



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UNA MUESTRA DE
PROPÓLEO DE MICHOACÁN.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

JENNY ESMERALDA GENARO CALZADA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Al Jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla

Mtro. Ángel Durán Díaz

Este trabajo fue financiado por:

UNAM-PAPIIT IN212317

DEDICATORIAS.

A ti mamá (mi princesa).

Muchísimas gracias por todo tu apoyo y esfuerzo dedicado a mí y a mis hermanos. Eres una mujer excepcional que ha logrado sacarnos adelante con mucho esfuerzo y trabajo. Siempre con la frente en alto, eres muy valiente y decidida, has trabajado tanto para darnos la mejor educación, aunque el costo fuera que casi no estuvieras en casa. De lo que estoy segura es que nunca nos faltó amor, ni palabras de aliento para seguir adelante. Eres el ejemplo más grande que pudiste darnos. El de superarse y tener una carrera. Gracias por siempre darme ánimos de seguir adelante con la escuela, con los exámenes y ahora con mi tesis, que es mi último paso para poder tener lo más esperado “mi Título”. Todo este trabajo es por ti y para ti, sin tu apoyo, trabajo y amor no lo hubiera logrado. Gracias por siempre estar al pendiente de mí y de alguna manera obligarme a entrar a la UNAM, desde el primer día que pisé sus instalaciones supe que habías elegido lo mejor para mí y por mi bien. No tienes una idea de cuánto bien me hiciste y de lo feliz que fui. Y mira hasta donde he llegado. ¡Todo gracias a ti Princesa!!!

Te amo mamá.

A mi abuelita (Mi vita).

Mi Vita, aunque ya no estés aquí entre nosotros quisiera dedicarte este trabajo que me llevo tanto esfuerzo, dedicación y tiempo escribir. Tú sabes que fuiste lo más querido que tuve, siempre te vi como mi segunda mamá, y claro lo fuiste por las veces que mi mamá (mi princesa) tenía que irse a trabajar. Fuiste testigo de mis desveladas mientras hacía tarea para la escuela. Muchas veces te levantas para llevarme un suéter, chamarra o hasta una cobija para que me cubriera del frío de las madrugadas. Recuerdo que me decías que no me desvelara tanto, pero mira, todas esas desveladas valieron la pena porque estoy aquí terminando de escribir mi tesis. Daría todo lo que me pidieran por tenerte aquí conmigo contándote tantas cosas y que fueras testigo de mis logros. Yo sé que estarías orgullosa de mí. Te extraño cada día que pasa.

Te amo y te extraño.

A mi hermano Omar

Ambos sabemos que llegar hasta aquí no es fácil, pero con dedicación, esfuerzo y compromiso con uno mismo se puede llegar a la meta. Yo estoy muy orgullosa de que tú ya tengas tu carrera y la ejerzas. Ahora sabes lo que cuesta gastar cada peso, espero que pronto aprendas a ahorrar porque el tener dinero no para siempre, siempre va haber altas y bajas lo sabes de sobra por como guardaba cada peso mi mamá para podernos comprar tenis, zapatos y ropa.

A pesar de la poca o mucha comunicación que tengamos quiero que sepas que te quiero muchísimo, que no te cambiaría por nada. Este trabajo también es para ti, porque de una u otra manera me ayudaste con gastos de la escuela, te agradezco mucho por las tantas veces que me te levantaste en las mañanas para llevarme a la parada del transporte. Eres testigo de lo que me ha costado llegar hasta aquí, te doy las gracias por tu apoyo.

Te quiero mucho hermano.

A mi hermano Iván.

El supuesto hermano chiquito, siempre me quedaré con esa imagen de inocencia que tenías cuando te llevaba de la mano conmigo, pero ahora ya eres todo un hombre hecho y derecho. Sueles ser muy directo y hasta un poco cruel, aunque sé que también eso te ha traído muchas cosas buenas, eres muy aferrado con lo que quieres y siempre lo consigues.

También entraste a la máxima casa de estudios y como ya verás fue la mejor opción. Estoy muy feliz y orgullosa de que ya estés en la licenciatura, he visto que no se te ha hecho tan fácil, te has desvelado mucho, y hasta has descuidado un poco tu alimentación. Pero yo sé que todo valdrá la pena, te lo digo por experiencia propia. Deseo de todo corazón que pronto te encuentres escribiendo tu propia Tesis, verás lo importante y orgulloso que te vas a sentir cuando la termines. ¡Gracias por tu apoyo!!!

Te quiero mucho.

A mi novio (Chava)

He aprendido muchas cosas de ti y creo que también has aprendido varias cosas de mí y de mi carrera, de mi Institución que me vio nacer y crecer como Universitaria. Hemos vivido tantas cosas juntos que ni yo misma puedo creerlas, gracias por interesarte en mi carrera. Cuando te conocí me sorprendió el interés que tenías por la naturaleza, el campo científico, los animales, etc. Tú sabes que me hubiera gustado muchísimo estudiar contigo la carrera, pero nuestros caminos fueron diferentes, de verdad me hubiera gustado compartir tantas cosas, que pudieras ver y sentir todo lo que yo veía en campo. Aunque de alguna manera lo sabes por los cientos de fotos que te enseñaba de mis prácticas. Sé que no era fácil dejarme ir, pero como siempre te dije, era parte de la escuela y era mi calificación.

También quiero darte las gracias por las veces que me ayudaste a conseguir mi material de laboratorio o de campo. Gracias por tu apoyo y sobre todo por tu amor. No sabes lo que me ha costado escribir esta tesis, espero que estés orgulloso de mí y puedas entender lo importante que fue escribir una tesis y trabajar con un producto natural.

Te amo amor.

A mis tíos y primos.

Ustedes saben el esfuerzo y trabajo que le costó a mi mamá para sacarnos adelante. Veán que todo eso valió la pena, estoy ahora por terminar mi tesis y muy feliz. Quiero que al igual que yo se sientan orgullosos de mi mamá. Por qué logró sacar adelante a sus tres hijos, sé que de alguna manera también la apoyaron. Gracias.

Para mí es muy importante mostrarles el trabajo que desarrolle a lo largo de un año, es algo de lo que me siento muy orgullosa y espero que les guste. Gracias por sus palabras y apoyo.

¡Los quiero mucho!!

A la Doctora Margarita.

Muchísimas gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, aún recuerdo ese momento cuando llegué pidiéndole un espacio para inscribir mi LICyT, usted siempre fue muy amable y atenta conmigo. No sabe lo feliz que fui desde ese día por pertenecer a su equipo de trabajo, no pude caer en mejores manos que en las de usted.

He aprendido muchísimas cosas de usted, es una persona que a pesar de la preparación que tiene siempre ha sabido ser sencilla, eso siempre lo voy admirar y a recordar. Tiene una manera de enseñar tan fácil que cualquier alumno quisiera tenerla como profesora en todas sus materias de la carrera. Muchas gracias por el apoyo incondicional que siempre me brindó, por la comprensión y atención que tuvo hacia mí. Siempre haciéndome ver hacia adelante, diciéndome que todavía hay mucho por aprender y hacer.

Gracias por resolver mis dudas, por echarme ánimos cuando estaba muy estresada con el proyecto y con mis materias. Siempre estuvo ahí para escucharme y darme un consejo. Usted es como un ángel bajado del cielo para todos nosotros los estudiantes de la última etapa.

Todo este trabajo no hubiera sido posible sin su ayuda. La quiero muchísimo.

A la Dra. Ana.

Muchas gracias por el apoyo, atención, comprensión y amistad que me brindó. Tenerla como asesora y amiga son lo mejor que me ha pasado. He aprendido muchas cosas de usted, y le agradezco por compartir sus conocimientos conmigo, al igual por todas las risas que logró sacarme durante mi estancia en el laboratorio. Es un ejemplo a seguir, la quiero mucho y le agradezco su tiempo. Siempre me hizo sentir bien.

La quiero mucho.

Rebeca.

Gracias por tu apoyo, comprensión y amistad. Siempre tuviste la disponibilidad para ayudarme a resolver mis dudas sin decirme no. Gracias por tus consejos, observaciones y también esas risas en el laboratorio. Siempre me sentí muy bien con ustedes.

A todos mis compañeros del laboratorio.

Muchas gracias por recibirme con cariño el primer día, gracias por su ayuda en mi proyecto. Por resolver mis dudas e indicarme donde se encontraba el material y los reactivos en el laboratorio.

Siempre me hicieron sentir bien, esas risas en las mañanas. Gracias por las veces que entraron a las campanas a ayudarme a vaciar agar o a terminar mi cinética. Nunca olvidaré eso. Este trabajo también es de ustedes.

A mis asesores.

Doctor Marco lo conocí muy poco, pero sé que es una persona muy correcta, inteligente y trabajadora. Siempre escuché muy buenas referencias de usted y ahora lo sé. Gracias por las observaciones que me marcó en mis adelantos de tesis, yo sé que eran para mejorar. Gracias por tomarse el tiempo y dedicación a mi trabajo. Espero que haya cumplido con las expectativas.

Maestro Luis Barbo de igual manera lo traté muy poco, pero sé que es un maestro de muy buen nivel, siempre trabajando en el laboratorio. Gracias por ayudarme a realizar mis cromatografías y por enseñarme a utilizar los equipos. Le agradezco su tiempo y dedicación para este trabajo.

Maestro Ángel gracias por ayudarme en la parte estadística, este trabajo también es suyo. Gracias por el tiempo y dedicación para revisar mi trabajo.

A mi casa de estudios FES Iztacala, UNAM

Por todas las instalaciones y material brindado para poder realizar mi proyecto de tesis. Sé que fue un gasto de suma importancia, pero les aseguro que fue aprovechado de la mejor manera. Muchas gracias por todo lo que pude aprender.

ÍNDICE **Página**

ÍNDICE DE CUADROS.....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
El propóleo.....	3
Recolección y elaboración del propóleo de <i>Apis mellifera</i>	4
Origen floral y perfil palinológico del propóleo de Michoacán.....	5
Historia del uso del propóleo.....	5
Importancia del propóleo en la actualidad.....	6
Importancia de los productos naturales.....	7
Propiedades medicinales del propóleo.....	9
Propiedades antioxidantes.....	10
Composición química del propóleo.....	10
Importancia económica.....	11
ANTECEDENTES.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Extractos	15
Actividad antibacteriana.....	15
Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	16
Evaluación cuantitativa.....	17
Actividad del propóleo sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	17
Capacidad antioxidante	17
Fenoles totales.....	17
Flavonoides totales.....	17
Caracterización química de los extractos.....	17
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS.....	19
Características organolépticas.....	19
Rendimientos del propóleo.....	19
Actividad antibacteriana.....	20
Evaluación cualitativa.....	20
Análisis estadístico.....	22
Evaluación cuantitativa.....	26
Actividad de los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	27
Capacidad antioxidante de los extractos de propóleo de Michoacán, México	35
Cuantificación de Fenoles Totales.....	36
Cuantificación de Flavonoides Totales.....	37
Caracterización química.....	38

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	38
Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	54
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS.....	65
APÉNDICES.....	76
Apéndice 1. Zona de colecta.....	76
Apéndice 2. Técnica de maceración.....	77
Apéndice 3. Método de difusión en agar de Kirby-Baüer.....	78
Apéndice 4. Microtécnica de dilución en caldo.....	80
Apéndice 5. Actividad de los extractos Metanólico, Hexánico y Clorofórmico sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	82
Apéndice 6. Método de reducción del radical 2,2-difenil- 1- picrilhidracil (DPPH).....	84
Apéndice 7. Determinación de la concentración de Fenoles Totales (CFT).....	87
Apéndice 8. Cuantificación de flavonoides totales.....	89
Apéndice 9. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	91
Apéndice 10. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD)	92
Apéndice 11. Análisis estadístico.....	94

ÍNDICE DE CUADROS.**Página**

Cuadro 1	Funciones generales de los productos naturales.....	8
Cuadro 2	Composición del propóleo.....	11
Cuadro 3	Estudios realizados con propóleo en los estados de la República.....	12
Cuadro 4	Cepas bacterianas utilizadas.....	16
Cuadro 5	Características organolépticas para el propóleo de Michoacán, México.....	19
Cuadro 6	Rendimiento de los extractos obtenidos del propóleo en greña de Michoacán, México.....	19
Cuadro 7	Halos de inhibición en las bacterias de los tres extractos del propóleo de Michoacán, México	21
Cuadro 8	Concentración mínima inhibitoria y bactericida mínima de los extractos de propóleo de Michoacán, México	26
Cuadro 9	Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto metanólico.....	39
Cuadro 10	Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto hexánico.....	45
Cuadro 11	Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto clorofórmico.....	50
Cuadro 12	Compuestos volátiles presentes detectados en el extracto metanólico.....	55
Cuadro 13	Compuestos volátiles presentes detectados en el extracto hexánico.....	56
Cuadro 14	Compuestos volátiles presentes detectados en el extracto clorofórmico.....	57
Cuadro 15	Curva patrón para la determinación de fenoles totales....	88

ÍNDICE DE FIGURAS.**Página**

Figura 1	Propóleo de Michoacán en greña de Michoacán, México	19
Figura 2	Extractos de propóleo de Michoacán, México	20
Figura 3	Actividad antibacteriana de los extractos sobre cada una de las cepas	22
Figura 4	Actividad antibacteriana de los tres extractos de propóleo de Michoacán, México sobre cada una de las cepas.....	23
Figura 5	Actividad antibacteriana de los extractos y el control positivo sobre cada una de las cepas	24
Figura 6	Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 7	Actividad del extracto metanólico a las tres horas de interacción sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 8	Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de <i>Enterobacter aerogenes</i>	28
Figura 9	Actividad del extracto metanólico a las once horas de interacción sobre <i>Enterobacter aerogenes</i>	29
Figura 10	Actividad del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i>	30
Figura 11	Actividad del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 12	Actividad del extracto hexánico a las cinco horas de interacción sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 13	Actividad del extracto clorofórmico sobre la curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 14	Actividad del extracto clorofórmico a las tres horas de interacción sobre <i>Escherichia coli</i>	33
Figura 15	Actividad del extracto clorofórmico sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	34

Figura 16	Actividad del extracto clorofórmico a las once horas de interacción sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura 17	Actividad antioxidante de la Quercetina.....	35
Figura 18	Curva patrón para el cálculo de fenoles totales.....	36
Figura 19	Curva patrón para el cálculo de flavonoides.....	37
Figura 20	Cromatograma de análisis HPLC del extracto metanólico.....	38
Figura 21	Cromatograma del análisis HPLC del extracto hexánico.....	44
Figura 22	Cromatograma del análisis HPLC del extracto clorofórmico.....	49
Figura 23	Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico.....	54
Figura 24	Cromatograma de la CG-EM del extracto hexánico.....	55
Figura 25	Cromatograma de la CG-EM del extracto clorofórmico.....	56
Figura 26	Mapa de la región de Zacapu, Michoacán.....	76
Figura 27	Matraz Erlenmeyer con propóleo y solvente hexano....	77
Figura 28	Destilación de los extractos por medio de un rotavapor	77

ABREVIATURAS.

CA₅₀	Concentración Antioxidante Media
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil
eAG	Equivalentes de ácido gálico
eQ	Equivalentes de quercetina
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución- acoplada a espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)
GC – MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
HPLC–DAD	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos.
CFT	Concentración de Fenoles Totales.
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología.

RESUMEN.

Entre los productos que se pueden obtener de la colmena se encuentran la cera, la miel, la jalea real y el principal objeto de estudio el propóleo. Este último es una mezcla de composición química compleja que contiene bálsamos, aceites esenciales y polen, entre otros componentes.

Tiene una variedad de usos de gran interés para fines terapéuticos como antiséptico, desinfectante y antihelmíntico. Así mismo, también es usado como antifúngico, citostático, antioxidante y antiinflamatorio.

Por esta razón el presente estudio tuvo como objetivo general determinar la actividad antibacteriana de una muestra de propóleo obtenida en el apiario la Mole en Michoacán, México.

Se obtuvieron y caracterizaron los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico de propóleo. Los extractos obtenidos fueron analizados de acuerdo a la NORMA MEXICANA NOM-003-SAG/GAN-2016.

Se evaluó cualitativamente la actividad antibacteriana, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se evaluó la sensibilidad de las cepas sobre la curva de crecimiento bacteriano, se determinó la actividad antioxidante, se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides totales, se determinó la toxicidad general, se realizó la caracterización química del extracto por medio de una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los extractos presentaron diferentes colores, variaron de café oscuro hasta un color amarillo, encontrándose un mayor rendimiento para el extracto clorofórmico de 57.65%, seguido del extracto hexánico con 17.64% y el extracto metanólico con 14.24%.

Se probó su efectividad antimicrobiana sobre cepas de microorganismos Gram negativos y Gram positivos.

De los extractos evaluados el extracto metanólico tuvo una actividad antibacteriana significativamente mayor que los otros dos extractos, esta

actividad puede atribuírsele al solvente que logró arrastrar la mayor cantidad de compuestos con actividad antibacteriana del propóleo.

La especie bacteriana más sensible resultó ser *Staphylococcus aureus*.

La capacidad antioxidante media (CA₅₀) mostrada en el ensayo de reducción de DPPH fue de 13.3 µg/mL para el extracto metanólico, 1195.3 µg/mL para el extracto clorofórmico y 1124.5 µg/mL para el extracto hexánico.

La caracterización química de cada uno de los extractos de propóleo por medio de diferentes cromatografías mostró que los compuestos detectados en mayor abundancia en la CG-EM fue el eicosano; en el análisis por HPLC-DAD son fenoles como la pinocembrina y acacetina; el análisis por HPLC-MS mostró que el extracto del propóleo posee varios compuestos, siendo pinocembrina y naringenina los que se pudieron identificar.

