



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
UNA MUESTRA DE PROPÓLEO DE LA ZONA MELÍFERA
DEL NORTE DE MÉXICO”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CLAIRIN SAVAGE ANDRÉS



México D. F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	Dr. José Manuel Méndez Stivalet
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dr. Arturo Navarro Ocaña
2do. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química, UNAM

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Asesor del tema

M. en C. Jessica Granados Pineda

Asesora Técnica

Clairin Savage Andrés

Sustentante

ÍNDICE

Lista de Figuras.	I
Lista de Cuadros.	II
Lista de Abreviaturas.	III
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES.	14
2.1. Propóleo.	14
2.1.1. Definición y generalidades.	14
2.1.2. Aspectos históricos.	16
2.1.3. Productos apícolas en México.	18
2.1.4. Recolección de propóleo en México.	19
2.1.5. Composición química del propóleo.	21
2.1.6. Actividad biológica del propóleo.	29
2.2. Cariogénesis.	30
2.2.1. Formación de biofilm.	30
2.3. Generalidades <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus oralis</i> y <i>Streptococcus sanguinis</i> .	32
3. JUSTIFICACIÓN.	34
4. OBJETIVOS.	35
4.1. Objetivos generales.	35
4.2. Objetivos particulares.	35
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	37
5.1. Recolección del propóleo.	37
5.2. Procedimientos generales de análisis.	38

5.2.1. Análisis cromatográficos.	38
5.2.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas.	38
5.3. Estudio químico.	38
5.3.1. Preparación del extracto etanólico.	38
5.3.2. Fraccionamiento primario del EEP de Durango.	39
5.4. Determinación del efecto del EEP sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.	40
5.4.1. Microorganismos de prueba.	40
5.4.2. Determinación de CMI.	40
5.5. Fraccionamiento secundario a partir de la Fx-II derivada del EEP de Durango y purificación de compuestos.	41
5.6. Procedimiento general.	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
6.1. Elección del propóleo.	45
6.2. Caracterización estructural de metabolitos aislados.	46
6.2.1. Caracterización estructural de la pinocembrina (C001).	46
6.2.2. Pinobanksina (C002).	49
6.2.3. Crisina (C003).	52
6.3. Actividad sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus oralis</i> y <i>Streptococcus sanguinis</i> .	54
7. CONCLUSIONES.	56
8. PERSPECTIVAS.	57
9. REFERENCIAS.	58
10. REFERENCIAS ELECTRÓNICA	66

Lista de Figuras.

Figura 1. *Apis mellifera* posada sobre un tronco (Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología UNAM).

Figura 2. Propóleo en bruto. Fotografía de propóleo del mercado de la Virgen, Coyoacán, México D.F, tomada por Andrés Clairin Savage.

Figura 3. Patrón quimio-geográfico de los tipos de propóleos (Salatino *et al.*, 2011).

Figura 4. Regionalización de la producción apícola en México (SAGARPA 2010).

Figura 5. Método para la recolección de propóleo (**A**) Raspado y (**B**) Malla mosquitera (SAGARPA, 2010).

Figura 6. Formación de placa (Johnson y Johnson, 2015).

Figura 7. Zona melífera de Durango (SAGARPA, 2010).

Figura 8. Espectro RMN-¹H de la pinocembrina (**C001**), MeOH-*d*₄, 400 MHz.

Figura 9. Espectro RMN-¹H de la pinobanksina (**C002**), acetona-*d*₆, 400 MHz.

Figura 10. Espectro RMN-¹H de la crisina (**C003**), DMSO-*d*₆, 400 MHz.

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Principales componentes aislados del propóleo

Cuadro 2. Estreptococos de interés en la cavidad oral (Basualdo, 2006).

Cuadro 3. Fraccionamiento primario EEP de Durango.

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario a partir de la Fx-II derivada del extracto etanólico de Durango.

Cuadro 5. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (**C001**).

Cuadro 6. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (**C002**).

Cuadro 7. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (**C003**).

Cuadro 8. CMI's del extracto y fracciones obtenidas del propóleo de Durango.

Lista de abreviaturas.

Abreviatura	Significado
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion)
C+	Control positivo
C-	Control negativo
°C	Grados centígrados
ccf	Cromatografía en capa fina
CL-EM	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CHX	Digluconato de clorhexidina
D	Doblete
δ	Desplazamiento químico
DE	Desviación Estándar

Abreviatura	Significado
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
EtOH	Etanol
EV	Electrón-Volts
Exto	Extracto
Fx	Fracción
H ⁺	Protón
H ₂ O	Agua
IE	Impacto Electrónico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramos
min	Minuto
μL	Microlitro
μmol	Micromol

Abreviatura	Significado
mL	Mililitro
M	Masa
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetros
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH ⁻	Radical hidroxilo
OH ⁻	Ion hidroxilo
-OH	Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Segundo
T	Tiempo
TOF	Tiempo de Vuelo (Time Of Flight)

1. Introducción.

El propóleo es un producto natural de la colmena producido por abejas, las cuales recolectan resinas balsámicas secretadas por distintos árboles y plantas para después mezclarlos con ceras y secreciones salivales propias (Vecchi, 2007).

La complejidad del propóleo es variable, siendo hasta la fecha, reconocidos más de 300 constituyentes en los diferentes tipos de propóleos. Los compuestos fenólicos representan la clase más abundante de compuestos aislados a partir de muestras de propóleo (Falção, 2010).

Otros componentes importantes son las resinas, bálsamos, aceites esenciales, aminoácidos y azúcares (De Castro, 2001). Las resinas contienen compuestos fenólicos y terpenoides y no se le han descrito alcaloides, glucosinolatos ó glucósidos cianogénicos. La composición típica de los propóleos de zonas templadas consiste en flavonoides y ácidos fenólicos, mientras que los provenientes de zonas tropicales contienen fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoilquínicos (Salatino *et al.*, 2011).

Esta complejidad es debida a la presencia de compuestos como los flavonoles, flavonas y algunos derivados de éstos que le dan propiedades de utilidad en farmacología; por lo que el propóleo es considerado un agente antioxidante, modulador del sistema inmunológico (mediante la activación de la vía de los macrófagos Cq1), es conservador y buen cicatrizante (Rey, 2014).

El propóleo contiene constituyentes farmacológicamente activos como los polifenoles, terpenoides y aminoácidos. La presencia de estos compuestos ha determinado que se le atribuyan una gran variedad de actividades biológicas como son: antiinflamatorio, antioxidante e inmunomodulador (Farooqui *et al.*, 2010), así

como actividad antibacteriana contra Gram positivos y Gram negativos (Bogdanov, 2012).

En otros estudios se ha investigado su efecto contra las caries y como enjuague en la formación de placa (Koo *et al.*, 2003). La actividad antibacteriana se atribuye principalmente a la presencia de flavonoides y derivados del ácido caféico (Bosio *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha encontrado que propóleos brasileños y búlgaros tienen actividad antibacteriana por la acción de algunos de sus componentes como son flavonoides, terpenoides y derivados de ácidos grasos. Por último, es importante mencionar que el propóleo inhibe a las glucosiltransferasas, enzimas producidas por *Streptococcus mutans*, microorganismo asociado a la aparición de las caries (Koo, 2003).

La multirresistencia se ha desarrollado debido al uso indiscriminado de antibióticos comerciales comúnmente utilizados para tratar las enfermedades infecciosas. Esta situación, así como la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha llevado a la búsqueda de sustancias antimicrobianas a partir de plantas y otros productos naturales utilizados en la medicina tradicional (Ordoñez *et al.*, 2011). La importancia del proyecto radica en la diversidad que presentan los propóleos en diferentes zonas geográficas y sus usos, tal es el caso del estudio de los propóleos de la zona melífera del Norte de México donde el cual al ser evaluado sobre un panel de bacterias del grupo viridans demostró una buena actividad inhibitoria.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Propóleo.

2.1.1. Definiciones y generalidades.

La abeja europea (*Apis mellifera*) es un insecto que forma parte de la familia Apidae y es común en América del Norte con especial prevalencia en algunas zonas desérticas de Sonora, Coahuila, Durango y Zacatecas (Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología UNAM). Sin embargo, su presencia abarca casi todo el continente (**Figura 1**).



Figura 1. *Apis mellifera* posada sobre un tronco (Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología UNAM).

Las abejas viven en colonias altamente organizadas, dominadas por una abeja reina, zánganos, abejas obreras y larvas. La complejidad de la colmena no solo se limita a su organización, sino también, a los numerosos mecanismos de defensa que posee. En forma similar a lo que ocurre en una ciudad, las abejas combaten invasores microscópicos como bacterias y hongos mediante mecanismos de prevención que permiten mantener a su población sana. Esto es posible gracias a que recubren las paredes de la colmena con una resina natural la cual es conocida como propóleo.

El nombre “propóleo” proviene de los vocablos griegos *pro-* defensa de, y *polis-* ciudad: “defensa de la ciudad o de la colmena” (Niraldo, 2005).

El propóleo es una sustancia resinosa cuyo color es variable y sirve para delimitar la estructura de la colmena y evadir sus depredadores (Bankova, 2005) (**Figura 2**). El color de esta resina puede ser rojo, verde o marrón y es debido a la coloración de los vegetales abastecedores en las diversas regiones de “hábitat” de colecta y a su edad, sin embargo, generalmente oscila entre amarillo-verdoso y marrón oscuro (Burdock, 1998). Por lo general, posee un sabor acre aunque a veces es amargo y tiene un aroma muy semejante al de la miel y las ceras: esta característica se debe a la gran cantidad de componentes volátiles que posee (Niraldo, 2005).



Figura 2. Propóleo en bruto. Fotografía de propóleo del mercado de la Virgen, Coyoacán, México D.F, tomada por Andrés Clairin Savage

El propóleo no solamente sirve a las abejas como material de construcción, sino también usado para embalsamar pequeños animales muertos evitando su putrefacción cuando no pueden ser retirados de la colmena (Niraldo, 2005). Con respecto a la relación del propóleo y la colmena se ha observado que en una colmena recubierta por propóleo, las abejas que habitan en ella tienden a vivir más

tiempo, así como a ser más productivas y contar con una mejor salud (Evans y Pettis, 2005).

Salatino y cols. (2011) clasificaron a los propóleos en diferentes tipos según su composición química, la cual, se encuentra ligada a la fuente natural y a la zona geográfica de recolección. Los propóleos de tipo I son aquellos de clima templado que se caracterizan por contener flavonoides sin sustitución en el anillo B y ésteres de fenilpropanoides. Los de tipo II están representados por el propóleo verde brasileño que contiene fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoilquínicos. Los tipos III son aquellos derivados del género *Clusia*, con benzofenonas polipreniladas. Los tipos IV son los que provienen del género *Macaranga*, contienen geranil flavonoides. Los tipos V son propóleos originarios de Grecia, Creta y Turquía que contienen principalmente diterpenoides o antraquinonas. La distribución geográfica de los tipos de propóleos se ilustra en la **Figura 3**.

