa Nº 3, de 19 de janeiro da 2001. Seção1, p. 18-23*. Recuperado el 23 de junio de 2011 de www.extranet.agricultura.com.br
- Diario Oficial de San Salvador. (2003). *Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 65.19.02.03: Calidad de propóleo crudo*. Recuperada el 15 de enero de 2013 de <http://faolex.fao.org>
- During, A. & Larondelle, Y. (2013). The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure–activity relationships of flavones. *Biochemical pharmacology*, 86, 1739 – 1746.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2007). *Value-added products from beekeeping*. Chapter 5. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e14.htm>
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *Production*. Recuperado el 29 de agosto de 2014, de <http://faostat.fao.org>
- Fernández Pinto, J. (2011). *Barrido sistemático de la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles totales) de alimentos vegetales del departamento de La Paz*. Tesis de Licenciatura, Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia.
- Flores, C.; Alarcón, J.; Becerra, J.; Bittner, M.; Hoeneisen, M. & Silva, M. (2001). Extractable compounds of native trees chemical and biological study I: Bark of *Prumnopytis andina* (*Podocarpaceae*) and *Austrocedrus chilensis* (*Cupressaceae*). *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46(1), 61 - 64.
- Gallo, M. & Sarachine, M. (2009). Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutics Sciences*, 3 (Special Issue 1), 46 – 66.

- García Bernal, M.; Medina Marrero, R.; Hidalgo Yanes, P.; Delgado Lasval, M.; Truffin Truffin, E. & Gómez Marrero, R. (2007). Actividad *in vitro* del Propóleos frente a Patógenos Bacterianos aislados de Infecciones Humanas. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26 (1), 100 – 102.
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23, 80 - 84.
- Giral, T; Hugues, B. & Soto, C. J. (2007). Suspensión oftálmica de propóleos-R: una alternativa en el tratamiento de las oftalmopatías en animales afectivos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, VIII, 1 – 6.
- Giriwono, P.; Shirakawa, H.; Ohsaki, Y.; Hata, S.; Kuriyama, H.; Sato, S.; Goto, T. & Komai, M. (2013). Dietary supplementation with geranylgeraniol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation via inhibition of nuclear factor-KB activation in rats. *European Journal of Nutrition*, 52, 1191 – 1199.
- Gómez Caravaca, A.; Gómez Romero, M.; Arráez Román, 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 Guerra, A. (1997). *Propóleos: un camino hacia la salud*. La Habana, Cuba: Pablo de la Torriente.
- González Búrquez, M. J. (2013). *Evaluación antiviral del propóleo mexicano en cultivo celular infectado con el virus de Aujeszky*. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Granger, Renee E.; Campbell, Erica L. & Johnston, Graham A.R. (2005). (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\lambda 2L$ GABA_A receptors. *Biochemical Pharmacology*, 69, 1101 – 1111.
- Guerrero Gutiérrez, J. J. (2013). *Estudio químico del propóleo negro de la región de Zacatecas*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gutiérrez Hernández, E. (2011). *Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de Pasteurella multocida aisladas de conejos*. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gutiérrez Ravelo, Á. & Estévez Braun, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*, 103, 409 – 419.
- Gutiérrez, M.C. & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)*, 122, 35 – 41.