Palabras claves: *Apis mellifera*, propóleo, actividad antibacteriana, pinocembrina.

INTRODUCCIÓN.

Muchas de las civilizaciones usaron la naturaleza como fuente de remedios curativos. Los registros más antiguos de medicina datan de hace 3500 años, pero los paleontólogos han encontrado manojos de hierbas medicinales entre los restos fosilizados de nuestros ancestros neandertales (Polunin y Robbins, 1992).

Por otro lado, se sabe que las infecciones de la piel pueden ser producidas por bacterias, virus, hongos y artrópodos. Generalmente la mayoría de las infecciones bacterianas de la piel son infecciones localizadas, aunque algunas pueden extenderse y originar enfermedades sistémicas potencialmente mortales (Ingraham e Ingraham, 1998).

La Organización Mundial de la Salud menciona que las infecciones por microorganismos patógenos (bacterias, hongos, parásitos y virus) son la principal causa de mortalidad en el mundo (OMS, 2010). El mal uso y/o abuso en la utilización de los antibióticos son una de las causas fundamentales que contribuyen a la aparición de farmacorresistencias. Por otro lado, cabe señalar que los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias pueden ser de naturaleza intrínseca (es decir, lo poseen todas las bacterias de la misma especie o grupo bacteriano) o bien de manera adquirida (sólo lo poseen ciertas bacterias de la especie) (Torres, 2012).

El propóleo.

Es un producto apícola resinoso y complejo, con una variable apariencia física, recogido y transformado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*). La palabra propóleo proviene del griego *propolis* (pro-defensa, polis-ciudad) que significa “defensa de la ciudad”. Es una sustancia resinosa que varía en su color, de amarillo claro a marrón, dependiendo de la cantidad de compuestos florales y de resinas arbóreas (Saravana y Mahitosh, 2009). A temperaturas bajas es duro y quebradizo, mientras que a temperaturas altas es suave y pegajoso (Burdock, 1998). La abeja *Apis mellifera* recolecta diferentes secreciones y resinas de plantas, así como, sustancias florales para ser posteriormente procesadas en su interior para darle una consistencia pegajosa o resinosa (Lotti *et al.*, 2010; Sonmez *et al.*, 2005).

Las abejas lo usan para sellar los agujeros en sus panales, suavizar las paredes internas, así como para cubrir los cadáveres de los intrusos que murieron dentro de la colmena para evitar su descomposición. El propóleo también protege la colonia de enfermedades debido a su eficacia antiséptica y propiedades antimicrobianas (Salatino *et al.*, 2005).

Recolección y elaboración del propóleo por *Apis mellifera*.

Las abejas, *Apis mellifera* (Duarte *et al.*, 2006), primeramente colectan el material básico: las partículas resinosas que se encuentran en las yemas, brotes y pecíolos de diferentes vegetales, tales como: álamo, olmo, sauce, abedul, castaño de indias, pino, abeto y roble, posteriormente, con sus mandíbulas agarran y trabajan la resina, esto es posible gracias a que dentro de su mandíbula desemboca un conducto que proviene de las glándulas mandibulares y que da salida a secreciones (ácido 10-hidroxidecenoico) de color claro que tiene la finalidad de ablandar y hacer más manejable la resina, finalmente con ayuda de su tercer par de patas traseras concentran y compactan la resina para transferirla a su corbícula. Al ingresar a la colmena, se dirigen al lugar donde es requerido, ya sea con fines desinfectantes, para cerrar grietas o reducir vías de accesos. El producto final se denomina, propóleo (Farré *et al.*, 2004).

Es de importancia considerar que la cantidad de propóleo que produce una colmena aproximadamente en un año oscila entre 150 y 300 gramos, esto dependerá de la ubicación geográfica, cantidad de flora en el área y de los factores climatológicos. La recolección es realizada por el apicultor, mediante la colocación de una rejilla de nylon, sobre los paneles de la colmena, esta presenta agujeros de 1.5 por 3 mm, por donde las abejas no pueden pasar viéndose en la necesidad, por su instinto de supervivencia, de cubrir los agujeros para impedir la entrada de agentes externos, por lo que en un periodo de 1 a 6 meses rápidamente será cubierta por propóleo, posteriormente la parrilla se introduce en el congelador a una temperatura de -10 o -20°C por 1 hora con la finalidad de que se congele por trozos y en forma de escamas, obtenga rigidez y fragilidad, de esta manera con una espátula de acero inoxidable sin mucho filo será fácilmente desprendible. El propóleo recogido en trozos se limpia con ayuda de pinzas cuidando de retirar contaminantes macroscópicos como abejas, trozos de

madera y pasto. Finalmente es colocado en frascos ámbar para protegerlo de la luz y en lugares frescos, limpios y cerrados, y se entrega para su elaboración en extracto etanólico o en polvo (Farré *et al.*, 2004).

Origen floral y perfil palinológico del propóleo de Michoacán.

El propóleo producido por *Apis mellifera* se caracteriza por presentar gran variedad de colores. Así tenemos propóleos ricos en polen de especies. El origen floral y composición palinológica de los propóleos dependen en gran medida de las especies vegetales presentes en la zona (Delgado *et al.*, 2015)

Cada propóleo varía en su composición dependiendo de la zona geográfica de origen y de la estación del año. Esto se debe al cambio natural que se lleva a cabo en la flora y la fauna, además del tipo de plantas endémicas de acuerdo al clima de la región (Ahn *et al.*, 2007).

Historia del uso del propóleo.

El uso del propóleo se remonta a tiempos antiguos, por lo menos a 300 años a.C., se ha utilizado como un medicamento en la medicina local y popular en muchas partes del mundo, tanto interna como externamente. Egipcios, griegos y romanos informaron el uso de propóleo por sus cualidades curativas en general y para la cura de algunas lesiones de la piel. El propóleo siempre ha sido reportado como un agente antiinflamatorio y para curar llagas y úlceras (Ghisalberti, 1979).

Más tarde, en la cultura romana fue de gran trascendencia el propóleo, hecho que se refleja en su mitología, cuando Júpiter transforma a Melisa en una abeja para que produzca una milagrosa sustancia curativa capaz de proteger, llamada: propolis. Galeno en el siglo II, menciona el propóleo/propolis en sus trabajos, y el famoso médico-filósofo Avicena, en el siglo XI, dice del mismo: "Tiene la cualidad de eliminar las puntas de flechas y las espinas, vivifica, limpia fácilmente y ablanda fuertemente". Ambreise Paré, padre de la cirugía francesa menciona que en la primera mitad del siglo XVI se usaba el propóleo con fines médicos (Castaldo y Capasso, 2002).

Incluso el propóleo llega a ser citado en el Tanaj (Biblia), pero con el nombre: tzorí, que significa bálsamo. Los incas utilizaban el propóleo cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles, y en el Continente Europeo, en el siglo XVIII y XIX, los franceses lo emplearon para tratar llagas (Sauceda, 2011).

Sin embargo, su empleo máximo se dio en África del Sur, durante la guerra Anglo-Bóeres (1899-1902), donde se utilizaban vendas impregnadas en propóleo con vaselina para tratar heridas infectadas, promover la cicatrización e impedir la aparición de gangrenas entre los bóeres y los ingleses (Quintana *et al.*, 1997). Así también, en la Segunda Guerra Mundial, fue utilizado por la Ex Unión Soviética para tratar las heridas de sus enfermos, e incluso, antes de la caída del socialismo ruso, se recurrió mucho a la apiterapia y de esta forma al propóleo, siendo ampliamente utilizado por reunir ciertas características: altamente efectivo, fácil obtención, barato y con escasas contraindicaciones (Sauceda, 2011).

Sin embargo, con el paso de los años y con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, decayó el uso de la apiterapia y del propóleo, pero es a partir de los últimos veinte años que los científicos se han dedicado a estudiarlo y han demostrado las propiedades y actividades del mismo, coincidiendo con lo que pensaban y obtenían como resultados nuestros antepasados (Farré *et al.*, 2004).

Importancia del propóleo en la actualidad.

En la actualidad este material ha llamado la atención de los investigadores, desarrollándose numerosos estudios que le atribuyen una amplia gama de propiedades biológicas, que tratan sobre la inhibición del crecimiento bacteriano, analizando las bacterias más sensibles, así como, las que muestran resistencias a la acción de extractos de propóleos. La totalidad de las investigaciones coinciden en señalar que la inhibición del crecimiento bacteriano es muy elevada frente a las bacterias Gram positivas (G⁺), mientras que en bacterias Gram negativas (G⁻), esta actividad es mucho menor o nula (Aguilar y Camacho 1985). Se podría destacar la alta actividad del propóleo frente a *Staphylococcus aureus*, uno de los organismos que más enfermedades provoca y del que hay que destacar su alta resistencia a la penicilina. Según un informe del Center for Science in the Public Interest de EU, más del 90% de las cepas de este

microorganismo aisladas en dicho país es resistente a la penicilina. La resistencia a la meticilina pasó de ser del 2,4% en 1975 al 29% en 1991. El problema se agrava ya que bacterias resistentes a este antibiótico sufren una alteración en su estructura genética que las hace resistentes a otros tipos de fármacos como las fluoroquinolonas. De hecho, cuando éstos fueron introducidos en 1980, eran capaces de aniquilar al 95% de los *S. aureus* resistentes a la meticilina (Sauceda, 2011).

Importancia de los productos naturales.

Por otro lado, los productos naturales han constituido materias primas valiosas para la industria farmacéutica para fabricar productos con actividad antimicrobiana (Clardy *et al.*, 2006). Los productos naturales con reconocida actividad antibacteriana pertenecen principalmente a las siguientes clases estructurales: fenoles, terpenoides, alcaloides, lectinas, polipéptidos y poliacetilenos (Cowan, 1999; Gibbons, 2004; Copping y Duke, 2007; Stavri *et al.*, 2007). Se considera que cada clase de productos, además de su función potencial contra patógenos invasores, posee otras funciones en la fisiología y funcionalidad de la planta (Cuadro 1). Un ejemplo, de estos productos naturales es el propóleo.

Cuadro 1. Funciones generales de los productos naturales.

Fitoquímico	Función en la planta	Referencia
Flavonoides, antocianinas, etc.	Sirven como pigmentos de atracción en las flores para la polinización y los mecanismos de protección contra los rayos UV.	(Tholl, 2006).
Terpenoides (terpenos y fenilpropanoides de bajo peso molecular)	Por su diversidad y complejidad estructural representan un enorme potencial para mediar las interacciones planta-entorno.	(Tholl, 2006).
Aceites esenciales	Formar parte de los olores de las plantas y sus componentes.	(Scalbert, 1991).
Taninos	Poseen una función constitutiva, y se encuentran presentes en casi todas las partes de las plantas: corteza, madera, hojas, frutos y raíces. Estos compuestos son los responsables del sabor astringente de los vinos o de las frutas sin madurar, y como componentes de los colores que se observan en las flores y en las hojas de otoño.	(Scalbert, 1991).
Polipéptidos	Pueden poseer funciones de señalización, funcionando como mensajeros químicos intracelulares.	(Bergey <i>et al.</i> , 1996; Pearce <i>et al.</i> , 2001).

En la actualidad se trata de mirar nuevamente hacia la medicina tradicional ya que se conocen registros que mencionan que el número de especies de plantas conocidas oscila entre 250 000 y 500 000 (Verpoorte, 1998). Esta riqueza es un recurso que no se aprovecha totalmente, a pesar de que su uso en tratamiento de diversas enfermedades es ancestral (Mesa *et al.*, 2004). Cabe destacar que el hombre, a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse y sistematizar los recursos vegetales para su beneficio; así se encuentran plantas que se utilizan para diversos fines como alimenticio, forrajeo, ornamental o medicinal (Aguilar y Camacho, 1985). Dicha costumbre se ha observado hasta nuestros días, principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido acumular un amplio conocimiento etno-farmacológico, punto importante de partida en las investigaciones dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad biológica (Cowan, 1999).

Un ejemplo de estos productos naturales es el propóleo que ha traído el interés de los investigadores en las últimas décadas debido a varias propiedades biológicas y farmacológicas, como inmunomodulador, antitumoral, antibiótico, antiinflamatorio, antioxidante, entre otros (Bankova *et al.*, 2000).

Propiedades medicinales del propóleo.

Recientemente Meneses en 2005, destacó propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y antineoplásicas. En las últimas décadas algunos investigadores le han atribuido propiedades biológicas y farmacológicas como: antimicótico, anticolesterolémico, antiparasitario, antiinflamatorio, anticancerígena, antitumorales, antiulcéricas, antioxidante, antitóxico, antialérgico, analgésico, anestésico, antituberculoso, antiviral, citostático, desodorante y epitelizante, entre otras (Ataç-Uzel *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Gomez-Romero *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Lotti *et al.*, 2010). Sin embargo, la propiedad más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides (Asis, 1989).

En general, el propóleo es un producto tolerado, sin embargo faltan estudios sobre los efectos alérgicos debido a las ceras presentes en estos productos. No obstante, se han reportado casos de dermatitis asociados a ciertos propóleos (Hasan *et al.*, 2005; Gambichler *et al.*, 2004; Kuegler *et al.*, 2005; Callejo, 2001).

Propiedades antioxidantes.

Las propiedades antioxidantes del propóleo también son notables. Algunos compuestos antioxidantes identificados incluyen ácido ferúlico, quercetina y ácido cafeico (Urzua, 2004)

Composición química del propóleo.

El propóleo es una sustancia compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% granos de polen (Grange y Davey, 1990; Asís, 1989) (Cuadro 2).

Más de 300 compuestos químicos se han descrito en los propóleos de diversos orígenes (Castaldo y Capasso, 2002; Pereira *et al.*, 2002). En forma similar se han encontrado presencia de flavonoides (Astudillo *et al.*, 2000). En otras muestras se demostró la presencia de resinas, bálsamos, ceras, esencias, polen y sales minerales, así como terpenos. Entre estos últimos se ha reportado la presencia acacetina, ácido cinámico, cumarina, galangina, pinocembrina, prenilina y vainillina (Muñoz *et al.*, 2007).

Se ha encontrado presencia de flavonoides en muestras comerciales (Astudillo *et al.*, 2000). Sin embargo, investigaciones sobre propóleos en diferentes áreas geográficas han mostrado grandes diferencias en su composición química (Barberan *et al.*, 1993).

Cuadro 2. Composición química del propóleo.

Resinas y bálsamos	50 a 60 %
Ceras	30 a 40 %
Aceites esenciales y aromáticos	7 a 10 %
Polen	5 %
Ácidos fenólicos	Ácido benzoico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico y ácido cumárico, entre otros.
Sustancias minerales y microelementos.	Pb, Ni, Ag, Fe, Zn, etc.
Vitaminas	Provitamina A y algunas vitaminas del grupo B, como la B ₃

Importancia económica.

Los principales países productores de propóleos en el mundo son: China, Brasil, Argentina, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá. Cabe señalar que el número de países consumidores de propóleos va en aumento (El Economista, 2015).

En el año 2014 en México se produjeron más de 60,000 toneladas de miel con una ganancia mayor a 2,000 millones de pesos ocupando el quinto lugar de producción de miel, pero no se tiene un mercado de propóleos de peso. Con base en los datos recolectados, nuestro país podría convertirse en un país exportador, pero “nosotros nada más producimos 7 toneladas de propóleos”, explicó el doctor Tonatiuh Cruz (El Economista, 2015), siendo Yucatán el principal productor con un aproximado de más de 8 mil toneladas anuales.

Se reporta que en México se venden 7 toneladas de propóleo al año lo cual equivale a una ganancia de 3.5 millones de pesos. Cada kilogramo de propóleo se estima en \$500 y mientras que en el extranjero se llega a pagar \$1800 o 100 dólares en el extranjero (SAGARPA, 2015).

Dado lo antes mencionado se puede observar que el propóleo es un producto natural que potencialmente puede ser exportado y por lo tanto debe ser estudiado.

ANTECEDENTES.

Los siguientes estudios sobre propóleo demostraron tener una actividad antimicrobiana siendo esta una de las más importantes propiedades que presenta el propóleo. Las cepas Gram positivas y Gram negativas con las que se trabajó son de suma importancia médica para el hombre.

Cuadro 3. Estudios realizados con propóleo en los estados de la República Mexicana.

Autor	Título del trabajo		Año
Tolosa y Caizares	Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche.	Realizaron un estudio en donde obtuvieron y caracterizaron extractos etanólicos y acuosos de diferentes muestras de propóleos recolectados en el estado de Campeche. Probando su efectividad antimicrobiana sobre las bacterias de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i> .	2002
Carrillo et al.,	Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México)	Evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y acuosos de propóleos recolectados en la Huasteca Potosina en cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> . Obteniendo como mejor resultado al extracto etanólico.	2011
Lozano-Guzmán et al.,	Interacción sinérgica de propóleo (Propolis) y orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth s.l.) contra <i>Staphylococcus aureus</i>	Evaluaron el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de orégano (<i>Lippia graveolens</i>) y extractos etanólicos de propóleo contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> por separado y en forma combinada. Los resultados mostraron que ambos extractos tienen un fuerte poder inhibitorio.	2013
Jara	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)	Evaluaron el efecto antibacteriano en cinco propóleos de marcas comerciales y en un extracto metanólico sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sanguinis</i> . Los resultados indicaron que el extracto metanólico presentó mayor actividad antibacteriana.	2014

JUSTIFICACIÓN.

El propóleo ha causado interés en los investigadores de las últimas décadas debido a varias propiedades biológicas y farmacológicas. Sin embargo, con el paso de los años y con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, decayó el uso de la apiterapia y del propóleo, pero es a partir de los últimos veinte años los científicos se han dedicado a estudiarlo y han demostrado las propiedades y actividades del mismo, coincidiendo con lo que pensaban y obtenían como resultados nuestros antepasados (Farré *et al.*, 2004).