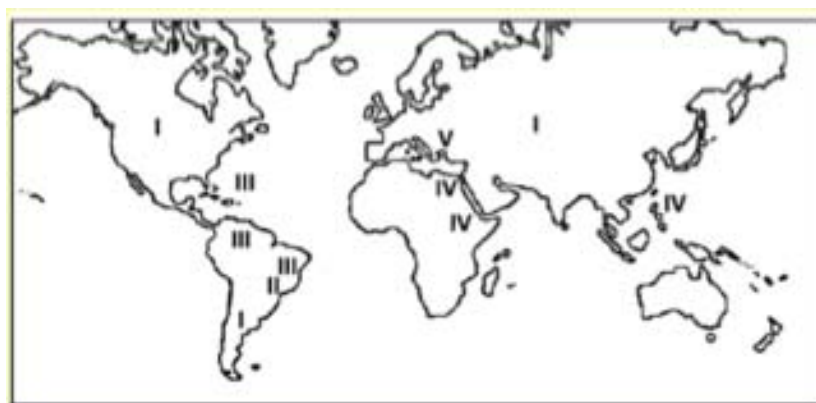


Figura 3. Patrón quimio-geográfico de los tipos de propóleos (Salatino *et al.*, 2011).

2.1.2. Aspectos históricos.

Por su actividad antimicrobiana, antiviral, anti-fúngica, antioxidante, inmunoreguladora, cicatrizante y conservador natural, el propóleo ha sido ampliamente usado por el ser humano a lo largo de los siglos.

Los usos más antiguos reportados se remontan a la época de los egipcios, quienes la utilizaban para embalsamar cadáveres, los incas lo usaban como agente antipirético. Pensadores como Aristóteles, Galeno y Dioscórides, así como médicos de culturas griegas y romanas observaron que poseía propiedades antiinflamatorias, por lo cual fue utilizado para el tratamiento de heridas, úlceras y abscesos (Castaldo *et al.*, 2007).

Los pueblos balcánicos de la edad de bronce lo usaban como remedio contra quemaduras, malestares por infecciones y el tratamiento de ulcera gástrica (Wollenweber *et al.*, 1990).

Antiguos escritos griegos revelan que el propóleo fue usado como remedio contra moretones y llagas supurantes, así como los romanos realizaban cataplasmas a base de propóleo para diferentes dolencias (Cheng y Wong, 1996).

Durante la edad media el propóleo se utilizó como antiséptico y cicatrizante en el tratamiento de heridas, así como desinfectante bucal (Castaldo, 2002). La cultura Inca utilizó este producto como un importante agente antipirético, mientras que las farmacopeas británicas del siglo XVII consideraron al propóleo como una droga oficial (Bankova, 2010).

Textos europeos con más de doce siglos de historia describen preparaciones médicas a base de propóleo la cual era usada para el tratamiento de malestares de boca, lengua y caries (Metzner, 1977).

Finalmente, a partir de 1900 el propóleo fue utilizado como desinfectante (Nirardo, 2005) y cicatrizante, esta última propiedad fue aprovechada en África, hace más de 90 años, combinando el propóleo con vaselina para confeccionar pomadas (Marcucci, 1996).

En México existen antecedentes de la actividad apícola principalmente en el sudeste del país, con más de 3000 años en la cultura Olmeca, sin embargo es en la cultura Maya donde hay mayores datos sobre sus prácticas apícolas que incluso se siguen utilizando hasta nuestros días (SAGARPA, 2010).

2.1.3. Productos apícolas en México.

La disposición de recursos como el néctar y el polen, así como la tradición en la práctica de la apicultura, conllevan a la concentración de esta actividad hacia algunas entidades del país, condición que muestra pocos cambios en el pasado reciente y que se estima continuará prevaleciendo en el futuro cercano.

Independientemente de lo anterior, en México se distinguen cinco regiones apícolas bien definidas por la flora nectarpolinífera y la existencia de explotaciones apícolas: (1) Región del Altiplano, (2) Costa del Pacífico, (3) Golfo de México, (4) Región Norte y (5) Península de Yucatán (**Figura 4**),



Figura 4. Regionalización de la producción apícola en México (SAGARPA, 2010).

La Región Norte es caracterizada por la excelente miel que produce, principalmente de mezquite, con un fuerte mercado en los Estados Unidos de Norteamérica. El precio de la miel producida en esta Región es el mejor pagado.

La Región Costa del Pacífico se identifica por producir mieles de origen multifloral y de mangle, siendo principalmente obscuras, aunque también se obtienen mieles ámbar y ámbar claros. En esta Región existe una fuerte práctica de la polinización. La Región del Golfo destaca por poseer una gran producción de miel de cítricos, destacando la miel ámbar clara que se produce principalmente del naranjo, aunque también se obtienen mieles multifloras de colores de clara a oscura. Por su parte, la Región del Centro o Altiplano, se distingue por tener mieles ámbar y ámbar clara, así como la denominada mantequilla, que por su presentación es altamente codiciada, destinándose en su mayoría al consumo interno.

La Región del Sureste o Península de Yucatán, sin lugar a dudas es la más importante en producción de miel, es ahí donde se concentra la mayor parte de la producción y también de los productores. La miel de esta zona goza de gran prestigio nacional e internacional, ya que se caracteriza por tener su origen en floraciones únicas, como de *Tzitzilche* en una época y en la otra miel de Tajonal, destinándose en su mayoría al mercado de la Unión Europea.

Al igual que en cualquier otra de las ramas de la producción agropecuaria, la infraestructura de acopio y procesamiento guarda una gran relevancia y de su operación depende en gran medida la calidad higiénica del producto, así como los precios liquidados al productor, ya que su ubicación, repercute directamente en los costos de traslado (SAGARPA, 2010).

2.1.4. Recolección de propóleo en México.

En forma conjunta a la obtención de miel y cera, en los últimos años, los productores han buscado la forma de obtener un mayor valor de actividad,

incorporando para ello la obtención de polen, jalea real, propóleos y veneno de abeja, los cuales son vendidos en bruto o bien, transformados por ellos mismos hacia productos farmacéuticos y de belleza, así como incorporados a algunos complementos alimenticios (SAGARPA, 2010).

La recolección del propóleo es un paso primordial para su comercialización y análisis, paso en el cual hay diferentes métodos.

El propóleo se recoge utilizando trampas o raspado de las colmenas en la malla mosquitera [**Figura 5 (A) y (B)**]. El atrapado es el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación de esta resina. La recolección se hace antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales, al inicio de la estación lluviosa, cuando la propolización parece más activa (Farré *et al.*, 2004). Su procesamiento comercial comprende tres pasos:

-El primer paso es la evaluación del material. Si es muy ceroso se somete a un lavado con agua fría para remover las ceras. El propóleo remanente se seca con aire en pantallas de acero inoxidable.

-El segundo paso involucra su disolución en etanol al 95%, las ceras restantes y las partes de abejas son removidas.

-El último paso involucra la filtración para eliminar cualquier otro material ajeno (Burdok, 1998).



(A)



(B)

Figura 5. Método para la recolección de propóleo (A) Raspado y Malla mosquitera (B) (SAGARPA, 2010).

2.1.5. Composición química del propóleo

El propóleo es un producto natural rico en constituyentes bioactivos. Su composición química es muy compleja y depende en gran medida de la flora correspondiente a las zonas donde es recolectado. Más de 300 compuestos han sido identificados en muestras de propóleo crudo de diferentes orígenes (Salatino *et al.*, 2005), incluyendo polifenoles, terpenos, esteroides, azúcares y aminoácidos (Kumazawa *et al.*, 2004 Kalogeropoulos *et al.*, 2009).

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

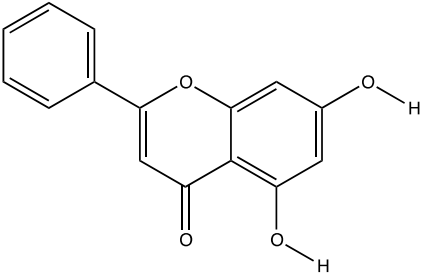
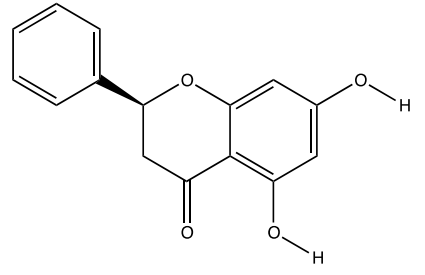
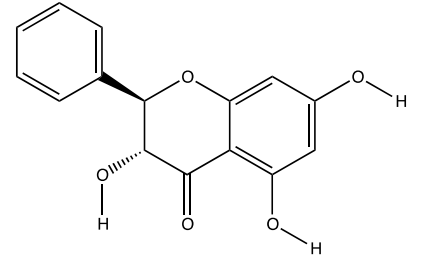
La localización geográfica y la flora presente determina la composición del propóleo, por ejemplo, el propóleo de Europa predominantemente contiene flavonoides y ésteres de ácido fenólico (Popova *et al.*, 2009).

El propóleo al ser uno de los materiales más heterogéneos de la naturaleza además de contener flavonoides contienen ácidos fenol-carboxílicos modificados bioactivos en contra de patógenos humanos, además estos compuestos también tienen actividad antiulcerosa, antiinflamatoria y antitumoral. En la estructura del propóleo de diferentes regiones del planeta se han caracterizado más de 4000 tipos de flavonoides con actividades biológicas (Adelmann, 2006).

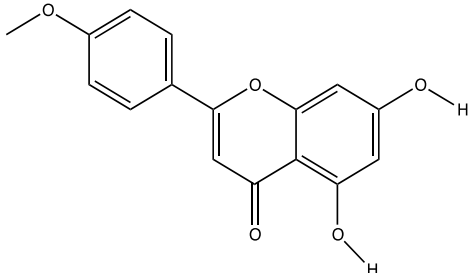
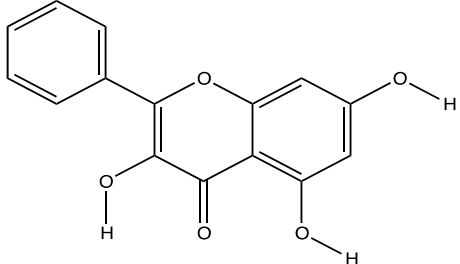
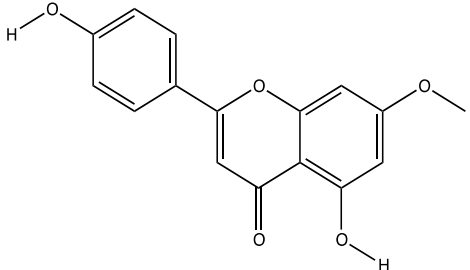
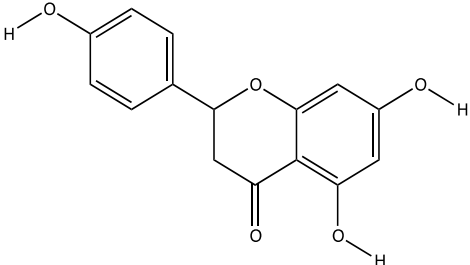
Los flavonoides (flavonas, flavonoles y flavanonas) son el grupo de compuestos mayoritariamente aislados del propóleo. Son químicamente clasificados de acuerdo a la presencia o no del anillo C, la doble ligadura entre los carbonos C-2 y C-3 en el anillo y de un grupo hidroxilo en C-3 (Niraldo, 2005).