- Guzmán Novoa, E.; Espinosa Montaña, L.; Correa Benítez, A. & Guzmán Novoa, G. (2011). Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México, *Veterinaria México*. 42 (2), 149 – 178.
- Inoue, Y.; Hada, T.; Shiraishi, A.; Hirose, K.; Hamashima, H. & Kobayashi, S. (2005). Biphasic Effects of Geranylgeraniol, Teprenone, and Phytol on the Growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (5), 1770 – 1774.
- INAFED: Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (2015). *Enciclopedia de los municipios y delegaciones del Estado de México*. Recuperado el 24 de junio de 2013 de <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15121a.html>
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI) (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Tianguismanalco, Puebla. Clave geoestadística 21175. Recuperado el 24 de junio de 2013 de www3.inegi.org.mx
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI) (2012). *La apicultura en la Península de Yucatán, Censo Agropecuario 2007*. Recuperado el 24 de junio de 2013 de www.inegi.org.mx
- Isla, M.I.; Nieva Moreno, M.I.; Sampietro, A.R. & Vattuone, M.A. (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 165 – 170.
- Janeš, D.; Kantar, D.; Kreft, S. & Prosen, H. (2009). Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) aroma compounds with GC–MS. *Food Chemistry*, 112, 120–124.
- Jiang, Y.; Wua, Nan; Fua, Yu-Jie; Wang, Wei; Luo, Meng; Zhao, Chun-Jian; Zu, Yuan-Gang & Liu, Xiao-Lei. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosemary*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 63 – 68.
- Kiranmai, M.; Mahendra, CB. & Ibrahim, M. (2011). Comparison of total flavanoid content of *Azadirachta indica* root bark extracts prepared by different methods of extraction. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2 (3), 254 - 261.
- Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V. & Summers, H. (1985). *Diagnóstico microbiológico*. México: Médica Panamericana.
- Kumazawa, S.; Hamasaka, T. & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329 – 339.
- Kuppaswamy K.; Jonnalagadda, B. & Arockiasamy, S. (2013). GC-MS analysis of chloroform extract of *Croton bonplandianum*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), 613 – 617.
- Kuropatnicki, A., Szliszka E. & Wojciech, K. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1 - 11.
- León González, V. (2012). *Estudio químico de un propóleo recolectado en la zona rural del Distrito Federal. Evaluación de su actividad antibacteriana contra bacterias patógenas orales*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- Leoncini I.; Le Conte, Y.; Costagliola, G.; Plettner, E.; Toth, AL.; Wang, M.; Huang, Z.; Bécard, JM; Crauser, D.; Slessor, Keith. & Robinson, G. (2004). Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 50, 17559 – 17564.
- Li, F.; He, Y.; Awale, S.; Kadota, S. & Tezuka, Y. (2011). Two New Cytotoxic Phenylallylflavanones from Mexican propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59 (9), 1194 - 1196.
- Londoño Orozco, A.; Ávila Acevedo, J.; Canales Martínez, M., Hernández Delgado, C.; Serrano, R.; Flores Ortiz, C.; Durán Díaz, A.; Penieres Carrillo, J.; García Tovar, C. & Cruz Sánchez, T. (2010). Antibacterial comparative study extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 1250 - 1254.
- López, A.; Sheng Ming, D. & Neil Towers, G. (2002). Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. *Journal of Natural Products*, 65, 62 – 64.
- López-Mejía, O.; López-Malo, A. & Palou, E. (2014). Capacidad antioxidante de subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64 (1), 50 – 57.
- Lotfy, Mahmoud. (2006). Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7, 22 – 31.
- Lotti, C.; Campo Fernández, M.; Piccinelli, A.; Cuesta-Rubio, O.; Márquez Hernández, I. & Rastrelli, L. (2010). Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 2209 – 2213.
- Lozina, L.; Boehringer S.; Koscinczuk P. & Acosta O. (2006). Resultados preliminares para determinar la eficacia terapéutica de gotas óticas con propóleos en el tratamiento de otitis externas en caninos. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, V-04*. Recuperado el 12 de marzo de 2007 en <http://www.unne.edu.ar>
- Lozina, L.; Peichoto, M.; Acosta, O. & Granero, G. (2010). Estandarización y Caracterización organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29, 102 – 110.
- Mahmoodi, A.; Roomiani, L.; Soltani, M.; Basti, A., Kamali, A. & Taheri, S. (2012). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*. *Global Veterinaria*, 9 (1): 73 - 79.
- Manrique, A. (2006). Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado de Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia tropical*, 24, 43 - 53.
- Marcano Deanna, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela: Consejo de desarrollo científico y humanístico.

- Marcucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- Martínez Flores, S. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. XVII (6), 271-278.
- Martínez M., A. (2005). *Flavonoides*. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Martínez, L.R.; Delgado Herrera, M.; Rojas, N.; Casillas-Pañuelas, R. (2010, septiembre-octubre). *El propóleo y las técnicas para su colecta*, NOTIABEJA, 8 - 9. Recuperado el 11 de enero del 2013 en <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Programas/Documents/noti1005.pdf>
- McFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. (3° ed). México: Médica Panamericana.
- Menna-Barreto, R.; Laranja G., A.T.; Silva, M.; Coelho, P.; Paes, M.; Oliveira, M. & De Castro, L. (2008). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitology Research*, 103, 111 – 117.
- Mirzoeva, O.K; Grishanin, R.N. & Calder, P.C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research*. 152, 239 – 246.
- Mora Gil, O. (2003). Lauric Acid: Bioactive Component of the Palm Kernel Oil. *Palmas*, 24 (1), 79 - 83.
- Mora Celis, Ma. G. (2010). *Flavonoides: Características y algunas propiedades biológicas. Una revisión*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Mulyaningsih, S.; Sporer, F.; Zimmermann, S.; Reichling, J. & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids allomadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17 (13), 1061 – 1066.
- Muñoz, R.; Linares, V. & Narváez, S. (2011). Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Revista Biosalud*, 10 (2), 101 – 111.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), (n.d). *National Library of Medicine: MESH Database*. Recuperado el 22 de agosto de 2104, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010626>
- National Institute of Standards and Technology. (2011). *Chemistry WebBook of NIST*. Recuperado el 22 de agosto de 2104, de <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Nijveldt, R.; Nood, E.; Van Hoorn, D.; Boelens, P.; van Norren, K. & van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418 – 425.
- Ordoñez, F. (2005). *Métodos de purificación del propóleo para su posterior aplicación en sanidad animal*. Tesis de licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador.

- Organización Mundial de la Salud. (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Revisado el 5 de septiembre de 2014, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Orozco Martínez, J. (2010). *Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de Ceiba aesculifolia subsp. parvifolia, Juliania adstringens y Cyrtocarpa procera* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ortega, C. (2009). Caracterización y riesgos para la salud pública de la antibiorresistencia de *Staphylococcus aureus* en la cunicultura intensiva. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 28 (3), 1119 - 1128.
- Palomino García, L.; Martínez Galán, J.; García Pajón, C.; Gil González, J. & Durango Restrepo, D. (2010). Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 63 (1), 5373 – 5383.
- Pino Benítez, N.; Meléndez, E.; & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (4), 301 -304.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Rosado, M.; Guzmán-Marín, K.; Acosta-Viana, K.; Giménez-Turba, A.; Salamanca, E. & Peña-Rodríguez, L. (2013). Synergistic Effect of Lupenone and Caryophyllene Oxide against *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (435398), 1 – 6.
- Popova, M.; Bankova, V.; Bogdanov, S.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Marcazzan, G. & Sabatini, A. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38, 306 – 311.
- Quintero Mora, M.; Londoño Orozco, A.; Hernández Hernández, F.; Manzano Gayosso, P.; López Martínez, R.; Soto Zárate, C.; Carrillo Miranda, L.; Penieres Carrillo, G.; García Tovar, C. & Cruz Sánchez, T. (2008) Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 22 – 26.
- Quiñones, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1), 76 - 89.
- Rasul, A.; Millimouno, F.; Eltayb, W.; Ali, M.; Li, J. & Li, X. (2013). Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International*, 2013 (379850), 1 – 9.
- Righi, A.; Negri, G. & Salatino, A. (2013). Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1 - 14.
- Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.; Ariese, F.; Gooijer, C. & Brinkman, U. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography*, 1112, 31 – 63.