Se postula que diferentes propóleos pueden presentar diferentes propiedades químicas y farmacológicas (Bankova, 2000). Por lo tanto, la estandarización de los propóleos es una necesidad que permitirá conocer la calidad y eficacia, es decir, demostrar una actividad biológica específica.

Adicionalmente, algunas investigaciones han sido dirigidas hacia el estudio de la actividad antioxidante (Wang *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2007; Trusheva *et al.*, 2006) obteniéndose resultados altamente prometedores.

Es por este motivo que en el presente estudio se pretende ampliar el conocimiento sobre este producto natural, a partir de su extracto metanólico, al determinar su actividad antibacteriana frente a algunas cepas de bacterias, ya sean Gram positivas o Gram negativas, su capacidad antioxidante, la cuantificación de sus compuestos fenólicos y flavonoides, además de la caracterización de algunos de sus compuestos químicos.

Por otro lado, cabe señalar que los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias pueden ser de naturaleza intrínseca (es decir, lo poseen todas las bacterias de la misma especie o grupo bacteriano) o bien de manera adquirida (sólo lo poseen ciertas bacterias de la especie) (Torres, 2012). Por lo cual el propóleo es una gran alternativa.

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Determinar la actividad antibacteriana de un propóleo de Michoacán.

Objetivos particulares.

- Obtener los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de propóleo por maceración y rendimientos de cada uno de ellos.
- Determinar la actividad antibacteriana, de cada uno de los extractos de forma cualitativa (difusión de agar de Kirby-Baüer) y cuantitativa (microdilución en caldo).
- Determinar la actividad de los extractos sobre las curvas de crecimiento bacteriano.
- Cuantificar la capacidad antioxidante por medio de la reducción (DPPH), fenoles totales (técnica de Singleton modificada) y flavonoides totales (técnica de Dowd) de cada uno de los extractos obtenidos.
- Realizar la caracterización química (GC-MS), HPLC-DAD de los extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

La muestra de propóleo con la que se llevó a cabo este proyecto fue colectada el día 16 de noviembre de 2016 en el Apiario ubicado en el Cerro La Mole, del estado de Michoacán, México. Se determinaron las características organolépticas siguiendo los lineamientos establecidos en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SAG/GAN-2017 y se limpió para retirar todas las impurezas como residuos de madera, alas, patas, etc. (APÉNDICE 1).

Extractos.

Se obtuvieron por maceración agregando solventes de menor a mayor polaridad (hexano, cloroformo y metanol) (Domínguez, 1973). (APÉNDICE 2).

Actividad antibacteriana.

Se utilizaron cepas bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis* (B1), *Enterococcus faecalis* (B2) y *Staphylococcus aureus* (B13) Gram negativas como: *Actinomyces viscosus* (B3), *Pseudomonas aeruginosa* (B4), *Pantoea agglomerans* (B5), *Enterobacter aerogenes* (CDBB-B-958) (B6), *Enterobacter aerogenes* (Donada por la FES Cuautitlán) (B7), *Escherichia coli* (B8), *Shigella flexneri* (B9), *Proteus mirabilis* (B10), *Salmonella typhimurium* (B11), *Salmonella typhi* (B12), (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cepas bacterianas utilizadas.

Tipo	Cepa	ATCC, clasificación o donadas
Gram positivas.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CDBB-B-1533 cepario del CINVESTAV
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Donada por la CUSI de la FES Iztacala
Gram negativas.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDBB-B999 cepario del CINVESTAV
	<i>Pantoea agglomerans</i>	CDBB-B959 cepario del CINVESTAV
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDBB-B-958
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Donadas por la FES Cuautitlán
	<i>Escherichia coli</i>	Donada por el laboratorio de análisis clínicos FES Iztacala
	<i>Shigella flexneri</i>	
	<i>Proteus mirabilis</i>	Caso clínico donada por el Hospital los Ángeles
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Donada por la FES Cuautitlán
	<i>Salmonella typhi</i>	CDBB-B-1111 Cepario del CINVESTAV
	<i>Actinomyces viscosus</i>	WFCC 449 se compró en el ENCB (IPN)

Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana

Se realizó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer, siguiendo los lineamientos establecidos en la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-003-SAG/GAN-2017. Los sensidiscos fueron impregnados con 16 mg del extracto a probar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol; como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10 µL del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (APÉNDICE 3).

Evaluación cuantitativa.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), así como, la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó la microtécnica de dilución en caldo, probando un abanico de concentraciones. Las cajas se inocularon con 50 μL de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL y se incubaron durante 24 horas (Koneman *et al.*, 1996) (APÉNDICE 4).

Actividad del propóleo sobre la curva de crecimiento bacteriano.

El efecto bactericida o bacteriostático de los extractos se determinó sobre una curva de crecimiento bacteriano. Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa. Se monitoreó su crecimiento en cuatro tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto (1/2 CMI, CMI y CBM) y un grupo testigo (Muroi *et al.*, 1993) (APÉNDICE 5).

Capacidad antioxidante

Se definió con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se cuantificó con la Concentración Antioxidante media (CA_{50}). Como control positivo se utilizó la quercetina y el trolox a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como blanco se utilizaron pozos con 200 μL de MeOH grado HPLC (Okusa *et al.*, 2007) (APÉNDICE 6).

Fenoles totales.

Se cuantificaron por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redox por el método modificado de Singleton *et al.*, 1999 (APÉNDICE 7).

Flavonoides totales.

Se determinaron por el método de Dowd modificado de Praveen y Awang, 2007 (APÉNDICE 8).

Caracterización química de los extractos.

Se realizó una caracterización química por medio de un análisis con una cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC- DAD), así como, una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) (APÉNDICES 9, 10 y 11).

Análisis estadístico.

Para los datos obtenidos de las pruebas cualitativas bacterianas, fueron calculados por cepa y extracto, las siguientes medidas descriptivas: (media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo). Así mismo, se obtuvieron los diagramas de caja (APÉNDICE 12).

Para determinar si existieron o no diferencias significativas entre las diferentes cepas y concentraciones, se realizó un análisis de varianza factorial, en el cual los factores considerados fueron: extracto y cepa.

Todo el análisis realizado fue hecho con el paquete de cómputo estadístico Minitab versión 16.

RESULTADOS.

Características organolépticas.

Se determinó de forma cualitativa las características organolépticas que se obtuvieron del propóleo de Michoacán, México. (Cuadro 3).

Cuadro 5. Características organolépticas para el propóleo de Michoacán, México.

CARACTERÍSTICAS	
COLOR	Pardo a negro
AROMA	Resinoso (tamarindo)
SABOR	Imperceptible casi nulo (cera)
CONSISTENCIA	Maleable



Figura 1. Propóleo en greña de Michoacán, México.

Rendimientos del propóleo.

Se colectaron y pesaron 98.26 gramos de propóleo (peso seco). A partir de este se calculó el rendimiento de cada extracto, dando un mayor rendimiento para el extracto clorofórmico como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Rendimiento de los extractos obtenidos del propóleo en greña de Michoacán, México.

EXTRACTO	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	17.34	17.64
Clorofórmico	54.647	57.65
Metanólico	13.988	14.24



Figura 2. Extractos de propóleo de Michoacán, México.

Actividad antibacteriana.

Evaluación cualitativa

Como se puede observar en el cuadro 7, de los tres extractos el metanólico mostró una mayor actividad en cuanto al diámetro en los halos de inhibición frente a las cepas Gram positivas y Gram negativas, seguido del extracto hexánico y clorofórmico.

Cuadro 7. Halos de inhibición de los tres extractos del propóleo de Michoacán, México.

Tipo de cepa	Cepa bacteriana	Control positivo	Extracto metanólico	Extracto hexánico	Extracto clorofórmico
Gram Positivas	<i>S. epidermidis</i>	11.0	18.2±0.4	6.4 ± 0.5	5.2±2.9
	<i>E. faecalis</i>	19.5	9.6±0.5	7.0±0.0	7.0±0.0
	<i>S. aureus</i>	24.0	12.4±1.1	7.0±0.0	6.0±3.3
Gram Negativas	<i>P. aeruginosa</i>	15.0	17.6±0.5	6.8±0.4	4.0±3.6
	<i>P. agglomerans</i>	21.0	9.8±0.8	6.8±0.4	7.2±0.4
	<i>E. aerogenes</i> CDBB-B-958	24.5	16.2±0.8	6.8±0.4	7.0±0.0
	<i>E. aerogenes</i> FES Cuautitlán	14.2	18.4±1.1	7.0±0.0	2.6±3.5
	<i>E. coli</i>	22.5	11.6±0.5	7.0±0.0	5.6±3.1
	<i>S. flexneri</i>	23.7	16.8±1.7	7.0±0.0	7.0±0.0
	<i>P. mirabilis</i>	16.2	16.6±1.5	8.4±0.5	6.2±3.4
	<i>S. typhimurium</i>	21.0	14.2±1.0	7.0±0.0	5.6±3.1
	<i>S. typhi</i>	21.5	16.6±0.8	7.0±0.0	7.0±0.0
	<i>A. viscosus</i>	21.7	17.8±2.7	6.2±0.4	7.0±0.0

*diámetro promedio en mm de los halos de inhibición ± la desviación estándar. Para el control positivo la desviación estándar fue cero, ya que los halos de inhibición tuvieron el mismo diámetro.

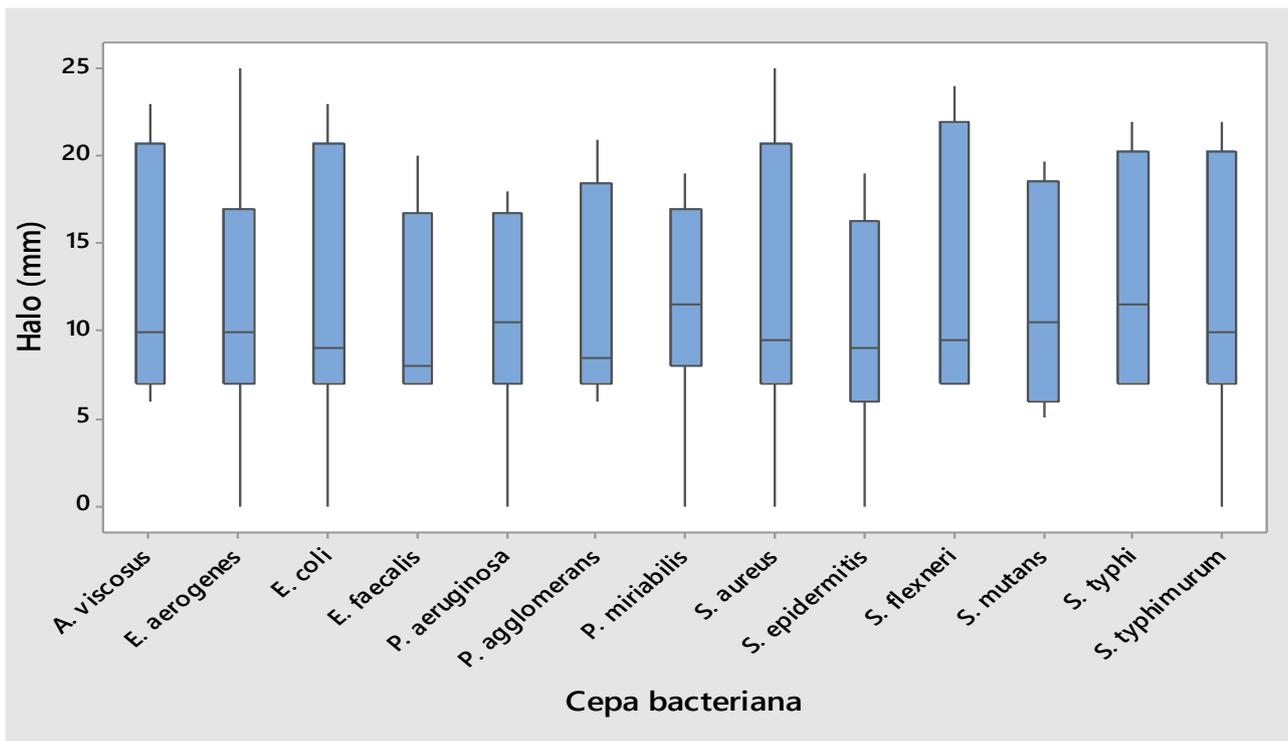


Figura 4. Actividad antibacteriana de los tres extractos del propóleo de Michoacán, México, sobre cada una de las cepas.

Como se muestra en la figura 4 los valores de las medianas, calculadas de los tres extractos, de las cepas bacterianas presentaron valores entre 11.5 mm y 8.0 mm. La cepa que presentó la mediana más alta fue *Salmonella typhi* y *Proteus mirabilis* con una mediana de 11.5 mm. Por el contrario, *Enterococcus faecalis* presentó la mediana más baja (8.0 mm).

Como también se puede observar las cepas *Enterobacter aerogenes* y *Staphylococcus aureus* mostraron una mayor variabilidad en los halos, con valores que van desde 18.0 mm hasta 25.0 mm como máximo.

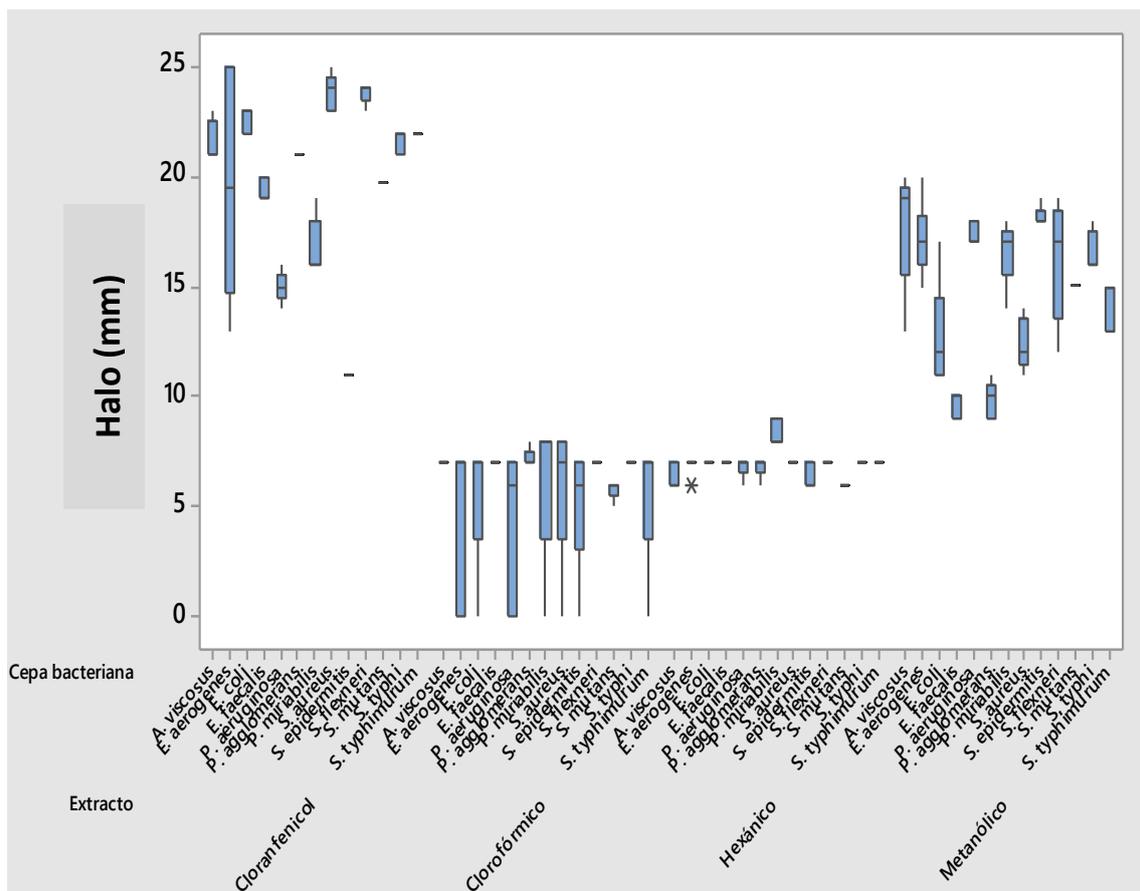


Figura 5. Actividad antibacteriana de los extractos y el control positivo sobre cada una de las cepas bacterianas.

Como era de esperarse Cloranfenicol tuvo los valores más altos de inhibición, con valores que mostraron una mediana de entre 24.0 mm y 11.0 mm.

Staphylococcus aureus y *Shigella flexneri* fueron las cepas que tuvieron la mediana más alta con un valor de 24.0 mm, los valores mínimos que presentaron fueron de 23.0 mm y como máximos de 25.0 mm y 24.0 mm respectivamente.

Por otro lado, *Staphylococcus epidermidis* fue la cepa con la mediana más baja con un valor de 11.0 mm al igual que de sus valores máximos y mínimos.

Para el extracto metanólico las medianas se encontraron entre 19.0 mm y 10.0 mm. La cepa *Actinomyces viscosus* presentó la mayor mediana (con valores mínimos de 13.0 mm y 20.0 mm como máximos). Por otro lado, las cepas *Enterococcus faecalis* y *Pantoea agglomerans* presentaron las medianas más bajas. Con valores mínimos de 9.0 mm y 10.0 mm y 11.0 mm como valores máximos respectivamente.

Para el extracto clorofórmico las medianas se encontraron entre los valores 11.0 mm y 24.0 mm. Las cepas *Staphylococcus aureus* y *Shigella flexneri* fueron las que presentaron las medianas más altas (24.0 mm), mientras que *Staphylococcus epidermitis* presentó la mediana más baja (11.0 mm).