En el **Cuadro 1** se muestran las estructuras de algunos de los flavonoides y compuestos con importancia terapéutica aislados a la fecha a partir de muestras de propóleos de diferentes orígenes.

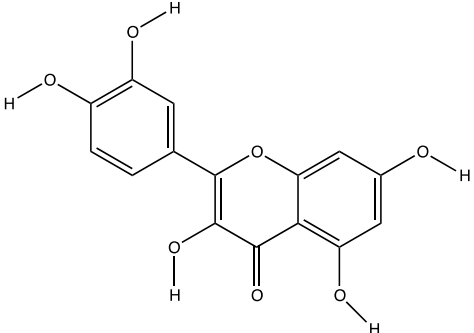
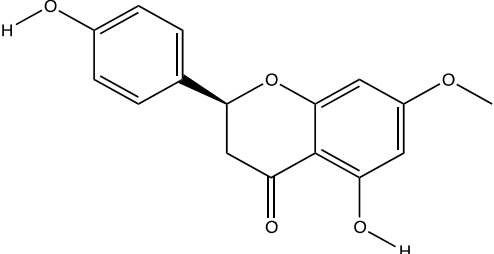
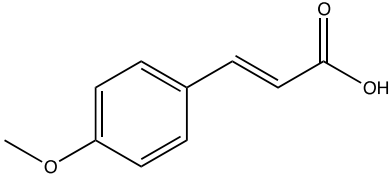
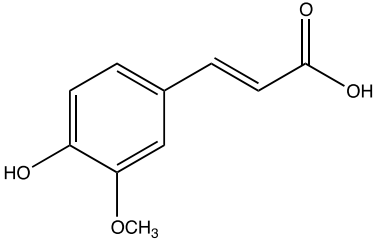
Cuadro 1. Principales componentes aislados en el propóleo

Nombre del compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
FLAVONOIDES			
Crisina		China Holanda Chile	Yang <i>et al.</i> , 2015. Popova <i>et al.</i> , 2007. Castro <i>et al.</i> , 2014.
Pinocembrina		China Corea Canadá Australia Portugal Rumania México España	Yang <i>et al.</i> , 2015. Kim <i>et al.</i> , 2011. Cottica <i>et al.</i> , 2015. Massaro <i>et al.</i> , 2015. Ahn <i>et al.</i> , 2007. Falção <i>et al.</i> , 2010. Valencia <i>et al.</i> , 2012. Kumazawa <i>et al.</i> , 2004.
Pinobanksina		Chile Grecia Chipre Corea	Castro <i>et al.</i> , 2014. Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009 Kim <i>et al.</i> , 2011.

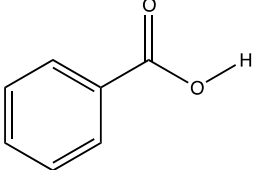
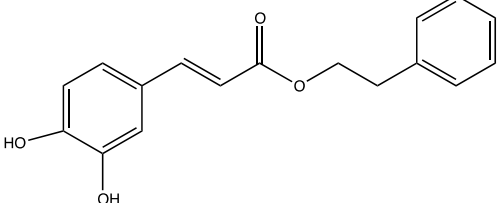
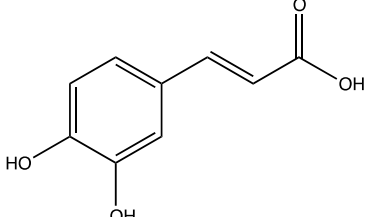
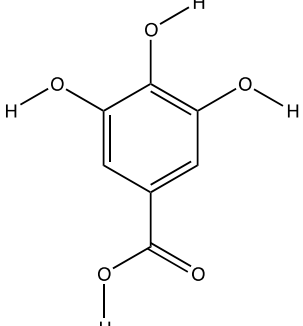
Cuadro 1. Principales componentes aislados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
Acacetina		México	Valencia <i>et al.</i> , 2012.
Galangina		China Chile Corea	Yang <i>et al.</i> , 2015. Castro <i>et al.</i> , 2014. Kim <i>et al.</i> , 2011.
Genkwanina		China	Yang <i>et al.</i> , 2015.
Naringenina		China Turquía	Yang <i>et al.</i> , 2015 Atac-Uzel <i>et al.</i> , 2005.

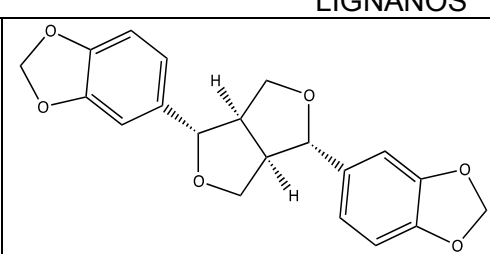
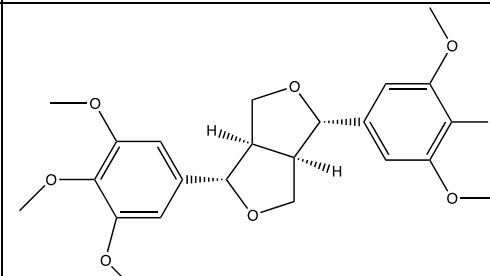
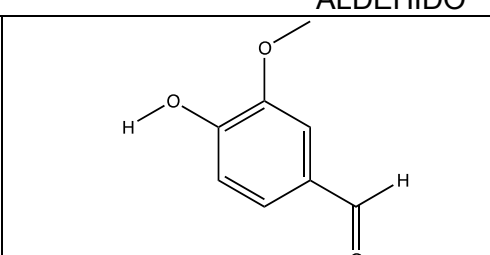
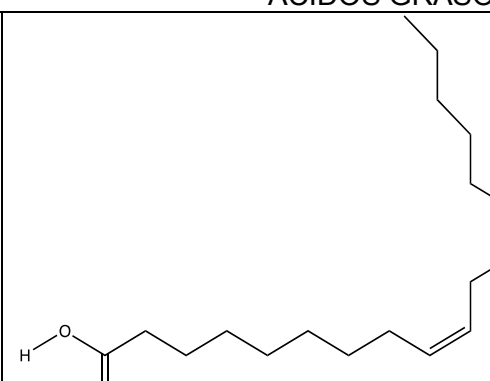
Cuadro 1. Principales componentes aislados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
Quercetina		Corea	Kim <i>et al.</i> , 2011.
Sakuranetina		Corea	Kim <i>et al.</i> , 2011.
ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÉSTERES			
Ácido cinámico		China	Yang <i>et al.</i> , 2015.
Ácido ferúlico		China Corea Chile	Yang <i>et al.</i> , 2015. Kim <i>et al.</i> , 2011. Castro <i>et al.</i> , 2014.

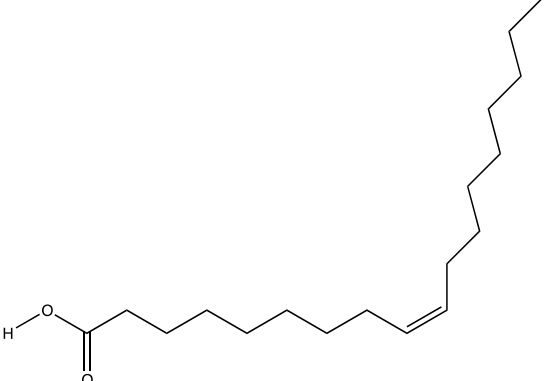
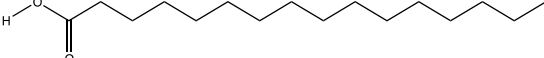
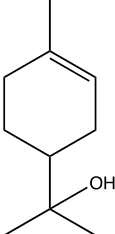
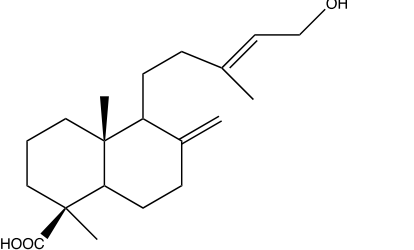
Cuadro 1. Principales componentes aislados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
Ácido benzoico		Turquía	Atac-Uzel <i>et al.</i> , 2007.
CAPE (Feniletíl éster del ácido caféico).		China Chile	Yang <i>et al.</i> , 2015. Castro <i>et al.</i> , 2014.
Ácido caféico		Chile	Castro <i>et al.</i> , 2014.
Ácido gálico		Canadá Australia	Cottica <i>et al.</i> , 2015. Massaro <i>et al.</i> , 2015.

Cuadro 1. Principales componentes aislados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
LIGNANOS			
Sesamina		Bulgaria	Bankova <i>et al.</i> , 2000.
Yangambina		Bulgaria	Bankova <i>et al.</i> , 2000.
ALDEHÍDO			
Vainillina		Chile	Castro <i>et al.</i> , 2014.
ÁCIDOS GRASOS			
Ácido linoléico		Turquía	Atac-Uzel <i>et al.</i> , 2005.

Cuadro 1. Principales componentes aislados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
Ácido oléico		Corea	Chang <i>et al.</i> , 2003.
Ácido palmítico		China	Yang <i>et al.</i> , 2015.
TERPENOIDES			
Terpineol		Brasil	Koo <i>et al.</i> , 2005.
Ácido isocuprésico		Brasil	Koo <i>et al.</i> , 2005.

2.1.6. Actividad biológica del propóleo.

El propóleo contiene constituyentes farmacológicos activos como polifenoles, terpenoides y aminoácidos, por lo que se le atribuyen una gran variedad de actividades biológicas importantes como antiinflamatorio, antioxidante e inmunomodulador (Farooqui *et al.*, 2010), así como actividad antibacteriana contra Gram positivos y Gram negativos (Bogdanov, 2012).

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

Se han reportado que el propóleo posee actividad antiulcérica, citostática, hepatoprotectora, inmunomoduladora (Basim *et al.*, 2006), bacteriostática, espasmolítica (Burdok, 1998), antihipertensiva (Niraldo, 2005), regeneradora del tejido cartilaginoso y tejido óseo, además de tener acción desintoxicante en el hígado (Marcucci, 1996).

Además, el propóleo es de especial importancia para el estudio de nuevos tratamientos contra enfermedades periodontales ya que el propóleo inhibe las glucosiltransferasas, enzimas producidas por *Streptococcus mutans*, microorganismo que con mayor frecuencia es causante de enfermedades periodontales como la caries (Koo, 2003). Esto lleva a plantear al propóleo como un producto de origen natural con una gran capacidad terapéutica para las enfermedades periodontales las cuales afectan a la gran mayoría de la población mexicana, entre las cuales se encuentra la tan común y muy conocida caries dental.