QFB Betsabé Rodríguez Pérez

- Rodríguez Pérez, B. (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. Tesis de maestría no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ruiz Salvador, A.; García Milián, A.; Jiménez López, G.; Alfonso Orta, I.; Pérez Hernández, B. & Carrazana Lee, A. (2013). Farmacovigilancia de fitofármacos y apifármacos en Cuba durante 2006-2010. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 173 - 186.
- Ruiz Sánchez, P.F. (2011). Estudio de la influencia de las propiedades de propóleo y ajo (*Allium sativum*) en la crianza de pollos broiler en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales ECAA. Tesis de licenciatura, Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, Ecuador.
- Ruzin, A. & Novick, R. P. (2000). Equivalence of Lauric Acid and Glycerol Monolaurate as Inhibitors of Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 182, (9), 2668 – 2671.
- Salamanca, G.; Ramírez, C.; Rubiano, L.; Vargas, E.; Hernández, E. & Osorio, M. Origen naturaleza y características de los propóleos Colombianos. Parte I y II. Recuperado el 26 de abril de 2013 de <http://www.beekeeping.com>
- Saleem, M.; Afaq, F.; Adhami, V. & Mukhtar, H. (2004). Lupeol modulates NF-KB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*, 23, 5203 – 5214.
- Sanhueza, J.; Nieto, S. & Valenzuela, A. (2002). Ácido linoleico conjugado: un ácido graso con isomería *trans* potencialmente beneficioso. *Revista Chilena de Nutrición*, 29(2), 98-105.
- Santoyo, S.; Caveró, S.; Jaime, L.; Ibañez, E.; Señoráns, F.J. & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection*, 68 (4), 790 795.
- Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. (n.d) *Código Alimentario Argentino*. Resolución Conjunta 94/2008 y 357/2008 Modificación. Recuperado el 15 de enero de 2013 de <http://www.senasa.gov.ar>
- Sepúlveda, G.; Porta, H. & Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355 -363.
- Sforcin, J. & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253 - 260.
- Shimizu, T.; Lin, F.; Hasegawa, M.; Nojiri, H.; Yamane, H. & Okada, K. (2012). The potential bioproduction of the pharmaceutical agent sakuranetin, a flavonoid phytoalexin in rice. *Bioengineered* 3 (6), 352 – 357.
- Skoog, D.; Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2005). Fundamentos de Química Analítica. (5° ed), EUA: Cengage Learning Editores.
- Solomons, T. W. G. (2004). Fundamentos de Química orgánica. (2ª ed). Florida, USA.: Limusa.

- Stasiuk, M.; Bartosiewicz, D. & Kozubek, A. (2008). Inhibitory effect of some natural and semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. *Food Chemistry*, 108, 996–1001.
- Talla, E.; Dabole, B.; Taiwe, G.; Ngo Bum, E.; Mbafor, J.; Atchade, A.; Malik, R.; Zulfiqar, A.; Sidiki, N.; Nguimbou, N. & Choudhary, M. (2013). Antinociceptive Pentacyclic Triterpenoids from the Cameroonian Brown Propolis. *Pharmacologia*, 4 (3), 218 – 227.
- Tenorio, F.; Mondragón, L. & Pastelín, G. (2006). Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Archivos de Cardiología de México*, 76 (4), 33 – 45.
- Tolosa, L. & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43:1-2; 187 – 204.
- Tovalino, M.; Sacsquispe, S.; Ceccarelli, J. & Alania-Mallqui, J. (2012). Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. *Revista Estomatológica Herediana*, 22, 50 - 58.
- Tovar Betancourt, N. (2015). Propolis in Dogs: Clinical Experiences and Perspectives (A Brief Review). *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, 11 - 17.
- Valencia, D.; Alday, E.; Robles, R.; Garibay, A.; Gálvez, J.C.; Salas, M.; Jiménez, M.; Velázquez, E.; Hernández, J. & Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131, 645 – 651.
- Vargas-Sánchez, R.; Torrescano-Urrutia, G.; Acedo-Félix, D.; Carvajal-Millán, E.; González-Córdova, A.; Vallejo-Galland, B.; Torres-Llanez, M. & Sánchez-Escalante, A. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patties. *Journal of Food Science*, 79 (8), C1499 – 1504.
- Velázquez, C.; Navarro, M.; Acosta, A.; Angulo, A.; Domínguez, Z.; Robles, R.; Robles-Zepeda, R.; Lugo, E.; Goycoolea, F.M.; Velázquez, E.F.; Astiazaran, H. & Hernández, J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology ISSN*, 1364-5072.
- Velázquez-Meza, M.E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Pública México*, 47, 381 - 387.
- Zavaleta, J.; Muñoz, A.; Blanco, T.; Alvarado-Ortiz, B. & Loja, C. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Acta Médica San Martiniana*, 1 (1), 81 – 85.
- Zhang, X.; Xiong, H. & Liu, L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 206– 211.