Por último, como se muestra en la figura 5 el extracto hexánico presentó muy poca o casi nada de variabilidad en las medianas, pues se situaron entre 8.0 mm y 6.0 mm. *Proteus mirabilis* fue la única cepa con la mediana más alta (8.0 mm), por el contrario, *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus mutans* fueron las cepas con las medianas más bajas (6.0 mm).

El análisis de varianza factorial mostró que existieron diferencias significativas en la efectividad entre extractos ($F= 856.65$, $P<0.0001$), entre cepas ($F=5.74$, $P< 0.0001$), e interacciones, entre extracto – cepa ($F=9.73$, $P< 0.0001$)

Evaluación cuantitativa.

En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), el extracto metanólico presentó mejor actividad con una CMI de 2 mg/mL frente a bacterias Gram negativas (*Pantoea agglomerans* y *Enterobacter aerogenes*) y Gram positiva (*Staphylococcus aureus*).

El extracto hexánico a una CMI de 4 mg/mL frente a una Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y para el extracto clorofórmico una concentración de CMI de 8 mg/mL en una bacteria Gram positiva (*Actinomyces viscosus*), y una bacteria Gram negativa (*Pseudomonas aeruginosa*). Haciendo evidente que el extracto metanólico fue el que presentó la mejor actividad, como se observa en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Concentración mínima inhibitoria y bactericida mínima de los extractos del propóleo de Michoacán.

Tipo de cepa	Cepa bacteriana	Extractos					
		Metanólico		Hexánico		Clorofórmico	
		CMI mg/mL	CBM mg/mL	CMI mg/mL	CBM mg/mL	CMI mg/mL	CBM mg/mL
Gram positiva	<i>S. epidermidis</i>	2.0	4.0	15.0	> 20.0	10.0	20.0
	<i>E. faecalis</i>	2.0	4.0	20.0	> 20.0	10.0	> 20.0
	<i>S. aureus</i>	2.0	4.0	4.0	> 20.0	8.0	> 20.0
Gram negativa	<i>P. aeruginosa</i>	4.0	8.0	15.0	> 20.0	8.0	20.0
	<i>P. agglomerans</i>	2.0	4.0	20.0	> 20.0	10.0	> 20.0
	<i>E. aerogenes</i> CDBB-B-958	4.0	8.0	20.0	> 20.0	20.0	> 20.0
	<i>E. aerogenes</i> FES Cuautitlán	2.0	4.0	20.0	> 20.0	15.0	> 20.0
	<i>E. coli</i>	8.0	10.0	20.0	> 20.0	10.0	20.0
	<i>S. flexneri</i>	8.0	10.0	20.0	> 20.0	20.0	> 20.0
	<i>P. mirabilis</i>	8.0	10.0	20.0	> 20.0	15.0	> 20.0
	<i>S. typhimurium</i>	8.0	10.0	20.0	> 20.0	20.0	> 20.0
	<i>S. typhi</i>	4.0	8.0	20.0	> 20.0	10.0	20.0
<i>A. viscosus</i>	4.0	8.0	15.0	> 20.0	8.0	> 20.0	

Concentraciones expresadas en mg/mL

Actividad de los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico sobre la curva de crecimiento bacteriano.

El extracto metanólico mostró una actividad bactericida sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* a partir de los primeros tiempos en las 3 concentraciones ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM). Como se puede observar en la figura 6 y 7 hay un descenso drástico y significativo de las UFC.

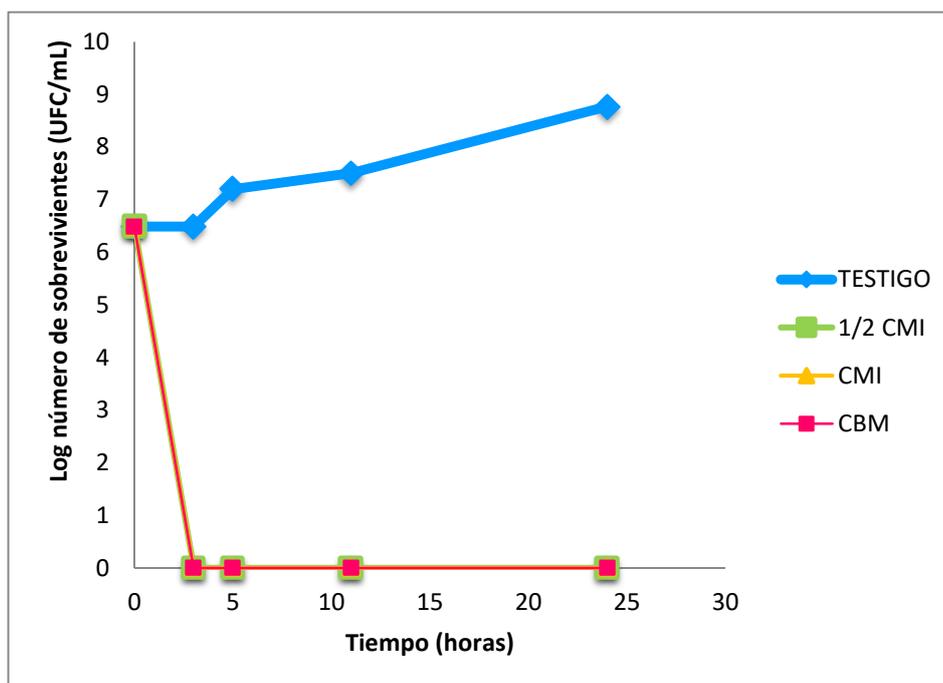


Figura 6. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



Figura 7. Actividad del extracto metanólico a las tres horas de interacción sobre *Staphylococcus aureus*.

En la figura 8, se puede observar que el extracto metanólico, tuvo un efecto bacteriostático ante la cepa bacteriana *Enterobacter aerogenes* (donada por FESC) para $\frac{1}{2}$ CMI y CMI en el que las UFC se mantuvieron durante la cinética.

Por otro lado, se puede observar que para CBM fue totalmente diferente ya que presentó un efecto bactericida desde las cinco horas. Por lo que no se observaron UFC. Cabe destacar que a partir de las cinco horas de interacción las colonias comenzaron a disminuir su grosor y tamaño para las concentraciones de $\frac{1}{2}$ CMI y CMI, a tal grado que no se podían contar a simple vista (figura 9).

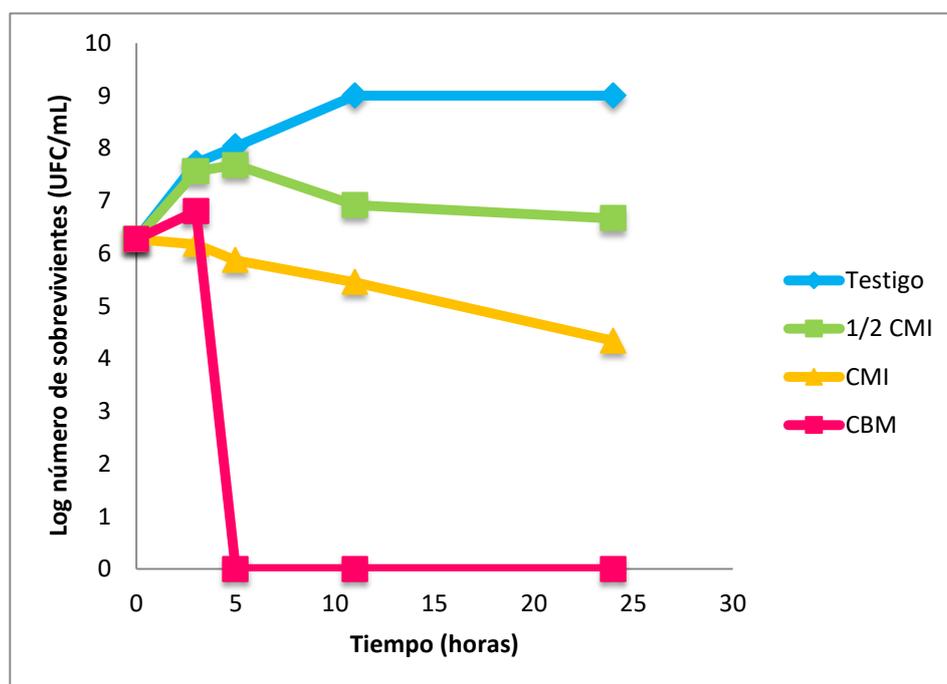


Figura 8. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de *Enterobacter aerogenes* (FES-C).

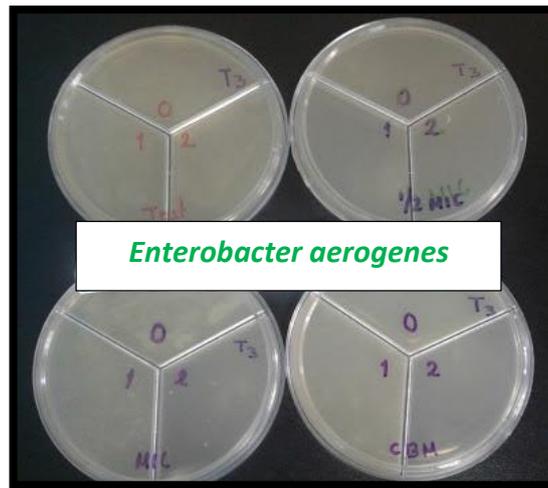


Figura 9. Actividad del extracto metanólico a las once horas de interacción sobre *Enterobacter aerogenes* (FES-C).

En el extracto hexánico se observó muy poca o casi nula la actividad antibacteriana sobre *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, a las once horas de interacción se nota un descenso de las UFC en CBM bastante drástico y significativo, aunque después de este tiempo se recuperan y ascienden nuevamente, aunque no al mismo número como se encontraban anteriormente.

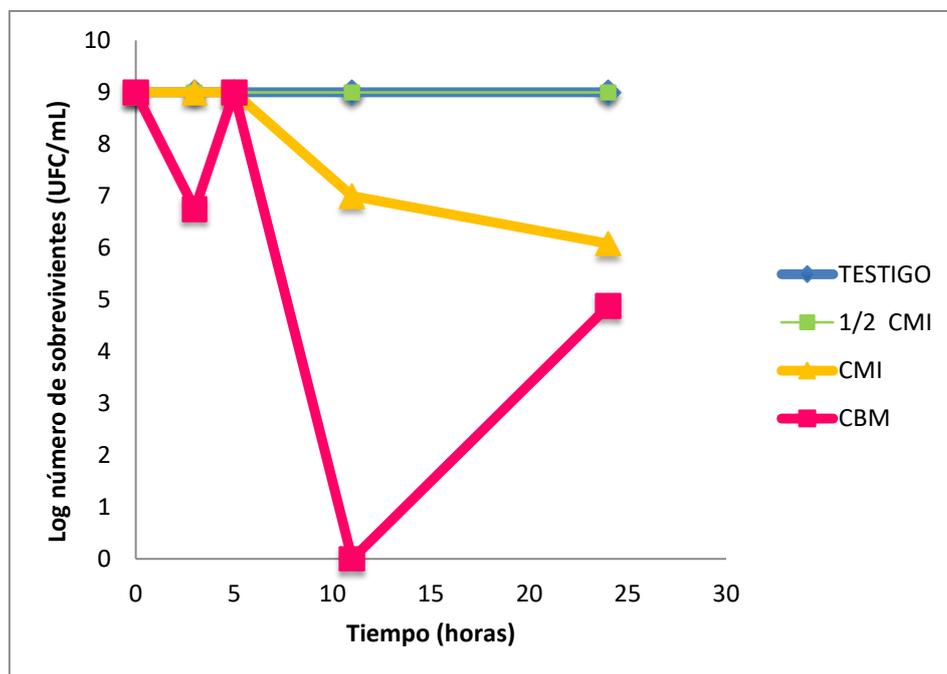


Figura 10. Actividad del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium*

Por otro lado, se mostró una actividad bactericida del extracto hexánico sobre *Staphylococcus aureus* la cual desde las tres horas de interacción comenzó a descender para $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM, como se puede observar en la figura 11. El descenso de las UFC fue muy notorio y drástico.

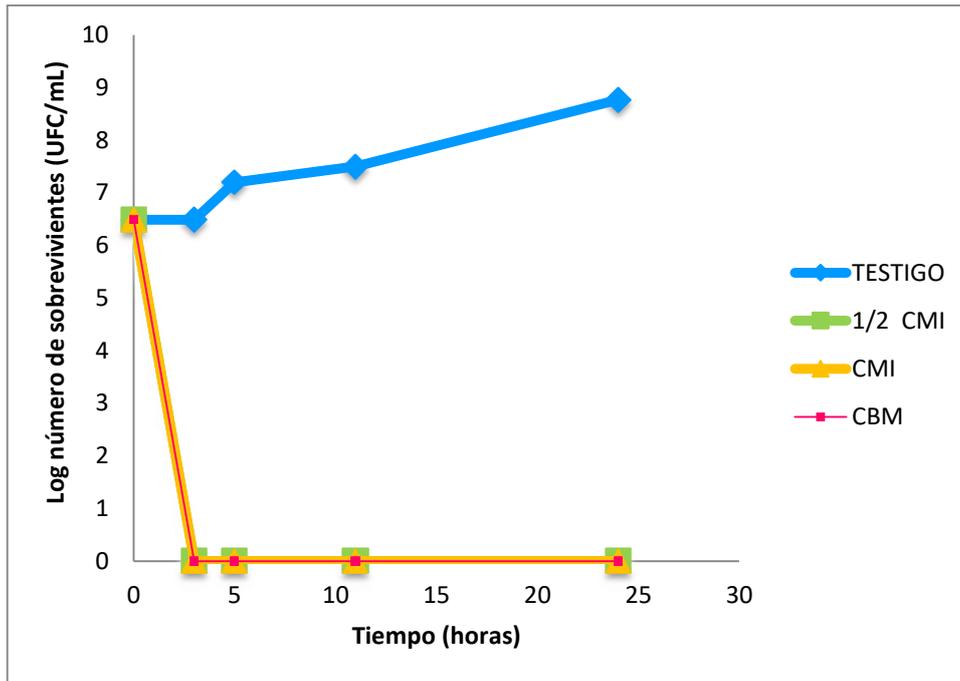


Figura 11. Actividad del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



Figura 12. Actividad del extracto hexánico a las cinco horas de interacción sobre *Staphylococcus aureus*.

Por ultimo en el extracto clorofórmico mostró muy poca actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* se puede notar que desde las tres horas de interacción hasta las 24 horas de interacción no hay una disminución de UFC en 1/2 CMI, por el contrario, hay un ascenso de UFC y después se estabiliza. Sin embargo, en CMI se observa un comportamiento distinto en donde las primeras horas se ve

un aumento y en seguida un descenso muy drástico sin embargo las UFC se vuelven a reproducir. Algo similar ocurre con CBM, es decir, ocurre un descenso de UFC en los primeros 3-5 horas de interacción y después asciendo las UFC manteniéndose en los últimos tiempos (Figura 13).

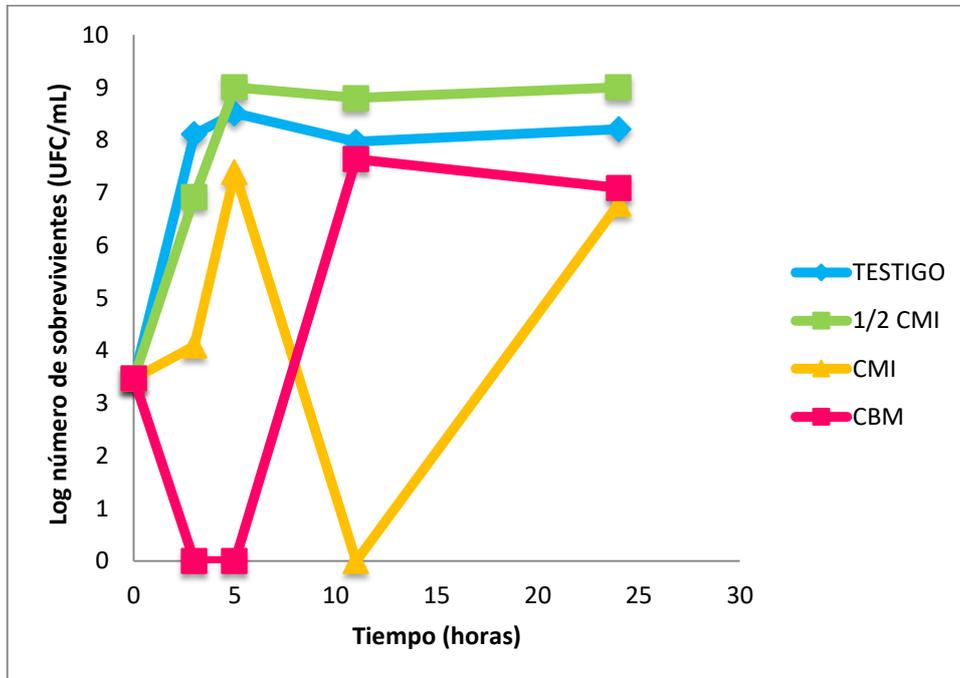


Figura 13. Actividad del extracto clorofórmico sobre la curva de crecimiento de *Escherichia coli*.