2.2. Cariogénesis.

La cariogénesis es un proceso patológico por el cual la placa dentobacteriana produce daños estructurales tanto a la dentina como al esmalte del diente, eso puede ocasionar el deterioro de la salud bucal y la posible pérdida de una pieza dental (Kouidhi, 2010).

2.2.1. Formación de biofilm.

El biofilm consiste en un agregado de microorganismos y polisacáridos (glicocálix), el cual es producido por los mismos microorganismos para adherirse a superficies sólidas. El glicocálix es el “pegamento” que sostiene firmemente la biocapa a la superficie colonizada y es un complejo de exopolisacáridos de origen bacteriano, atrapa sustancias exógenas del ambiente incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, minerales, nutrientes, material de pared celular, etc. (Dunne, 2002).

En la cavidad oral, el biofilm es llamado placa dental y es un factor para la caries dental. El biofilm se forma y adapta por varios factores ambientales dentro de la cavidad oral, tales como pH, cantidad de sustrato para las bacterias y la cantidad de glucoproteínas ácidas que están presentes en la saliva. La película se adhiere específicamente a la hidroxiapatita, una sal cristalina de fosfato de cálcico, la presencia de esta película promueve la posterior adherencia selectiva de ciertas bacterias a la superficie dental (Burrows, 1983). Estas bacterias con capacidad de adherencia a tejidos blancos son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* que se adhieren al esmalte debido a la producción de polisacáridos extracelulares insolubles. Además de los factores de adherencia propios de las bacterias mencionadas, la matriz de la placa dental proporcionará un ambiente protegido para aquellas bacterias que no posean mecanismo de adherencia como *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Treponema*. (Basualdo, 2006).

Streptococcus mutans es una bacteria cariogénica que juega un papel muy importante dentro de la formación de biofilm en ambientes con grandes cantidades de sacarosa (Burrows, 1983). La dieta es muy importante para que *Streptococcus mutans* produzca placa dental; una dieta rica en carbohidratos causa que estos sea fermentados y se produzca ácido láctico, lo que ocasiona que el diente comience a desmineralizarse y se establezcan las condiciones idóneas para la producción de placa (Kouidhi, 2010). En estos procesos desempeñan un papel importante los polisacáridos extracelulares, en especial los glucanos producidos por las bacterias, particularmente el *Streptococcus mutans*; y por lo tanto, la síntesis de estos polímeros constituye un factor de virulencia en el desarrollo de la caries dental (Kumari, 2008). Tanto el glucano insoluble (denominado mutano) como la glucosiltransferasa participan en las interacciones mediante adhesinas dependientes de sacarosa (Kouidhi, 2010).

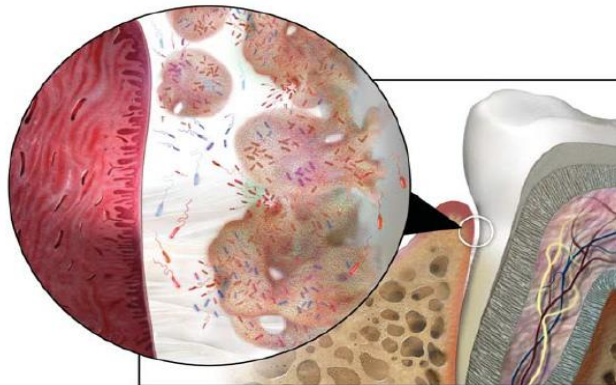


Figura 6. Formación de placa dentobacteriana (Johnson y Johnson, 2015).

2.3. Generalidades *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Los *Streptococcus* son bacterias aisladas generalmente de la cavidad bucal, estas son cocos gram positivos, habitualmente no hemolíticos, aunque existen especies hemolíticas pero estas son un caso especial.

Los estreptococos de importancia en la cavidad bucal utilizados en la parte experimental de este estudio forman parte de los siguientes grupos (Basualdo, 2006):

-Grupo mitis/oralis: Este grupo es parte común de la placa dental. Debido a que se adhiere con facilidad a la superficie dental con la formación de glucano extracelular, a este grupo pertenecen *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguis*.

-Grupo mutans: El grupo mutans incluye a las bacterias consideradas como participantes de lesión de caries inicial en diente. Se reconocen varios serotipos que van desde la a hasta la h, donde los serotipos c y d que son los más frecuentes implicados en la caries dental. En este grupo se encuentra *Streptococcus mutans* (Basualdo, 2006).

En el **Cuadro 2** se muestran algunas características de los *Streptococcus* ocupados en la investigación:

Cuadro 2. Estreptococos de interés en la cavidad oral (Basualdo, 2006).

Grupo	Especie	Sero- grupo Lancefield	Hemólisis sangre de carnero	Hábitat humano	Poder patógeno humano
Mutans	<i>Streptococcus mutans</i>	---	α, γ (β)	Orofaringeo- intestino	Caries, placa dental, endocarditis
Mitis/oralis	<i>Streptococcus sanguis</i>	H,W	α	Orofaringeo- piel-intestino	Placa dental- endocarditis, heridas- abscesos.
Mitis/oralis	<i>Streptococcus oralis</i>	---	α	Orofaringeo- piel	Similar a <i>Streptococcus sanguis</i>

*La hemólisis β es hemólisis completa, la hemólisis α es hemólisis parcial y γ hemólisis es ausencia de hemólisis. En *Streptococcus mutans* los tres tipos de hemólisis están presentes pero es más común la β hemólisis.

3. JUSTIFICACIÓN.

La creciente demanda de productos naturales en el mercado (OMS, 2010) aumentada por el incremento de la resistencia bacteriana en contra de los medicamentos alopáticos así como las marcadas características alergénicas de estos han llevado a la comunidad científica a investigar y desarrollar nuevas formas terapéuticas para combatir esta creciente amenaza.

La actividad antibacteriana del propóleo, la cual es conocida por el hombre desde tiempos muy antiguos (Ghisalberti, 1978; Bankova *et al.*, 2000), la eficiencia de productos de origen natural junto a su baja incidencia en efectos colaterales indeseables han llevado a proponer que los productos naturales sean los nuevos productos del futuro en contra de agentes microbianos, claro sin descartar también el desarrollo paralelo de antibióticos nuevos, lo cual conllevaría a la humanidad a tener una mayor cantidad de cartas en la baraja de la salud para combatir las infecciones bacterianas.

Investigaciones previas han demostrado la eficacia del propóleo contra bacterias patógenas, hongos, virus (Amoros *et al.*, 1994), así como una amplia gama de actividades farmacológicas, lo hacen uno de los productos naturales más prometedores para la búsqueda de compuestos antibacterianos.

Las características químicas del propóleo dependen de la localización geográfica, la flora, el clima y la relación de esto con las estaciones del año (Kujumgiev *et al.*, 1999; Bankova, De Castro, y Marcucci, 2000; Ahn *et al.*, 2007) por lo cual es muy probable que en este estudio se encuentren componentes no descritos previamente en el propóleo mexicano. En este sentido es importante mencionar que la localización geográfica de nuestro país permite una gran diversidad de ecosistemas y de flora endémica. Esta diversidad hace única a cada muestra de propóleo recolectada en las diferentes zonas melíferas del país.

Por último, es importante mencionar que en la actualidad las enfermedades bucales en México son de especial importancia para la salud pública, ya que por la alimentación y sedentarismo de nuestra sociedad, este tipo de enfermedades han ido en aumento, sobre todo en niños. Esto es un serio problema ya que la caries es causante de pérdidas de piezas dentales a edades tempranas, así como posibles complicaciones que podrían poner en riesgo la vida del paciente con caries. Estas causas aunadas a la razón científica de explorar y descubrir nuevas terapias para el tratamiento de estas enfermedades hacen a los propóleos de la zona melífera del Norte de México muy atractivos para su estudio.

4. Objetivos.

4.1. Objetivos generales:

- 1.- Aislar compuestos mayoritarios del EEP de la zona melífera del Norte de México.
- 2.- Cuantificar la actividad antimicrobiana del EEP de la zona melífera del Norte de México.

4.2. Objetivos particulares:

- 1.- Recolectar una muestra de propóleo de la zona melífera del Norte de México.
- 2.- Preparar el extracto etanólico de propóleo.
- 3.- Realizar el fraccionamiento primario y secundario del EEP.
- 4.- Determinar capacidad antibacteriana mediante el análisis de concentración mínima inhibitoria contra *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mutans*.

5.- Aislar y purificar los compuestos activos.

6.- Caracterizar los compuestos purificados utilizando métodos espectrométricos y espectroscópicos.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.1. Recolección del propóleo.

El propóleo muestra fue recolectado en la zona de la Comarca Lagunera en el Estado de Durango (25° 05' y 26° 54' latitud norte y 101° 40' y 104° 45' longitud oeste) con un promedio de 235 mm de lluvia, una altitud de 1 139 msnm y una temperatura media anual de 18.6 °C (Schmidt, 1989).

El mosaico ecológico más importante es el matorral desértico micrófilo asociado a la vegetación secundaria. El mezquite es la especie silvestre más prominente para la apicultura en la Comarca Lagunera. Por otra parte, la alfalfa, los cultivos forrajeros anuales y los hortícolas conformaron el conglomerado vegetal cultivado de mayor importancia para las abejas melíferas en esta región.

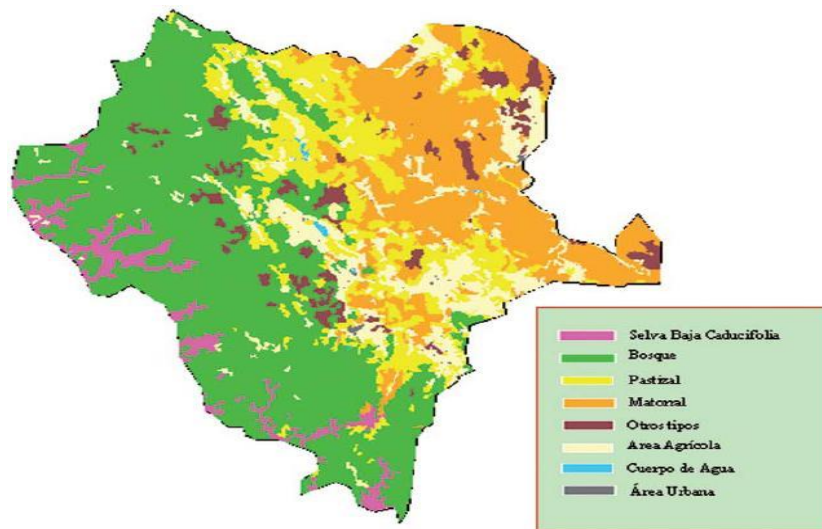


Fig. 3. Distribución de las comunidades vegetales en el estado de Durango.
Fuente: Datos vectoriales de uso del suelo y vegetación,
Escala 1: 1 000 000. Serie II, INEGI. 1998.

Figura 7. Zona melífera de Durango (SAGARPA, 2010).

5.2. Procedimientos generales de análisis.

5.2.1. Análisis cromatográficos.

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 (Merck), Sephadex LH-20 (Fluka) y poliamida-6.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F254 Merck, tamaño de partícula 0.063 - 0.200 mm) en diversos tamaños y sistemas de elución. Se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254$ nm y 315 nm, posteriormente se revelaron con vainillina sulfúrica (a 100 °C).

5.2.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas.

Los espectros de masas se generaron en un equipo Agilent 6890L por impacto electrónico (IE) a 70 EV y el analizador másico de tiempo de vuelo (TOF).

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron de un equipo Varian, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se disolvieron en $\text{DMSO-}d_6$, $\text{MeOH-}d_4$ y acetona- d_6 , según el caso. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al TMS.

5.3. Estudio químico.

5.3.1. Preparación del extracto etanólico.

Se realizó la obtención del extracto etanólico a partir de 80 gramos de la muestra de propóleo de Durango en “bruto” utilizando un método de extracción continua en un equipo Soxhlet con 500 mL de etanol. Como resultado de este proceso se obtuvieron 43.8 gramos del extracto etanólico.

5.3.2. Fraccionamiento primario del EEP de Durango.

Se sometieron 43.8 gramos de extracto etanólico a un fraccionamiento primario utilizando una columna a presión reducida VLC (5 × 40 cm) utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como eluyente un gradiente de concentración de la mezcla de disolventes CH₂Cl₂-acetona (100:0 a 0:100).

Del fraccionamiento primario se obtuvieron 34 fracciones (45 mL) que se reunieron por similitud cromatográfica a partir de un análisis de cromatografía en capa fina para dar un total de 10 fracciones primarias combinadas del extracto etanólico del propóleo de Durango.

Las fracciones primarias provenientes del EEP fueron usadas para determinar la actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Para el estudio fueron utilizadas las fracciones Fx-I, Fx-II, Fx-III, Fx-IV, Fx-V y Fx-Zacatecas I y II. En el **Cuadro 3** se describe el fraccionamiento primario y las fracciones obtenidas:

Cuadro 3. Fraccionamiento primario del EEP de Durango.

Cantidad de Fracciones	Disolvente	Proporción %	Fracción Principal
1-4	CH ₂ Cl ₂	100	Fx-I
5-8	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	99:1	Fx-II
9	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	98:2	Fx-III
10-13	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	95:5	Fx-IV
14-15	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	90:10	Fx-V
16-19	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	80:20	Fx-VI
20-23	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	70:30	Fx-VII
24-27	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	50:50	Fx-VIII
28-31	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	30:70	Fx-IX
32-34	Acetona	100	Fx-X

5.4. Determinación del efecto del EEP sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.

5.4.1. Microorganismos de prueba.

Se utilizaron los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10499), *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis* (aislados de pacientes clínicos) previamente identificados. Para reactivar las bacterias se inocularon 50 µL de una suspensión de bacterias en glicerol en 5 mL de caldo BHI y se incubaron los tubos por un periodo de 24 h, a 37°C.

5.4.2. Determinación de CMI.

El valor de CMI fue definido como la mínima concentración del compuesto de prueba que no permitió el desarrollo de la bacteria, que visualmente se interpreta como la ausencia de turbidez en el medio.

La actividad antibacteriana de las fracciones primarias obtenidas se determinó utilizando las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* y un método de microdilución en placa de 96 pozos siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory For Standards Institute, 2006). Para el análisis de concentración mínima inhibitoria se utilizaron tres placas de 96 pozos, en cada una se determinaron por triplicado las CMI's para *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*. Se prepararon soluciones stock de cada fracción pesando 16 mg de cada una y se llevaron a 1.3 mL de agua destilada (concentración inicial fue de 12.30 mg/mL). Para realizar el ensayo se llenaron todos los pozos con 100 µL de medio BHI., posteriormente, se colocaron 100 µL de todas las fracciones y se procedió a realizar el mezclado y diluciones seriadas de cada pozo. Como paso siguiente se agregaron 80 µL de medio BHI enriquecido con glucosa al 1% y 20 µL del medio BHI con bacterias viables de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* con una concentración de 1×10^6 UFC. Los controles utilizados fueron medio BHI como control negativo y como control positivo digluconato de clorhexidina (CHX). Las placas se incubaron por 24 h a una temperatura 37 °C.

La fracción Fx-II presentó la mejor actividad antibacteriana y por esta razón se decidió continuar con el análisis químico de la misma.

5.5. Fraccionamiento secundario a partir de la Fx-II derivada del EEP de Durango y purificación de los compuestos.

La fracción Fx-II se concentró a sequedad con la ayuda del rotavapor y se obtuvo residuo pegajoso con un peso de 22.03 gramos. Una porción de este residuo se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna al vacío (VLC), utilizando gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de CH₂Cl₂-acetona en gradiente de polaridad. Este proceso permitió la obtención de 29 fracciones las cuales se reunieron de acuerdo con su similitud cromatográfica

en 10 fracciones combinadas. Las fracciones Fx-I y Fx-II se concentraron y se recrystalizaron de CH₂Cl₂-acetona 1:1 en frío. Como resultado de este proceso se obtuvo un sólido blanco (2.013 gramos) que se denominó compuesto **C001**.

Las fracciones Fx-III y Fx-IV se concentraron y se recrystalizaron de CH₂Cl₂-acetona 1:1 en frío. Como resultado, se obtuvo un sólido de color verde cristalino denominado **C002** (0.7113 gramos). Al realizar una cromatografía de capa fina usando como sistema CH₂Cl₂-acetona 98:2 y 90:10 se obtuvieron dos bandas distintas (B1 y B2), lo que demostró la presencia de dos compuestos.

Para separar la mezcla de flavonoides presentes en el **C002** se optó por usar una columna de poliamida-6 como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de disolventes EtOH-H₂O en gradiente de concentración 1:1.

Se colectaron 35 fracciones, de las cuales las fracciones 1 a 13 se reunieron por similitud cromatográfica, así como las fracciones 14 a 33. De la fracción 1-13 se obtuvieron cristales transparentes, mientras que de las fracciones 14-33, un sólido amarillo. Ambos sólidos se caracterizaron por medio de RMN-¹H como Fx-(1-13) pinobanksina **C002** y para Fx-(14-33) crisina **C003**.

La Fx-V se concentró a sequedad mediante el rotaevaporador y se recrystalizó con una mezcla de disolventes CH₂Cl₂-acetona en frío. Como resultado se obtuvo un sólido amarillo cristalino (0.2 gramos). Al realizar una cromatografía de capa fina usando como sistema CH₂Cl₂-acetona 80:20 se obtuvieron dos bandas distintas (B1 y B2), lo que demostró la presencia de dos compuestos. Para la separación se utilizó una columna Sephadex LH-20 como adsorbente y con fase móvil MeOH-H₂O 1:1.

En el proceso se obtuvieron 30 fracciones que se juntaron por similitud cromatográfica en las fracciones Fx-(12-16) y Fx-(20-25). Ambas fracciones

principales fueron concentradas a sequedad a través del rotaevaporador y se recrystalizaron con metanol frío.

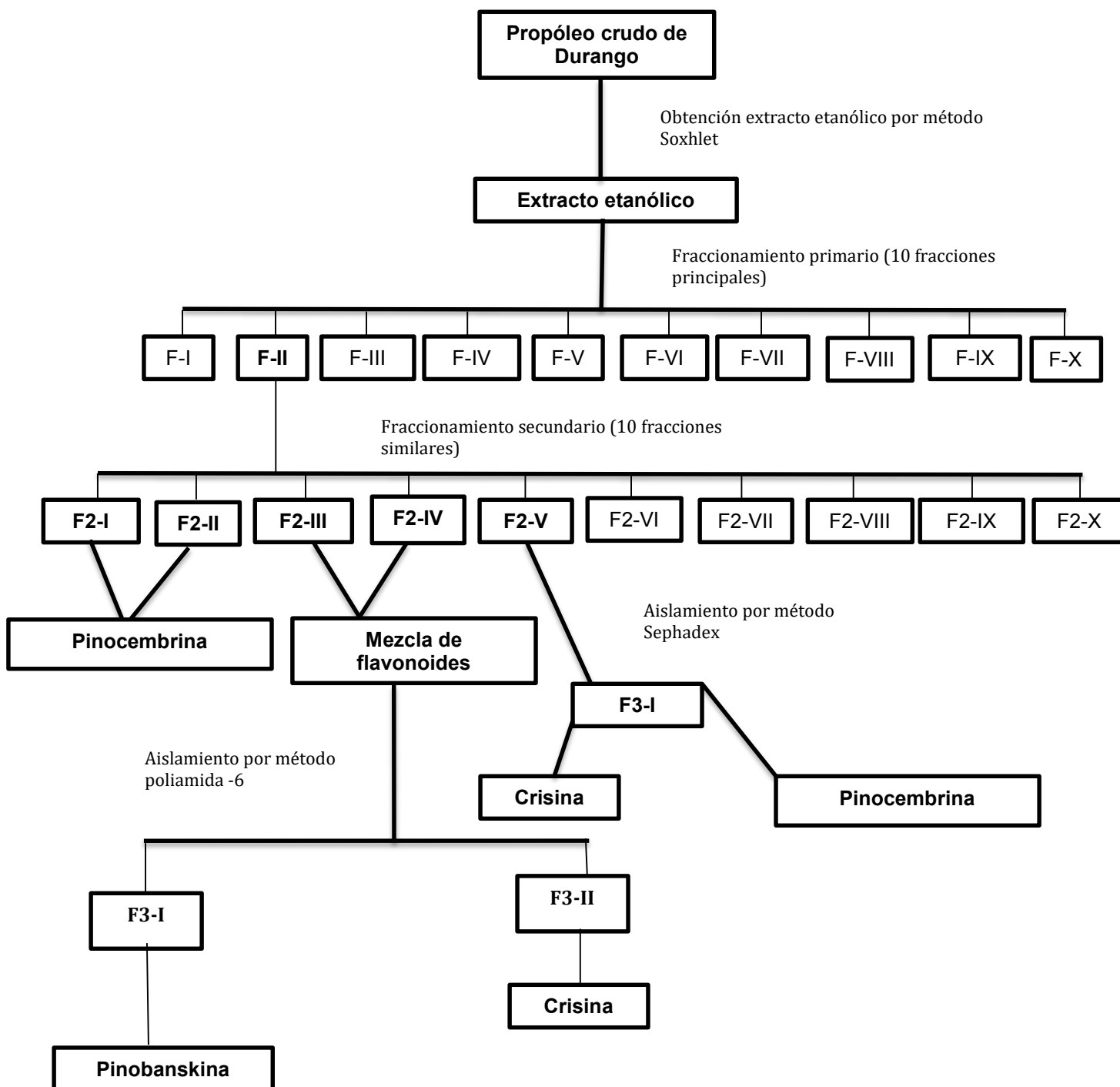
De las fracciones Fx-(12-16) se obtuvo un sólido blanco cristalino (0.1 g) y de las fracciones Fx-(20-25) se obtuvo un sólido cristalino amarillo (0.080 g).