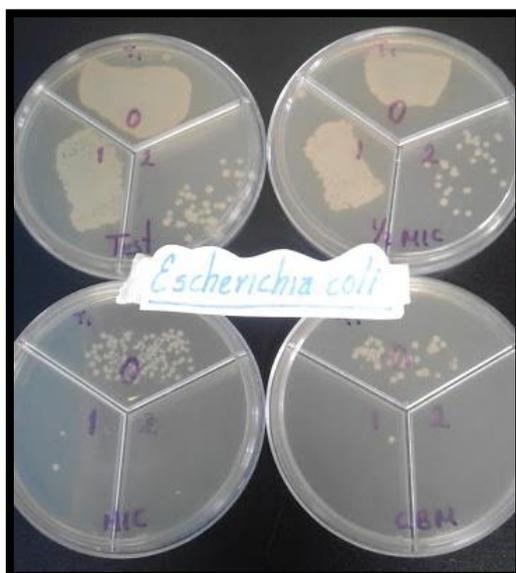


Figura 14. Actividad del extracto clorofórmico a las tres horas de interacción sobre *Escherichia coli*.

Para *Staphylococcus aureus* se muestra un comportamiento totalmente diferente, el extracto clorofórmico se mostró con una actividad bactericida ya que desde el tiempo cero (cuando se inicia el experimento) en la muestra que se sembró en agar y se contó a las 24 horas, se observó que las UFC disminuyeron en $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM. A tal grado que, para los últimos dos tiempos, es decir, a las 11 y 24 horas, el extracto ha evitado el crecimiento de la cepa (Figura 15).

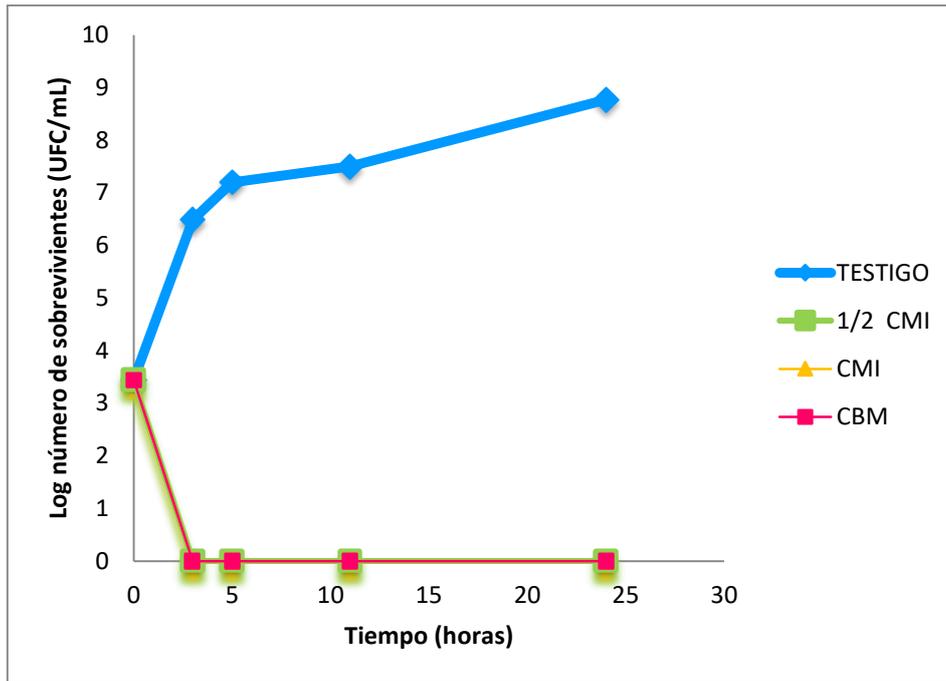


Figura 15. Actividad del extracto clorofórmico sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



Figura 16. Actividad del extracto clorofórmico a las once horas de interacción sobre *Staphylococcus aureus*.

Capacidad antioxidante de los extractos de propóleo de Michoacán, México.

Dadas las propiedades biológicas mostradas, es sabido que algunas de ellas están relacionadas con los compuestos antioxidantes que están presentes en el propóleo. El extracto metanólico presentó una capacidad antioxidante media (CA_{50}) de 13.3 $\mu\text{g/mL}$, el extracto clorofórmico una capacidad antioxidante media (CA_{50}) de 1195.3 $\mu\text{g/mL}$ y para el extracto hexánico una capacidad de antioxidante media (CA_{50}) de 1124.571 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

La Quercetina que fue utilizada como patrón de referencia presentó una capacidad antioxidante media (CA_{50}) de 6.54 $\mu\text{g/mL}$.

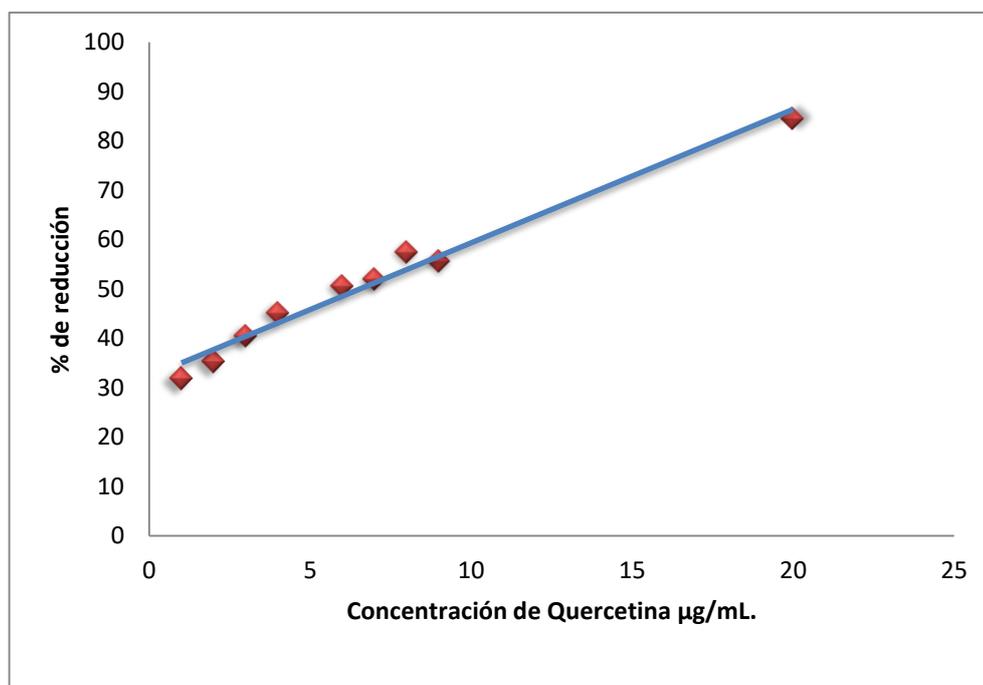


Figura 17. Actividad antioxidante de la Quercetina.

Cuantificación de Fenoles totales.

Los compuestos fenólicos están correlacionados con la capacidad antioxidante, mostrada anteriormente por lo cual se evaluó su contenido presente en cada uno de los extractos de propóleo. Obteniendo una concentración de 0.74 mg eAG/g para el extracto clorofórmico y 0.670 mg (eAG/g) para el extracto metanólico (Figura 18).

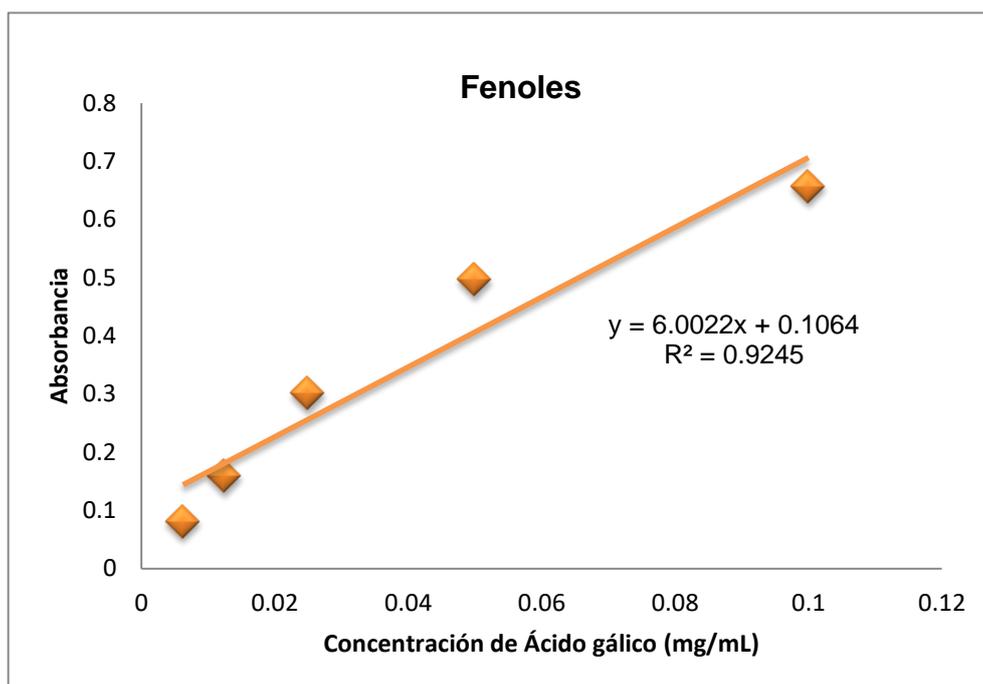


Figura 18. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales.

Cuantificación de flavonoides totales.

Los extractos presentaron flavonoides los cuales son un grupo perteneciente a los fenoles, con una estructura que les permite tener un poder antioxidante, para atrapar especies reactivas de oxígeno y radical nitrógeno. El extracto metanólico presentó 10.644 $\mu\text{g eQ/g}$ y el extracto clorofórmico 4.891 $\mu\text{g eQ/g}$.

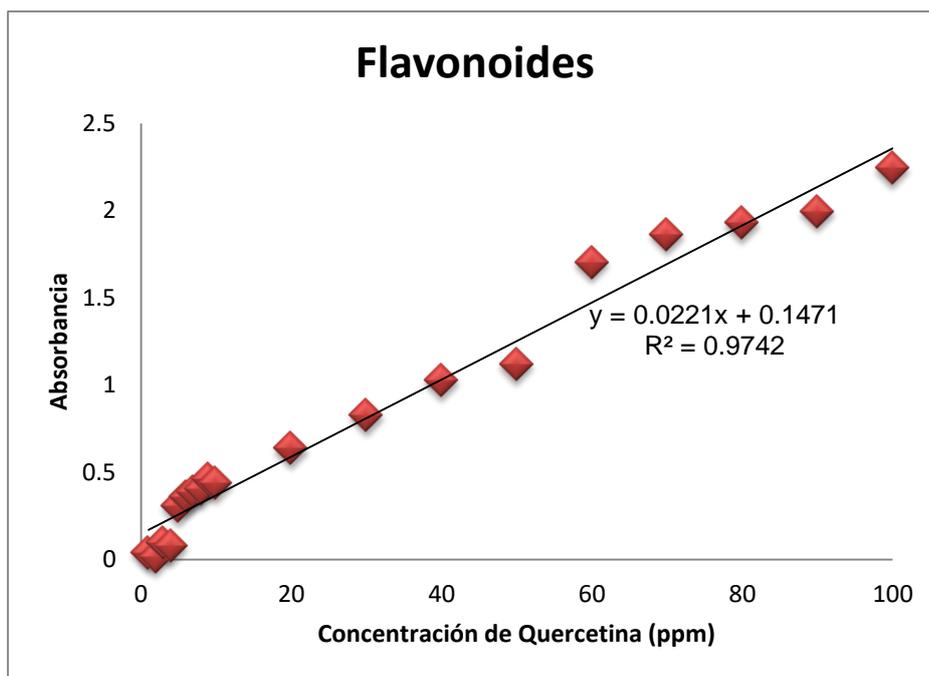


Figura 19. Curva patrón para el cálculo de flavonoides.

Caracterización Química.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

De acuerdo con los resultados del cromatograma (figura 20), con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, los extractos presentaron los siguientes compuestos que se pueden observar en el (Cuadro 9).

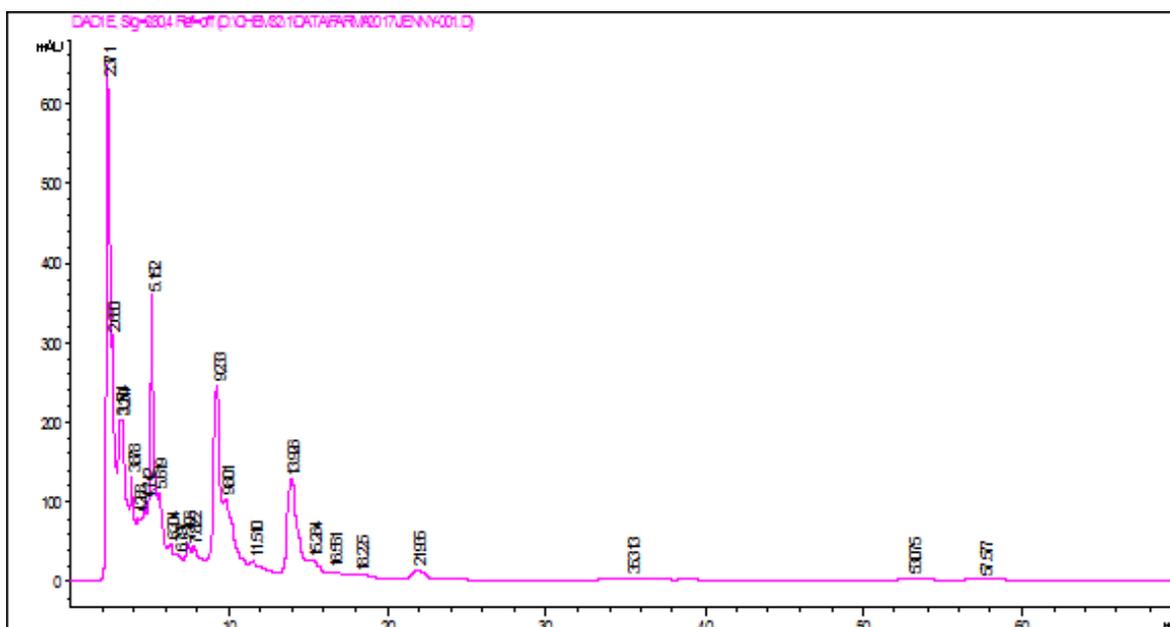
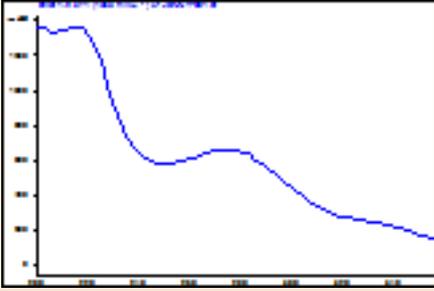
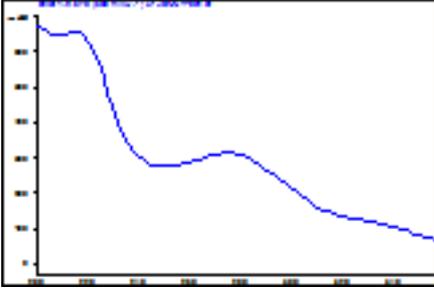
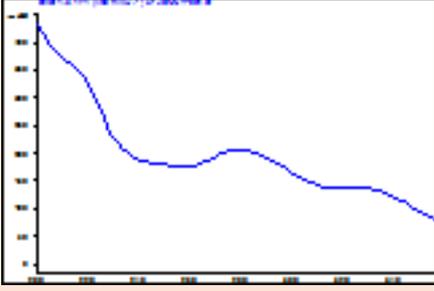
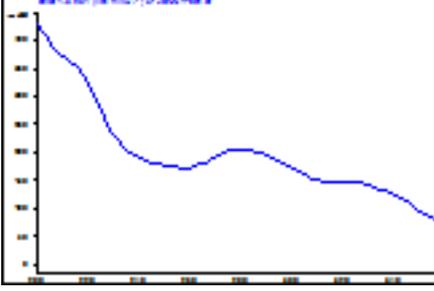
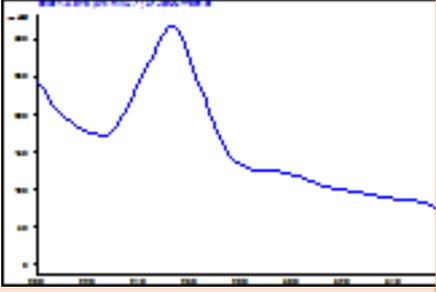
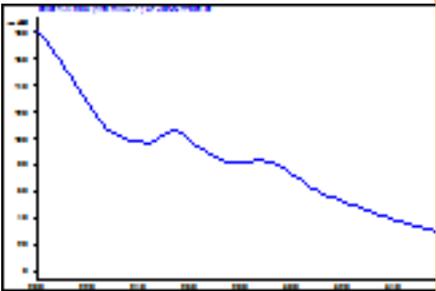
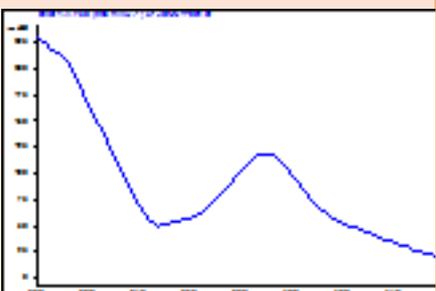
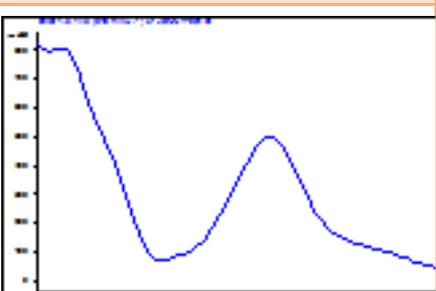
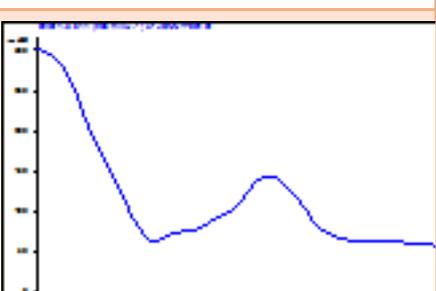
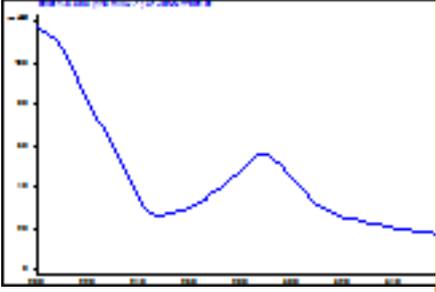
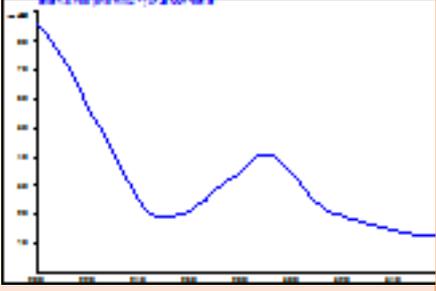
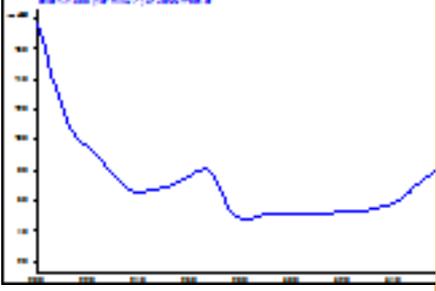
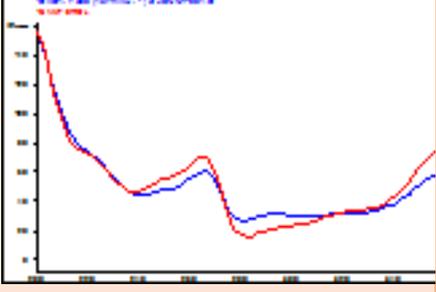
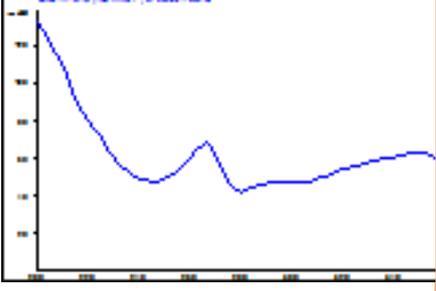