Ambos compuestos se caracterizaron por medio de RMN-¹H dando como resultado Fx-(12-16) pinocembrina **C001** y para Fx-(20-25) crisina **C003**. En el **Cuadro 4** se describe las fracciones obtenidas en el fraccionamiento secundario así como las proporciones de los disolventes utilizados como eluyentes.

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario a partir de la Fx-II derivada del extracto etanólico de Durango.

Cantidad de fracciones	Disolvente	Proporción %	Fracción Principal
1-2	CH ₂ Cl ₂	100	Fx-I
3-4	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	98:2	Fx-II
5-11	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	95:5	Fx-III
12-14	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	90:10	Fx-IV
15-17	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	80:20	Fx-V
18-21	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	70:30	Fx-VI
22-24	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	60:40	Fx-VII
25	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	50:50	Fx-VIII
26	CH ₂ Cl ₂ -Acetona	30:70	Fx-IX
27-29	Acetona	100	Fx-X

5.6. Procedimiento general.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Elección del Propóleo

El propóleo debido a que posee numerosos usos en la medicina tradicional y que los estudios sobre producto natural en México son escasos. A la fecha la mayor parte de los estudios se han hecho con muestras de propóleo provenientes de Europa, Brasil y Cuba (Bankova *et al.*, 2000; Salatino *et al.*, 2011), sin embargo, hay pocos estudios conducentes a determinar la composición química y las actividades farmacológicas de los propóleos mexicanos (Velázquez *et al.*, 2012).

Las características de la zona donde se recolectó el propóleo son similares a las de regiones templadas con inviernos definidos, temperaturas inferiores a 0 °C, precipitaciones escasas y producción de miel moderadas de 25 a 50 kg (Reyes y Cano, 2003). La Comarca Lagunera cuenta con 6092 colmenas y cuyo valor de la producción alcanzó los 9.7 millones de pesos (SAGARPA, 2010).

La vegetación corresponde en las partes altas de las sierras a pinos (*Pinus spp.*), pinabetes (*Tamarix pentandra Pallas*) y encinos (*Quercus spp.*), mientras que en las partes bajas predominan mezquite (*Prosopis juliflora Sw. DC.*), huizache (*Acacia farnesiana (L.) Willd.*), yucas (*Yucca spp.*), nopales (*Opuntia spp.*), maguey (*Agave asperrima Jacobi*), diversos cactus, gobernadora (*Larrea divaricata Cav.*) y lechuguilla (*Agave lechuguilla Torr.*) (INEGI, 2001).

Gran parte de esta flora es utilizada por la colonia como fuente de alimento por lo cual es importante su identificación botánica para enfocar el desarrollo de la actividad apícola en esas especies de interés (Sayas y Huamán, 2009) considerando que el rango de vuelo de una abeja puede ser mayor a los 10 km (Von Frisch, 1976).

En el presente proyecto de investigación se realizó el estudio químico y se determinó la actividad antibacteriana del EEP recolectado en el municipio de Gómez Palacio, en la zona melífera de la comarca lagunera en Durango, utilizando el método de raspado.

6.2. Caracterización estructural de metabolitos aislados

El estudio químico del extracto etanólico del propóleo de Durango condujo al aislamiento de los flavonoides pinocembrina, crisina y pinobanksina.

Para la caracterización de las estructuras químicas de los compuestos aislados se usaron métodos espectroscópicos y espectrométricos. A continuación se discutirá, a modo de ejemplo, la caracterización estructural de pinocembrina en el punto **6.2.1**. Los datos de RMN-¹H para este compuesto se muestran en el **Cuadro 5**, mientras que para los datos de pinobanksina y crisina en los **Cuadros 6 y 7**, respectivamente.

6.2.1. Caracterización estructural de la pinocembrina.

La pinocembrina (**C001**) es una flavanona que se ha identificado en propóleos australianos (Massaro, 2014), chinos (Yang, 2015) y mexicanos (Hernández *et al.*, 2007). Además, la pinocembrina ha demostrado tener actividad anti-estafilocócica (Massaro, 2014) y antioxidante (Cottica, 2015), así como, una potente actividad antibacteriana (Adelmann, 2007). En este trabajo la pinocembrina se aisló como un sólido blanco y su fórmula molecular se estableció como C₁₅H₁₂O₄ con base en su espectro de masas que mostró un ion molecular de *m/z* 256. En el **Cuadro 5** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN-¹H para el compuesto.

A continuación se describen las características más importantes de su espectro de RMN-¹H:

1. En δ_H 7.48 (2H) se observó un doblete que integró para dos protones con una $J= 8.0$ Hz asignable a los protones de las posiciones H-2' y H-6' en δ_H 7.41 (3H) un multiplete que integró para tres protones asignables a los protones H-3'-H-5' del anillo B del flavonoide.

2. En δ_H 5.90 (1-H, d, $J= 4.0$ Hz, H-6) y en δ_H 5.93 (1-H, d, $J= 4.0$ Hz, H-8) se observó un sistema AB consistente con la presencia un anillo aromático tetrasustituido. Estas señales son asignables a los protones H-6 y H-8 del anillo A del flavonoide.

3. Por último, en δ_H 3.10 (1-H, dd, $J= 2.0$ Hz, H-3b) y 2.76 (1-H, dd, $J= 2.0$ Hz, H-3a) se observaron dos dobles de dobles asignables a los protones H-3b y H-3a del anillo C del flavonoide.

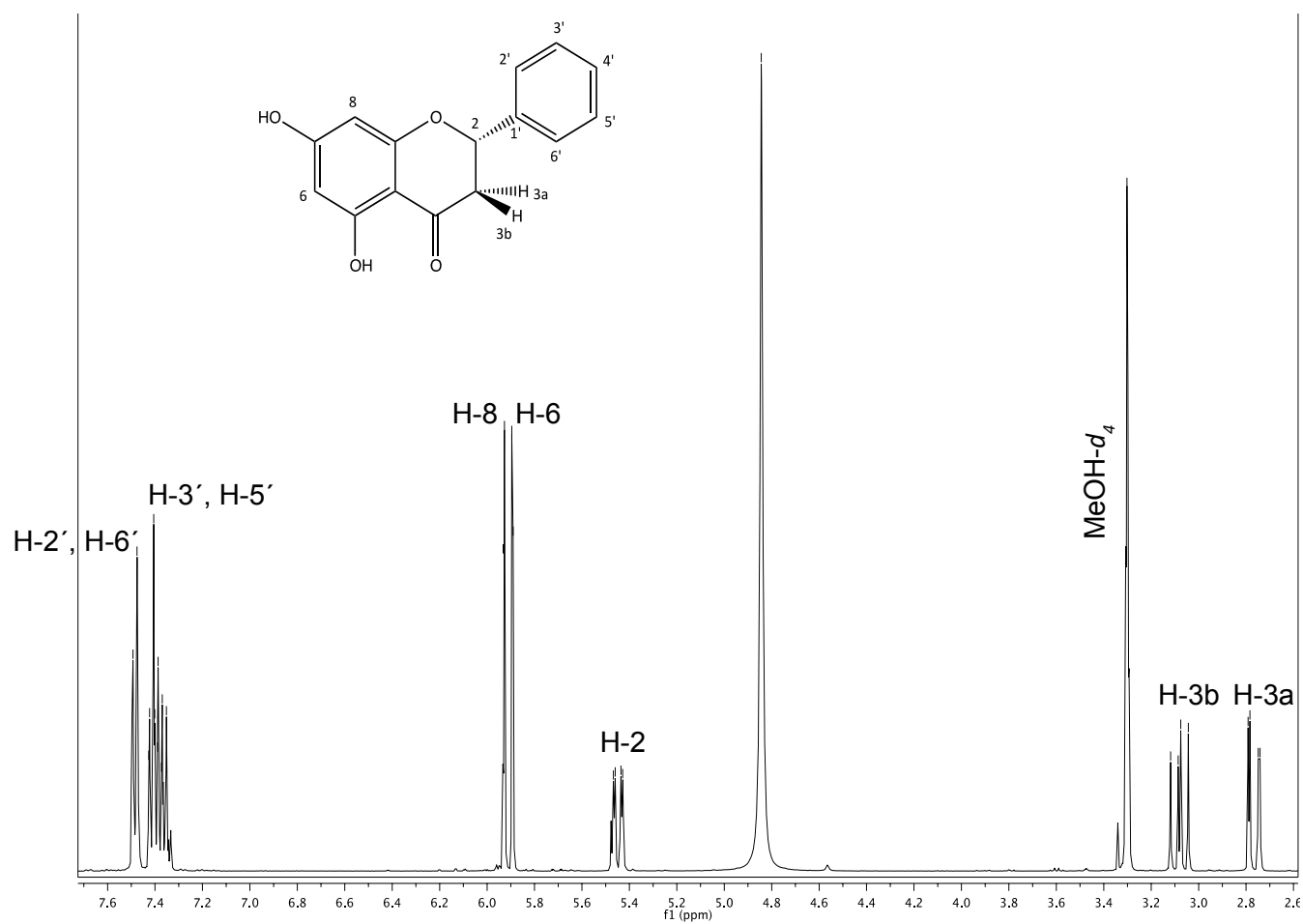
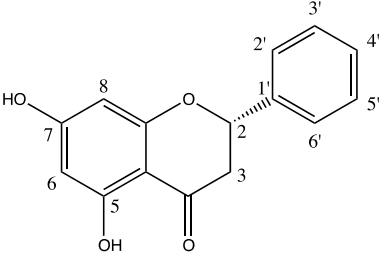


Figura 8. Espectro RMN-¹H de la pinocembrina (C001, MeOH-d₄, 400 MHz)

Cuadro 5. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (**C001**).

	 <p>pinocembrina (MeOH-<i>d</i>₄, 400 MHz)</p>
Posición	δ (J Hz)
2	5.44 (1H, dd, 16.0, 4.0)
3	3a 2.76 (1H, dd, 4.0, 16.0) 3b 3.10 (1H, dd, 16.0, 12.0)
6	5.90 (1H, d, 4.0)
8	5.93 (1H, d, 4.0)
2', 6'	7.48 (2H, dd, 8.0, 4.0)
3' - 5'	7.41 (3H, m)
PM (<i>m/z</i>)	256 [M ⁺]

6.2.2. Pinobanksina (**C002**).

La pinobanksina (**C002**) es una flavona que ha sido aislada previamente de miel y propóleo de *Leptospermum scoparium* en Nueva Zelanda y es uno de los principales componentes a los cuales se le atribuyen sus propiedades antioxidantes e inhibitorias del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Cheng, 1989). Este flavonoide ha sido descrito en propóleos de Chile (Castro, 2014) y Grecia y Chipre (Kalogeropoulos, 2009).