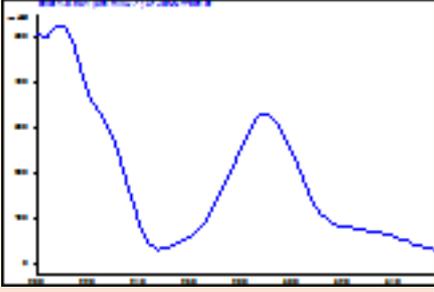
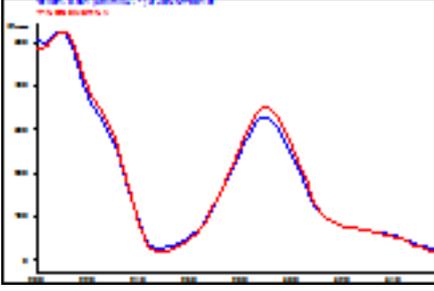
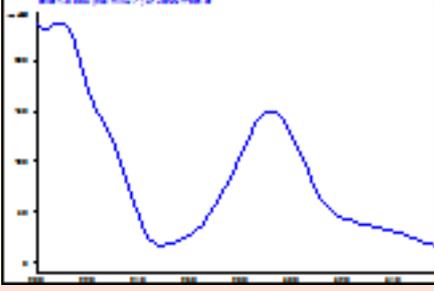
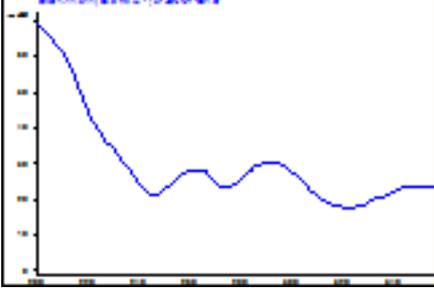
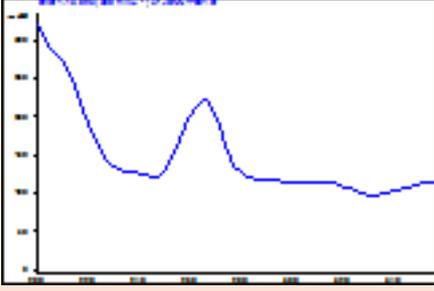
Figura 20. Cromatograma de análisis HPLC del extracto metanólico.

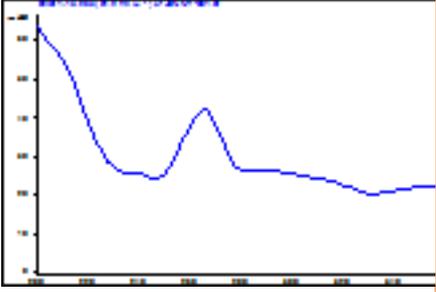
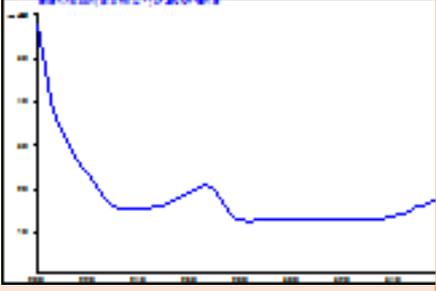
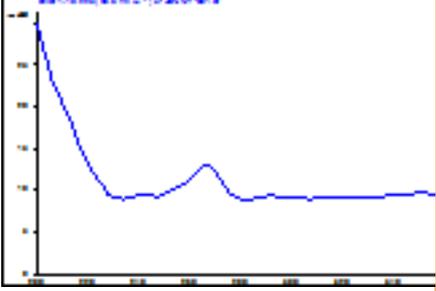
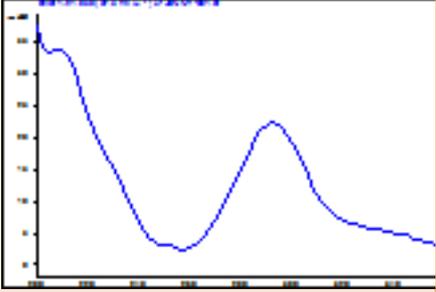
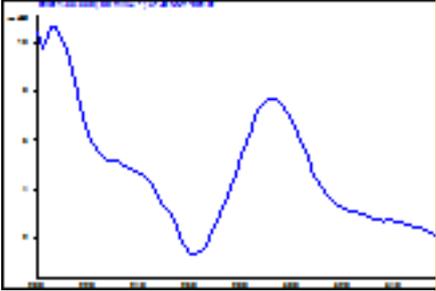
Cuadro 9. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto metanólico.

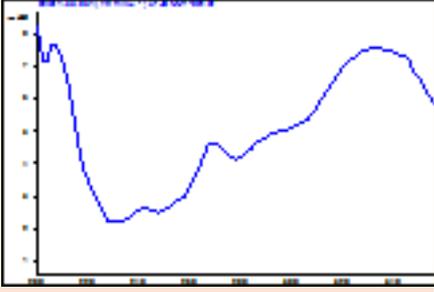
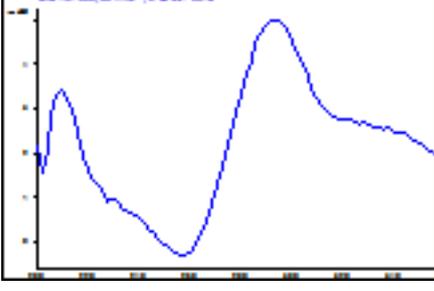
No. compuesto	Espectro de UV	Tiempo de retención (min)	λ max (nm)	Compuesto
1		2.37	216, 274	Fenol simple
2		2.67	216, 276	Fenol simple
3		3.17	218, 278	Fenol simple
4		3.25	216, 280	Fenol simple

5		3.87	254	Fenol simple
6		4.28	254, 288	Ácido fenólico
7		4.73	210, 290	Fenol simple
8		5.14	210, 290	Fenol simple
9		5.61	208, 290	Fenol simple

10		6.30	208, 288	Fenol simple
11		6.79	290	Fenol simple
12		7.39	266, 366	Chalcona
13		7.39	270, 370	Canferol
14		7.81	266, 350	Flavona

15		9.23	210, 230, 290	Flavonoide
16		9.23	290	Pinocembrina
17		9.80	210, 230, 292	Flavonoide
18		11.51	262, 292, 350	Flavonol
19		13.92	210, 266, 310, 354	Flavonol

20		15.26	210, 266, 354	Flavonol
21		16.55	266, 362	Flavona
22		18.22	266, 360	Flavona
23		21.93	208, 292	Flavonoide
24		35.33	208, 232, 292	Flavonoide

25		53.05	208, 242, 268, 334	Flavanona
26		57.56	210, 292	Flavonoide

De acuerdo con los resultados del cromatograma (figura 21), con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, los extractos presentaron los siguientes compuestos que se pueden observar en el (Cuadro 10).

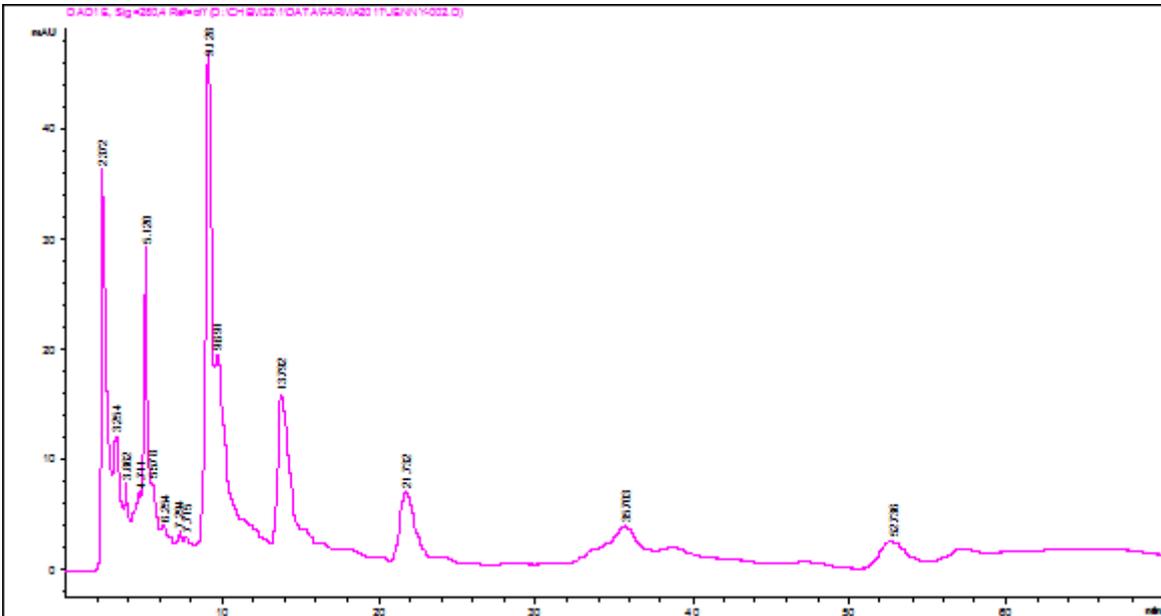
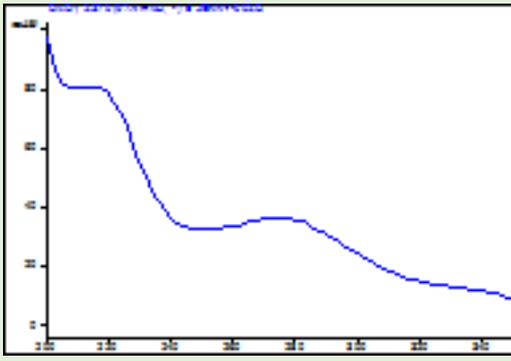
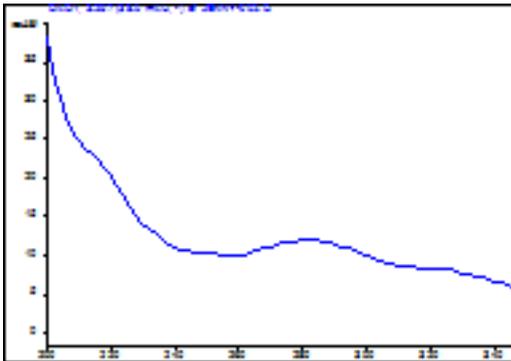
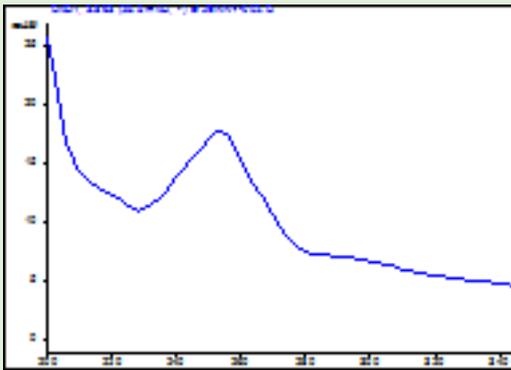
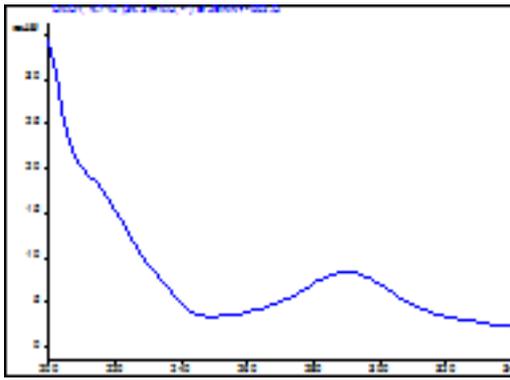
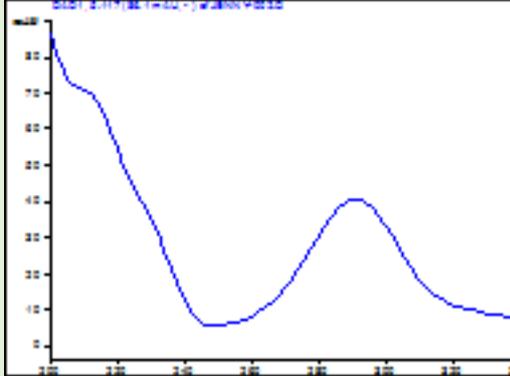
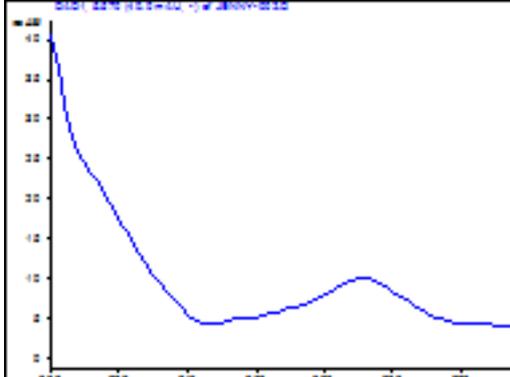
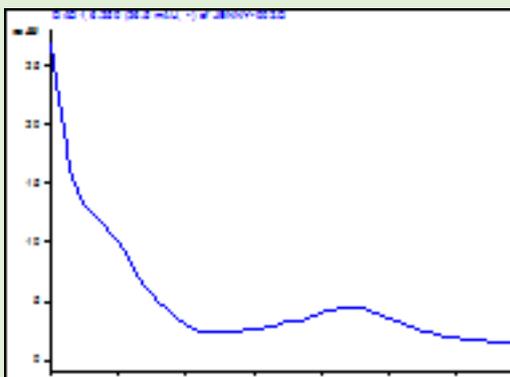
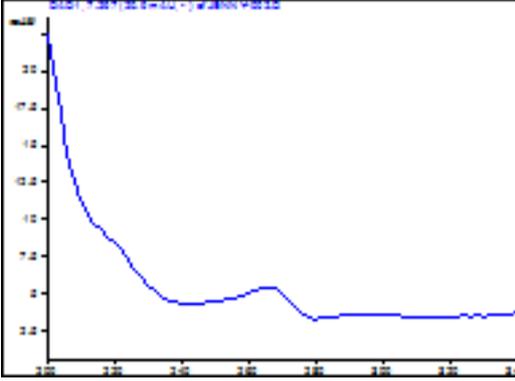
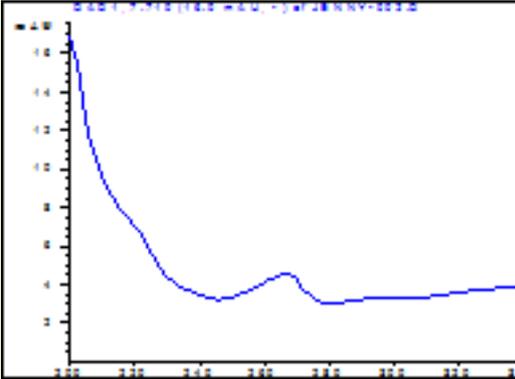
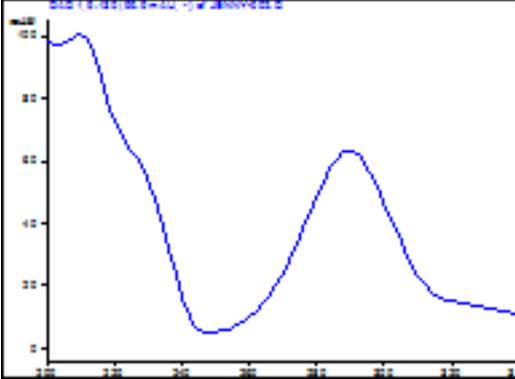
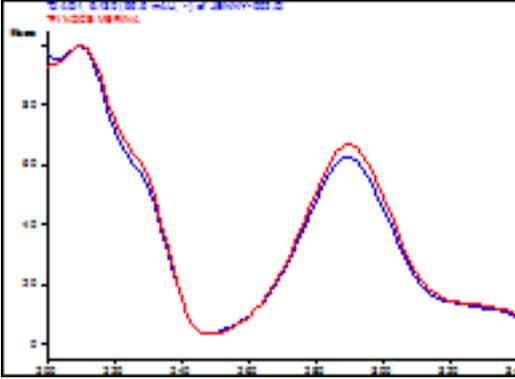