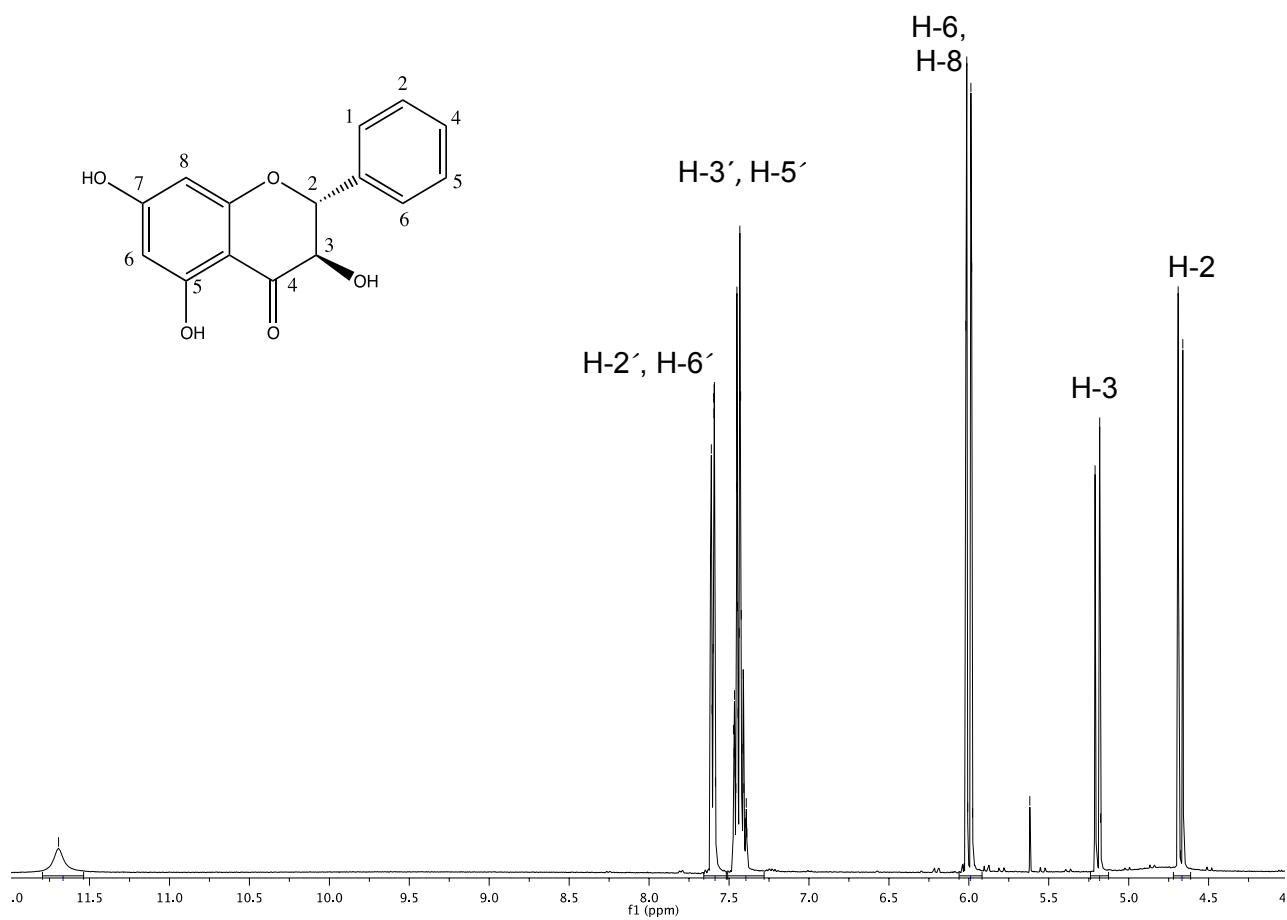
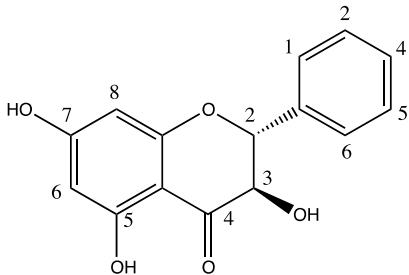


Figura 9. Espectro RMN- ^1H de la pinobanksina (C002, acetona- d_6 , 400 MHz).

Cuadro 6. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (**C002**)

	 <p style="text-align: center;">pinobanksina (acetona-<i>d</i>₆, 400 MHz)</p>
Posición	δ (J Hz)
2	4.66 (1H,d, 12.0)
3	5.18 (1H,d, 12.0)
6	5.93 (1H, d, 4.0)
8	6.02 (1H, d, 4.0)
2', 6'	7.46 (2H, d, 8.0)
3'- 5'	7.39-7.45 (3H, m)
5-OH	11.69 (1H, s)
PM (<i>m/z</i>)	271 [M ⁺]

6.2.3. Crisina (C003).

La crisina (**C003**) es una flavona presente en una gran variedad de propóleos de todo el mundo, aunque es común encontrarla en los propóleos de China los cuales tienen una amplia gama de actividades farmacológicas (Yang, 2015). Además, se ha identificado por CL-EM como componente de propóleos en el propóleo portugués (Falção *et al.*, 2010) y de México (Hernández *et al.*, 2007). Este flavonoide se aisló como un sólido amarillo claro. El peso molecular del compuesto fue determinado por espectrometría de masas mediante la técnica de impacto electrónico revelando un ion molecular de m/z 254. Su fórmula molecular se estableció como $C_{15}H_{10}O_4$. En el **Cuadro 7** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN- 1H para el compuesto (**C003**).

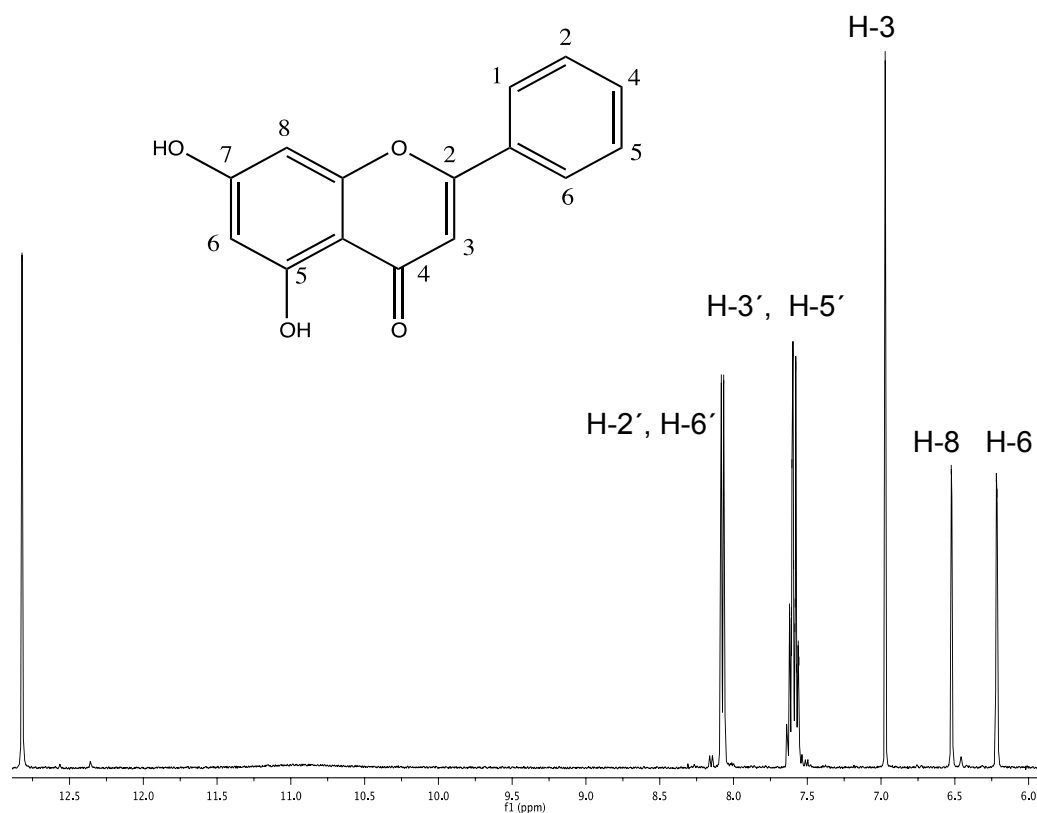
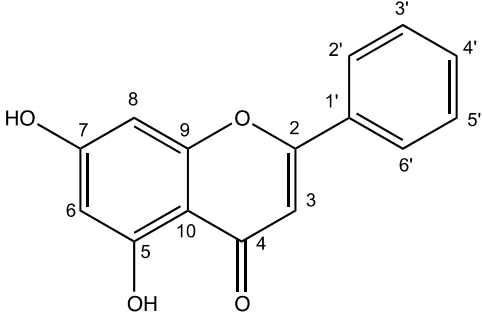


Figura 10. Espectro RMN- 1H de la crisina (**C003**, DMSO- d_6 , 400 MHz).

Cuadro 7. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (**C003**).

	 <p style="text-align: center;">crisina (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz)</p>
Posición	δ (J Hz)
3	6.95 (1H, s)
6	6.22 (1H, d, 4.0)
8	6.52 (1H, d, 4.0)
2', 6'	7.60 (2H, d, 8.0)
3' - 5'	7.57 (3H, m)
5-OH	12.8 (1H, s)
PM (<i>m/z</i>)	254 [M ⁺]

6.3. Actividad sobre del crecimiento de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.

Se utilizó como control positivo digluconato de clorhexidina, el cual es un compuesto soluble en agua y en alcohol. Se considera como el antiséptico tópico ideal, debido a su persistente actividad sobre la piel con el uso continuo, un efecto muy rápido y una mínima absorción. Este compuesto a bajas concentraciones exhibe un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida (Tannir *et al.*, 1994). Como control negativo se usó caldo BHI. En el **Cuadro 8** se muestran los resultados para cada muestra evaluada.

Cuadro 8. CMI's del extracto y fracciones obtenidas del propóleo de Durango.

Fracción	CMI (mg/ml) <i>S. mutans</i>	CMI (mg/ml) <i>S. sanguinis</i>	CMI (mg/ml) <i>S. oralis</i>
EXTO. Durango	No inhibió	0.024	0.024
Fx-I	No inhibió	1.537	0.192
Fx-II	1.537	0.192	0.096
Fx-III	0.768	0.192	0.096
Fx-IV	6.15	0.096	0.024
Fx-V	No inhibió	6.15	No inhibió
Fx-Zacatecas-1	No inhibió	0.096	0.096
Fx-Zacatecas-2	No inhibió	0.096	0.096

Ríos y cols. (1988) consideran que un extracto vegetal es activo si su CMI es menor a 1.0 mg/mL cuando se utiliza el método de microdilución en placa.