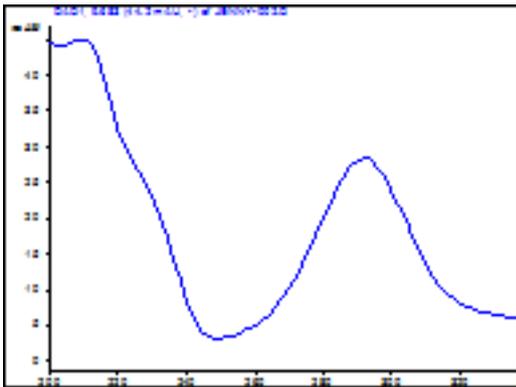
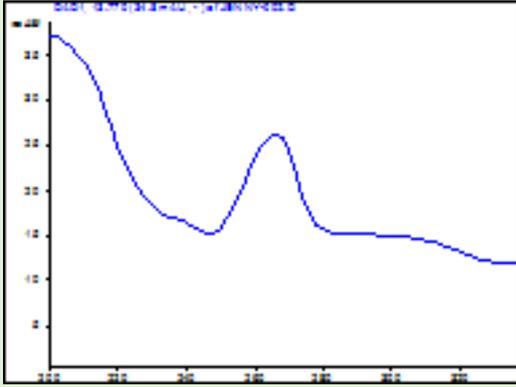
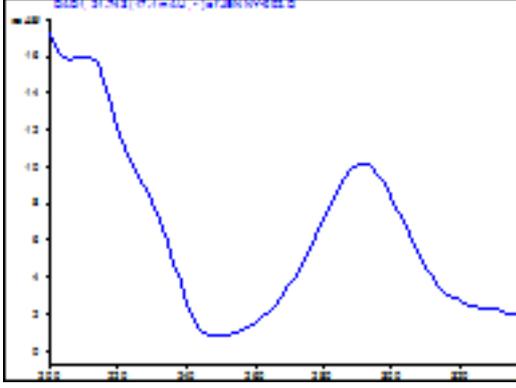
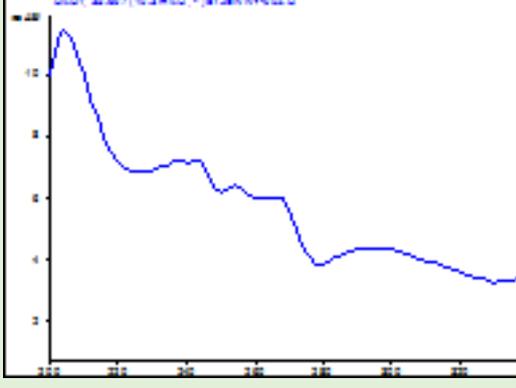
Figura 21. Cromatograma del análisis HPLC del extracto hexánico.

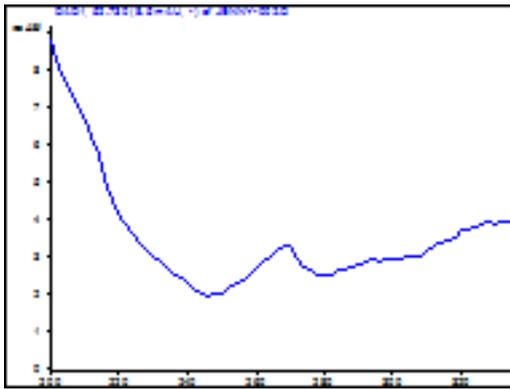
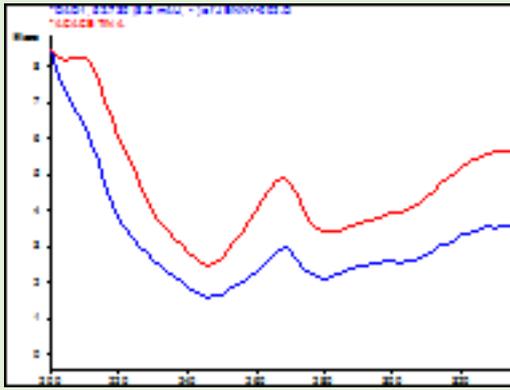
Cuadro 10. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto hexánico.

No. Compuesto	Espectro UV	Tiempo de retención (min)	λ máx (nm)	Compuesto
1		2.37	216, 276	Fenol simple
2		3.25	218, 284	Fenol simple
3		3.86	254	Fenol simple

4		4.71	214, 290	Fenol simple
5		5.11	214, 290	Fenol simple
6		5.57	290	Fenol simple
7		6.25	218, 290	Fenol simple

8		7.29	220, 266, 368	Flanovol
9		7.71	268, 350	Flavonoide
10		9.13	210, 230, 290	Flavonoide
11		9.13	290	Pinocembrina

12		9.68	210, 230, 292	Flavonoide
13		13.77	266, 356	Flavona
14		21.74	210, 292	Flavonoide
15		35.69	204, 242, 298, 358	Flavonol

16		57.73	270, 336	Flavanona
17		57.73	270, 340	Acacetina

De acuerdo con los resultados del cromatograma (figura 22), con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, los extractos presentaron los siguientes compuestos que se pueden observar en el (Cuadro 11).

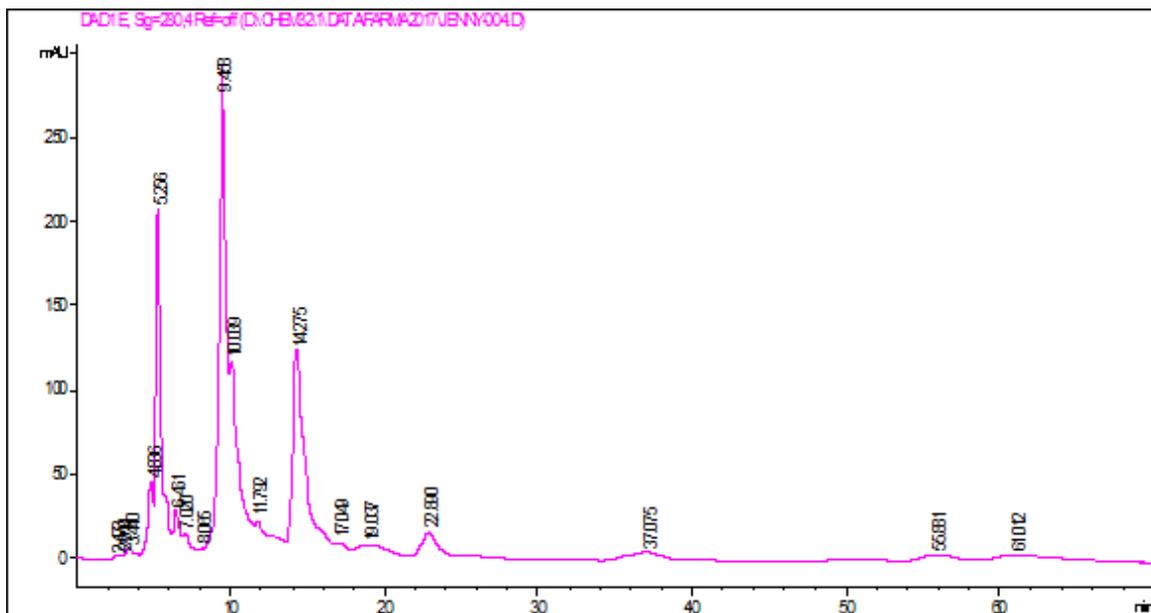
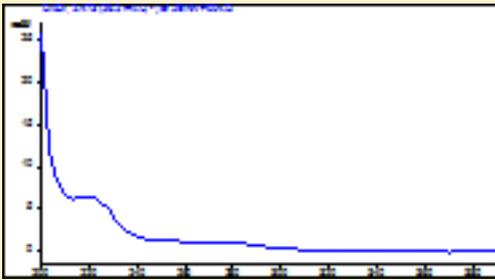
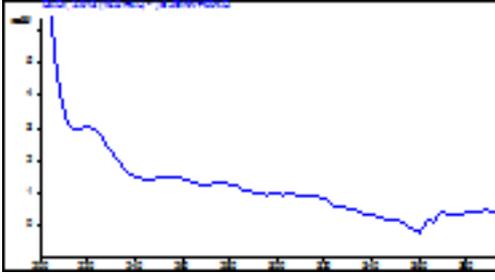
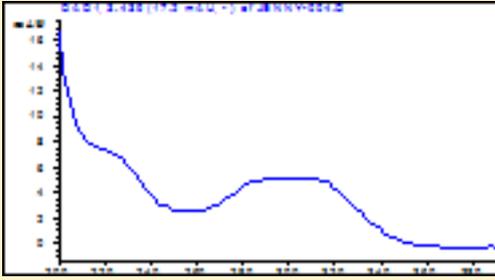
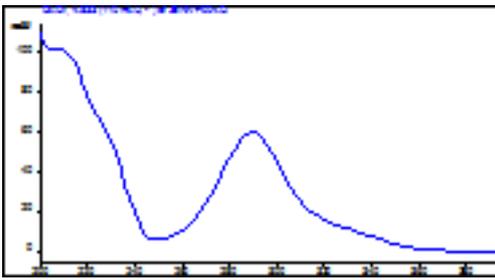
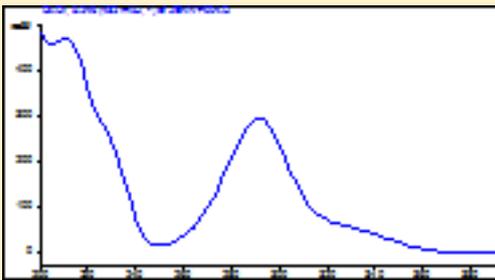
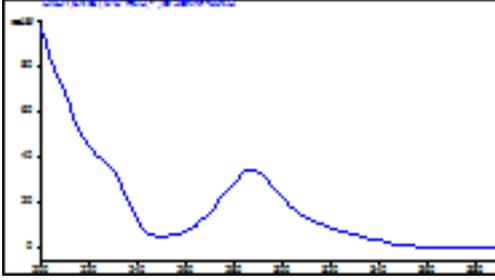
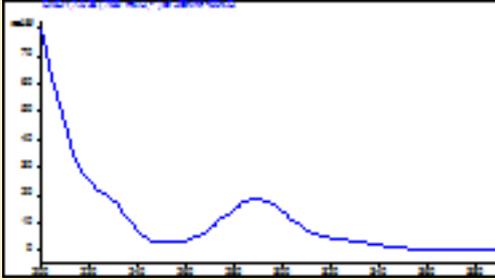
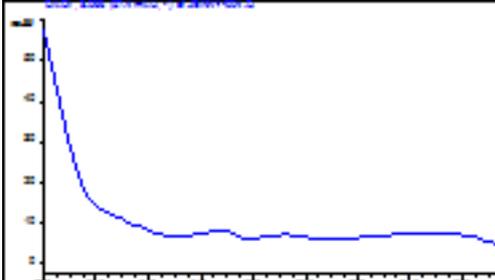
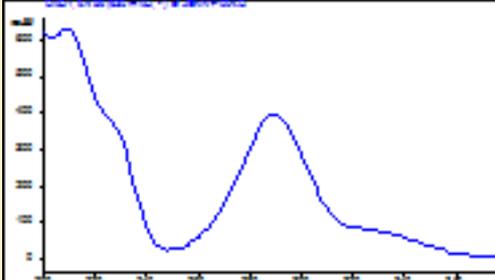
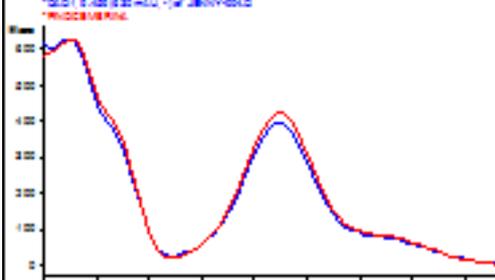
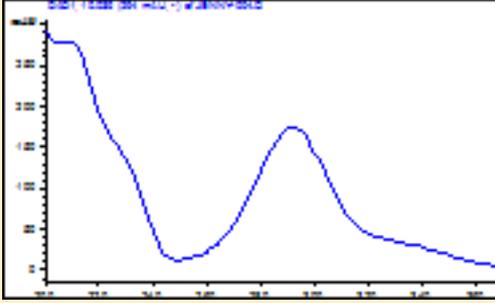
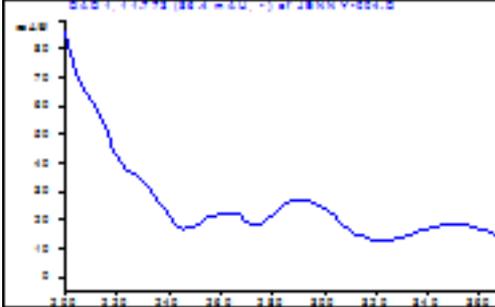
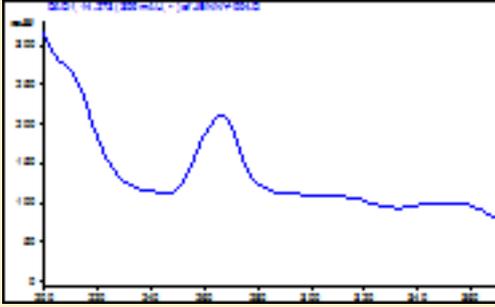
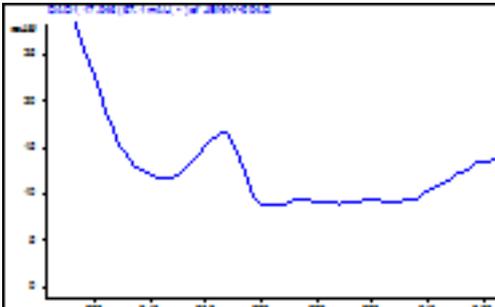
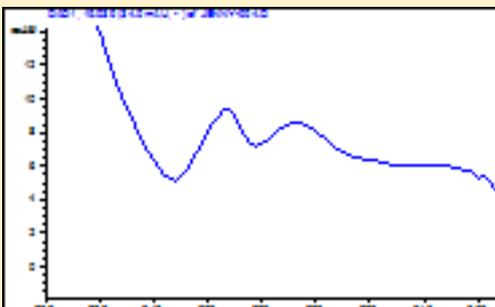


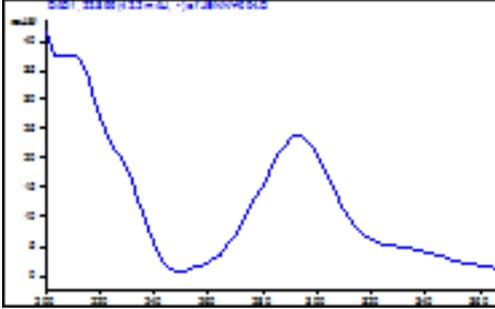
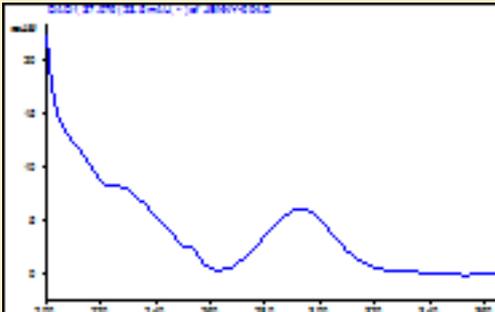
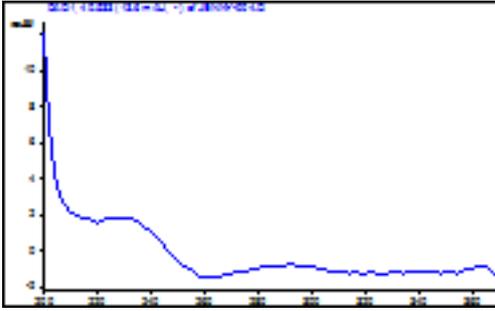
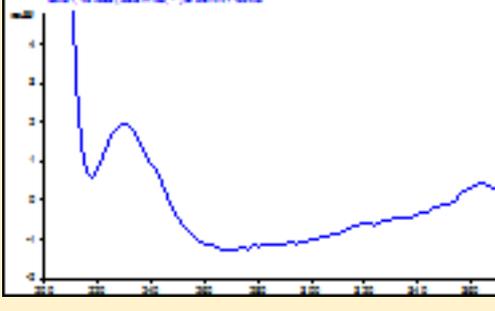
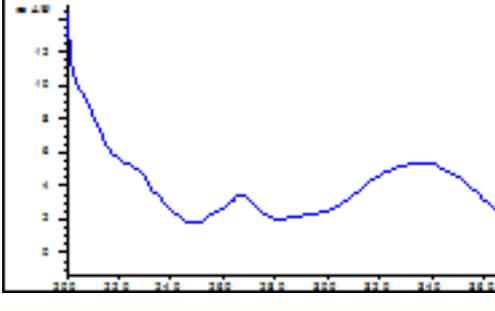
Figura 22. Cromatograma de análisis de HPLC del extracto clorofórmico

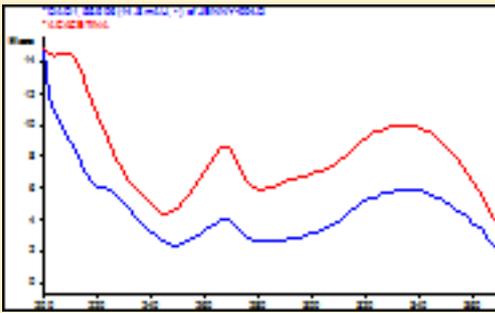
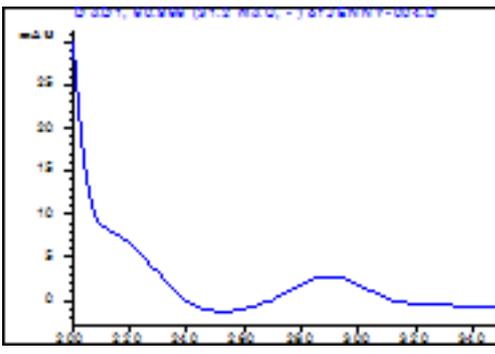
Cuadro 11. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto clorofórmico.