El estudio de CMI se realizó a partir de las fracciones primarias provenientes del EEP de Durango.

Las fracciones Fx-II, Fx-III y Fx-VI tienen actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans*, siendo Fx-III la de menor CMI (0.768 mg/mL) y por tanto mejor actividad. Para *Streptococcus sanguinis*, sólo las fracciones Fx-I y Fx-V no presentaron actividad inhibitoria, mientras que el extracto de Durango mostró la CMI más baja y por lo tanto mayor potencia (0.024 mg/mL). La prueba con *Streptococcus oralis* mostró que solo la Fx-V no inhibió al microorganismo y Fx-IV fue la de menor CMI (0.024 mg/mL), así también las demás fracciones presentaron un potente efecto antibacteriano contra *Streptococcus oralis*.

La actividad antibacteriana del EEP se puede atribuir a la presencia de flavonoides, ya que a estos compuestos polifenólicos se les atribuyen mecanismos que involucran la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014). Ikigai y colaboradores (1993) investigaron el efecto antibacteriano de (-)-galato de epigallocatequina, utilizando un modelo de membrana de liposomas, encontrándose que este compuesto perturbó la bicapa lipídica, alterando la función de barrera y en algunos casos, se redujo el espacio intraliposomal causando la fusión de membranas, y provocando fuga y agregación de material intramembranoso. Mirzoeva y colaboradores (1997), demostraron que quercetina y naringenina incrementan la permeabilidad y disipan el potencial de la membrana bacteriana (fuerza motriz de protones), disminuyendo la resistencia bacteriana a los antibióticos. Estos flavonoides también inhibieron la motilidad bacteriana, factor importante en la virulencia. Posteriormente, Takaisi-Kikuni y Schilcher (1994), evaluaron mediante microcalorimetría y microscopía electrónica el modo de acción antibacteriano del propóleo y encontraron que, pinocembrina, galangina y CAPE causan bacteriolisis parcial (*Streptococcus agalactiae*), previniendo la división celular, desorganizando el citoplasma y la pared celular e inhiben de síntesis de proteínas y ARN polimerasa (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014).

Otros estudios ha determinado que la pinocembrina posee actividad antibacteriana e inhibe las glucosiltransferasas del *Streptococcus mutans* previniendo de esta forma la cariogénesis (Adelmann, 2007).

7. CONCLUSIONES

Las CMI's del EEP de Durango determinadas para las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus orales* fueron mayores a las obtenidas para el control positivo digluconato de clorhexidina.

La FX-II del EEP de Durango presentó un efecto moderado sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans* (CMI=1.537 mg/mL), *Streptococcus oralis* (CMI=0.096 mg/mL) y *Streptococcus sanguinis* (0.192 mg/mL).

El estudio químico de la fracción Fx-II permitió el aislamiento de los flavonoides pinocembrina (**C001**), pinobanksina (**C002**) y crisina (**C003**) como componentes mayoritarios.

La actividad antibacteriana presente en el EEP del propóleo de Durango se explica por la presencia de los flavonoides pinocembrina, crisina y pinobanksina.

8. PERSPECTIVAS.

Continuar con el estudio químico de las fracciones primarias de derivadas del extracto etanólico de Durango.

Ampliar el panel de bacterias sobre las cuales se probó el EEP.

Utilizar los compuestos activos para generar tratamientos alternativos para las enfermedades de la cavidad oral.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelmann J., Passos M., Breyer H, D., Dos Santos R, M, E., Lenz C., Leite F, N., Lanças M, F', Fontana D, J. (2007). Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43: 174-178.

Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of Propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J. Nat. Prod.* 5 (5), 644–647.

Ataç,U., Kadriye S., Özant, Ö., Dilşah, Ç., Ömür, G., Bekir, S. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol.* 160, 189-195.

Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., *et al.* (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry.* 101, 1400–1409.

Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *E – Comprehensive Alternative Medicine.* 2, 29–32.

Bankova, V., Marcucci, M. C., Simova, S., Nikolova, N., Kujumgiev, A., & Popov, S. (1996). Antibacterial diterpenic acids of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung, Teil C.* 51, 277–280.

Bankova, V. S., De Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31, 3–15.

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

Bogdanov, S. (2012). Propolis: composition, Health, Medicine: A Review, Bee. *Product Science*, Enero: 1-15.

Borrelli, F., Maffia, P. (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*. 73 ,S53–S63.

Bosio, K., Avanzini, C. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 174–177 .

Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.* 36, 347–363.

Burrows, W., Freeman, A. B. (1983). Tratado de microbiología de Burrows. Editorial Interamericana. 21 Edición, 849-854.

Castaldo, S., Capasso, F. (2002). Propolis an old remedy used in, modern medicine. *Fitoterapia*. 73, 1–6.

Castro, C., Mura, F., Valenzuela, G., Figueroa, C., Salinas, R., Zuñiga Carolina, M., Torres, J, L., Fuguet,E., Delporte,C. (2014). Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Research International*. 64, 873–879.

Chang, J., Young, B., Ho-Jae, L., Hwan, S. (2003). Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *Han'guk Sikp'um Yongyang Kwahak Hoechi*. 32, 501–505.

Chen, C. P., Lin, C. C., Namba, T. (1989). Screening of Taiwanese crude drugs for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 27, 285–295.

Cheng, Z., Wu, T., (2013). LC bioautography: high throughput technique for screening of bioactive natural products. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 16, 531–549.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; (2006). *Supplement M100-S16*.

Cottica, S. M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, V. J., Britten, M. (2015). Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT - Food Science and Technology.* 60, 609-614.

De Castro, S. L. (2001). Propóleos: actividad biológica y farmacológica. *Ann Rev Biomed Sci.* 3, 49-83.

Duarte S., Koo H., Bowen W. H. (2003). Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. *Biol.Pharm.Bull.* 26(4) 527-531.

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

Evans, J. D., Pettis, J. S., (2005). Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees: *Apis mellifera*. *Evolution.* 59, 2270–2274.

Falçao, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 396:887-897.

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

Farooqui, T., Farooqui, A. A. (2012) Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Current Nutrition y Food Science*. 6,186-199.

Ghisalberti, E. L. (1978). Propolis: A review. *Bee World*. 60, 59–84.

Hernández, J., Goycoolea, F., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Moreno, L., Velasquez, E., Astiazaran, H., Lugo, E., Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochemical and Biophysica Acta*. 1147, 132–6.

Kalogeropoulos N., Konteles S., Troullidou E., Mourtzinou I., Karathanos, V. (2009), Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 116, pp. 452–461.

Kim, Y. H., Chung, H. J. (2011). The effects of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. *New Biotechnology* 28,17-18.

Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K. (2002). Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 1302.

Kouidhi, B., Zmantar, T., Bakhrouf, A., (2010). Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe*. 16: 566-571.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popova, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 235–240.

Kumari S., Devulapalle K. S., Goodman S. D., Gao Q., Hemsley A., Mooser G.(2008). Knowledge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans streptococci. *Prot Sci*. 6:2489-93.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 84, 329–339.

Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26:83–99.

Massaro ,C. F., Katouli M., Grkovic ,T., Vu , H., Quinn , R. J., Heard, T. A., Carvalho, C., Manley-Harris, M., Wallace, H.M., Brooks, P. (2014). Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavonones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtacea). *Fitoterapia*.95, 247-257.

Metzner, J., Schneidewind, E. M., Friedrich, E. (1977). Effects of propolis and pinocembrin on yeasts. *Pharmazie*, 32:730.

Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N. y Calder, P. C. (1997). Antimicrobialaction of propolis and some of its components: the effectson growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research*. 152: 239–46.

Ordoñez R. M., Zampini I. C., Nieva Moreno M., Isla M. I. (2011) Potential application of nothern argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. *Microbiological Research*. 166: 578–584

Organización Mundial de la Salud (2010). *Situación Reglamentaria de los Medicamentos*. Una reseña mundial. *MS/TRM/98.1*.

Tannir, M. A.; Goodman, H. S. (1994). A review of chlorhexidine and its use in special populations. *Special Care Dentist*. 14 (3):116-22.

Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., Sabatini, A. G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38:306–311.

Reyes, C. J. L. y Cano R., P. 2003. Manual de polinización apícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA). *Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana-Instituto Interamericano para la Cooperación Agrícola (IICA)*. México, D. F. Manual N° 7: 78 p.

Rey D., Vargas S., Gaston R. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patti Gaston. *Journal of food science*.79. 14-15.

Rios, J. L., Recio, M. C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 23:127–149.

SAGARPA (2010). Situación actual y perspectiva de la apicultura en México, *Claridades Agropecuarias*, 199:33–39.

Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Products Reports*. 28:925-936.

Sayas, R. R. y Huamán, M. L. (2009). Determinación de la flora polinífera del Valle de Oxapampa (Pasco-Perú) en base a estudios palinológicos. *Ecol. Apl.* 8:53-59.

Schmidt, R. H. (1989). The arid zones of Mexico: climatic extremes and conceptualization of the Sonoran Desert. *Arid Environ.*16: 241-256.

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

Takaisi-Kikuni, N. B., Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica.* 60: 222-227.

Vacchi, E., Drago, L. (2007). Propolis antimicrobial activity: what's new? *Le Infezioni in Medicina*, 15:7-15.

Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J.C., Salas-Reyes, M., Jimenez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E., Henandez, J., Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry.* 131:645–651.

Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry.* 131:645–651.

Vargas-Sánchez R. D., Torrescano-Urrutia G. R., Mendoza-Wilson A. M., Vallejo-Galland B., Acedo-Félix E, Sánchez-Escalante J. J., Peñalba-Garmendia M. C y Sánchez-Escalante, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotechnia.* (1): 32-37.

Von Frisch, K. (1976). Bees: their vision, chemical senses and language. *Rev. (Ed.)*. Cornell University Press, Ithaca, New York. 2: 54-60.

Wollenweber, E., Hausen, B. M., Greenaway, W., (1990). Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. *Bulletin de Groupe Polyphenols*. 15, 112–120.

Yang, H., Huang, Z., Huang, Y., Dong, W., Pan, Z., Wang, L. (2015). Characterization of chinese crude propolis by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 113, 158–164.

10. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

[<http://co.listerineprofesional.com/el-biofilm-dental-causa-de-las-enfermedades-dentales-mas-comunes>]. Consultada el día 10 de abril, 2015.

Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, UNAM.

[http://www.ibiologia.unam.mx/colecciones/insectos/centro_insec.htm#].

Consultada el 22 de abril, 2015.

INEGI, Anuario Estadístico de Durango, 2011 a través de [http://www.ciberhabitat.gob.mx/monografias/informacion/gto/territorio/recursos_naturales.aspx?tema=me&e=11] Consultada el día 24 abril, 2015.

Manual de polinización apícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

[<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/publicaciones/lists/manuales%20apcolas/attachments/4/manpoli.pdf>]. Consultada el día 5 de abril, 2015.

OMS a través de [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>] Consultada el día 20 de abril, 2015.