No. Compuesto	Espectro UV	Tiempo de retención (min)	λ máx (nm)	Compuesto
1		2.47	222	Fenol
2		2.91	222	Fenol
3		3.43	226, 298	Fenol
4		4.83	210, 230, 290	Flavonoide
5		5.24	210, 290	Flavonoide

6		6.46	230, 286	Flavonoide
7		7.03	230, 288	Flavonoide
8		8.06	266, 292	Flavonoide
9		9.45	210, 230, 290	Flavonoide
10		9.45	290	Pinocembrina

11		10.03	210, 230, 290	Flavonoide
12		11.77	262, 292, 350	Flavonoide
13		14.27	212, 266, 352,	Flavonoide
14		17.04	266, 364	Chalcona
15		19.03	288, 294	Flavonoide

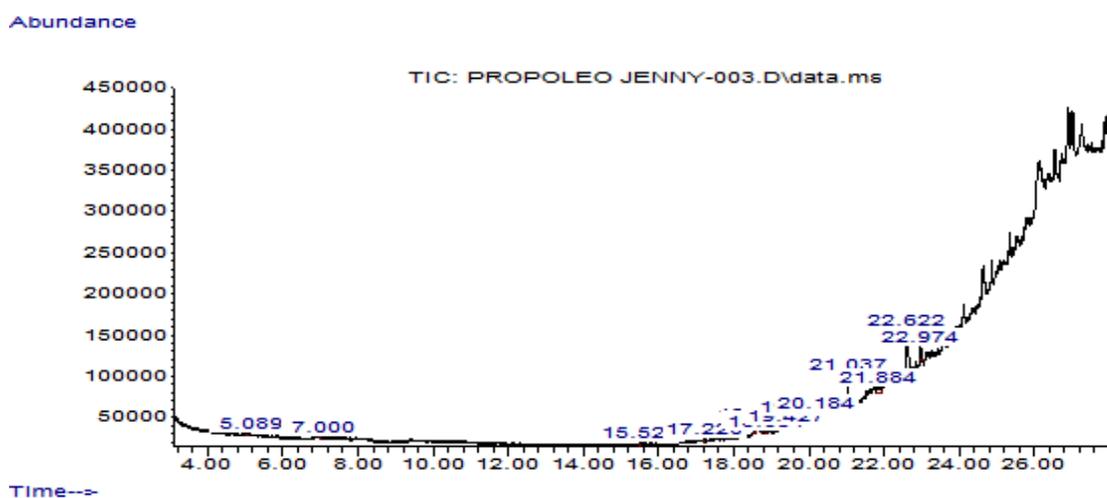
16		22.89	210, 292	Flavonoide
17		37.07	228, 292	Flavonoide
18		40.53	230, 290	Flavonoide
19		49.93	230	Flavonoide
20		55.83	268, 332	Chalcona

21		55.90	222, 290	Fenol
22		60.96	270, 340	Acacetina

Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

El propóleo utilizado en este estudio se sometió a un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el siguiente cromatograma (figura 23) y el cuadro 12 muestran los diferentes componentes volátiles del extracto metanólico.

Figura 23. Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico.

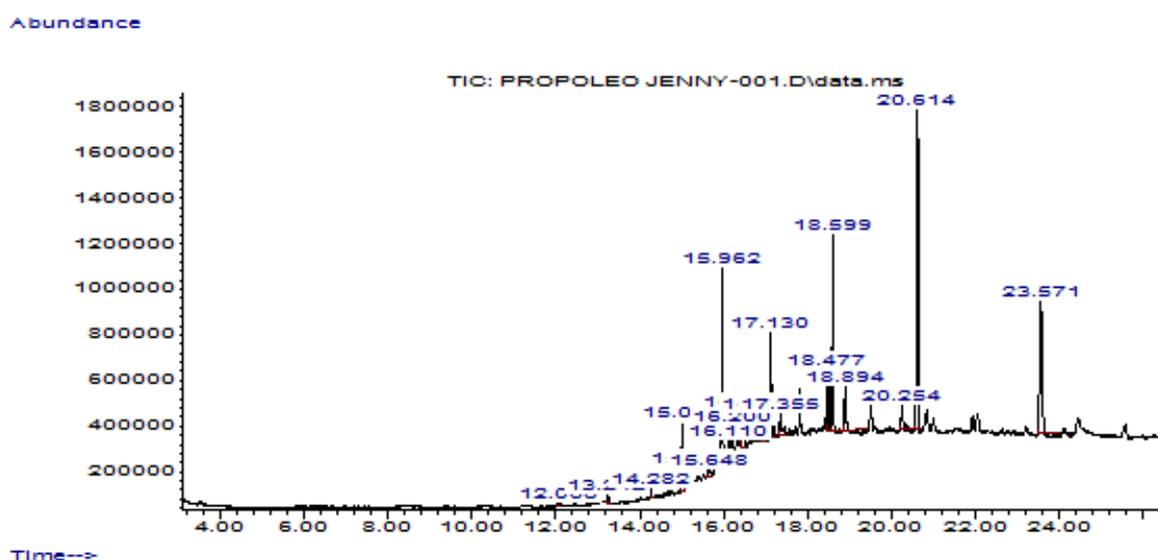


Cuadro 12. Compuestos volátiles presentes detectados en el extracto metanólico.

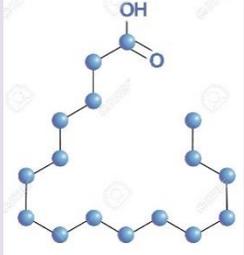
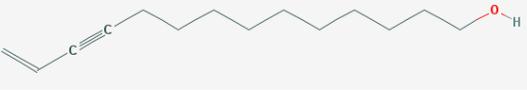
No. Compuesto	Tiempo de retención (min)	% Área
1	18.77	1.15
2	18.89	1.03
3	19.31	1.25
4	19.42	1.05
5	20.18	1.70
7	22.62	44.01
8	22.97	2.55

Se detectaron 8 compuestos, pero ninguno pudo ser identificado con la base de datos del equipo.

El propóleo utilizado en este estudio se sometió a un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el siguiente cromatograma (figura 24) y el cuadro 13 muestran los diferentes componentes volátiles del extracto hexánico.



Cuadro 13. Compuestos volátiles presentes detectados en el extracto hexánico.

No. compuesto	Tiempo de retención	% Área	Compuesto	Estructura química
1	15.00	5.21	Ácido palmítico	
2	15.96	12	13-Tetradec-11-yn-1-ol	
3	17.13	31.28	Eicosano	

El propóleo utilizado en este estudio se sometió a un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el siguiente cromatograma (figura 25) y el cuadro 14 muestran los diferentes componentes volátiles del extracto clorofórmico.

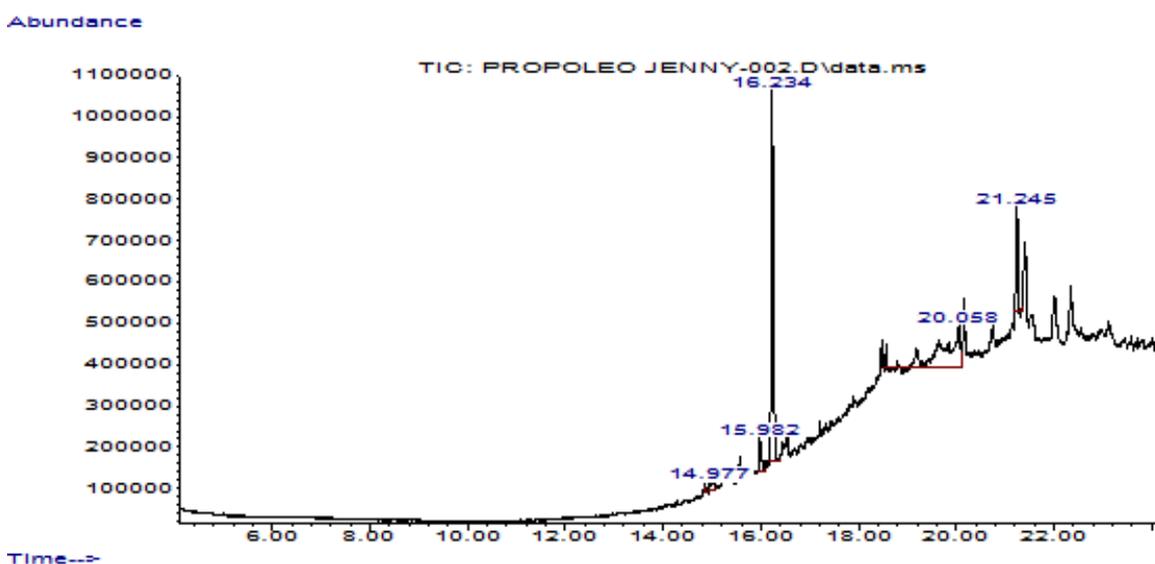
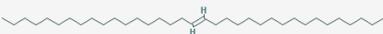


Figura 25. Cromatograma de la CG-EM del extracto clorofórmico.

Cuadro 14. Compuestos volátiles presentes detectados en el extracto clorofórmico.

No. compuesto	Tiempo de retención (min)	% Área	Compuesto	Estructura orgánica
1	16.23	41.90	Hentriacontano	
2	21.24	12.06	17-Pentatriaconteno	

DISCUSION.

El estudio del propóleo durante los últimos años ha tenido una gran importancia, ya que se han encontrado un gran número de propiedades, tales como la actividad antibacteriana (Chaillou *et al.*, 2004) y antioxidante (Palomino-García, 2009; Bedascarrasbure *et al.*, 2004). Algunas de estas propiedades han sido relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides (Palomino-García, 2009), a pesar de que en México el propóleo es empleado desde hace muchos años como parte de la medicina tradicional y de que existe una gran variedad de productos comerciales, son muy pocos los estudios que se han realizado respecto a su actividad biológica (Quintero *et al.*, 2008).

En el propóleo se han encontrado moléculas con actividad antimicrobiana como los metabolitos secundarios (flavonoides, cumarinas, terpenos), que son utilizados como mecanismos de defensa contra patógenos, esto concuerda con lo reportado por autores como Moreno *et al.*, (2007). También Se ha observado que la mejor recolección de propóleo es antes de la llegada del invierno para climas templados, mientras que, en climas tropicales, la mejor época de recolección es al inicio de la estación lluviosa (Farré *et al.*, 2004).

El primer paso para aislar los compuestos biológicamente activos de los extractos naturales, es el proceso de extracción, debido a que en este paso se debe obtener el o los compuestos de interés para su posterior purificación (Fabricant y Farnsworth, 2001).

Uno de los extractos más comunes que utiliza la gente como antiséptico es el extracto etanólico, fue por esto que el metanol se seleccionó como solvente para la elaboración del extracto crudo, obteniendo así un rendimiento de 14.24%, seguido del extracto hexánico con 17.64%, el extracto clorofórmico fue el que presentó mayor rendimiento de 57.65%.

La cantidad de cera presente en el propóleo resultó alta, posiblemente esté influenciado por múltiples factores: la época del año en que se recolectó, por una mala manipulación del apicultor (Arrate, 2008; Londoño *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2012) un gran contenido de ceras en muestras de propóleos crudos es

desfavorable, porque en esta fracción no están los compuestos fenólicos, los cuales se asocian con la actividad biológica (Cupull-Santana *et al.*, 2013).

Como se pudo observar hubo una variación en los colores obtenidos de los extractos, los cuales van desde el café claro al café oscuro, pasando por el amarillo. Esta variación era esperada, ya que, al utilizar solventes de diferentes polaridades, se extraen compuestos que se disuelven en una proporción mayor en el solvente cuya polaridad es similar a la del compuesto (Figura 2).

En lo referente a los resultados obtenidos en el análisis de varianza factorial se pudo determinar que, si existieron diferencias significativas entre los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico, así como en las cepas. Siendo el extracto metanólico el más activo, teniendo actividad contra las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes* (Figura 6 y 8) además de que mostró los mayores halos de inhibición; el segundo extracto (hexánico) mostró halos de inhibición menores al extracto metanólico (Cuadro 7).

Esto concuerda con lo reportado por Chaillou *et al.*, (2004) y Lotti *et al.*, (2010) quienes estudiaron propóleos argentinos y encontraron que en el 50% de las muestras se registraron halos de inhibición más de 12 mm de diámetro en cepas de *S. aureus*, concluyendo que el diámetro del halo de inhibición depende del contenido de flavonoides en los propóleos utilizados. Otros autores, también refieren la actividad antibacteriana de propóleos de Sonora (Velázquez *et al.*, 2007), Venezuela (Manrique, 2006), Argentina (Chaillou *et al.*, 2004) y Campeche (Tolosa y Cañizares, 2002) contra *S. aureus*, identificando en este último flavonoides y fenoles en su composición.

La acción antimicrobiana que presentan los propóleos puede intervenir en la estabilidad de la membrana, el incremento de la fluidez y la permeabilidad de la misma, la perturbación de las proteínas embebidas en la membrana, la inhibición de la respiración y la alteración del proceso de transporte de iones en las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Carson *et al.*, 2002; Brehm-Stecher y Johnson, 2003) también se ha reportado que algunos flavonoides pueden actuar a nivel de la síntesis de ácidos nucleicos (Cushnie y Lamb, 2005).

Además de lo anterior, fue posible observar una mayor tendencia por inhibir bacterias Gram positivas por parte del propóleo, reduciendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Esto puede deberse a que las bacterias Gram positivas estructuralmente presentan un peptidoglucano que se encuentra dentro de una matriz compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicoicos; lo cual confiere a la pared celular una carga negativa neta, necesaria para que la célula asimile cationes divalentes; esta característica la hace más sensible a los compuestos polares a diferencia de las Gram negativas en las que la membrana es más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 1985).

Según el efecto de su acción sobre las bacterias, los antibióticos se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, y depende de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisis la bacteria, inhibir una ruta metabólica o actuar sobre una enzima (Cué y Morejón, 1998). También para que sea un buen antibiótico debe actuar a cierta concentración y durante determinado tiempo, para asegurar la muerte o limitar el crecimiento de las bacterias (Pelczar y Chan, 1984).

Para conocer si el propóleo presentó una actividad bactericida o bacteriostática y en qué momento empieza a actuar se realizó la prueba de curva de crecimiento bacteriano. El propóleo presentó actividad bactericida sobre *Staphylococcus aureus* ATCC- 33592 (Figura 6 y 7) que es un patógeno que causa infecciones de diversa gravedad en niños y adultos (Laupland *et al.*, 2003). Además, puede causar diversas afecciones, entre las cuales incluyen lesiones superficiales tales como abscesos de piel e infecciones de herida; infecciones sistémicas como bacteriemia o síndromes toxémicos como la intoxicación alimentaria (Espinoza y Gómez, 2007).

Como se menciona, el propóleo tuvo efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, cuyos mecanismos de acción incluyen debilitamiento de la pared celular, de la síntesis proteica e inhibición en el proceso de replicación y expresión genética (Palomino-García, 2009; Lessio *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que las colonias que se contaron tanto para la CMI como para la CBM, después del descenso se observaron mucho más pequeñas

que las del grupo testigo. Esto nos indica que muy probablemente las bacterias fueron afectadas por el propóleo.

De acuerdo con la actividad biológica del extracto metanólico del propóleo frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, se procedió a evaluar la actividad antioxidante, en donde se sabe que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides, así como el ácido ascórbico como lo reporta Soto (2007). Éstos protegen a lípidos y otros compuestos celulares del ataque de agentes oxidantes como los radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos (Drago *et al.*, 2006).

Lo anterior es de suma importancia ya que las células están expuestas a especies reactivas de oxígeno y son capaces de tolerar estados de estrés oxidativo leve. Sin embargo, situaciones extremas de estrés oxidativo pueden afectar el metabolismo celular (Soledad, 2007).

Los seres humanos y la mayoría de los organismos eucarióticos necesitan del oxígeno para mantener una producción de energía suficiente para sobrevivir. Sin embargo, el oxígeno es potencialmente peligroso, principalmente debido a la formación de especies reactivas intermedias durante su utilización (Soledad, 2007), las cuales pueden llegar a lesionar macromoléculas como el ADN, hidratos de carbono y las proteínas (Céspedes y Sánchez., 2000). Esto es a lo que se le denomina la *paradoja aerobia* (Soledad, 2007). Por otro lado, se le puede llamar antioxidante a aquellos compuestos que protegen a lípidos y otros componentes celulares del ataque de estos agentes oxidantes como los radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos (Drago *et al.*, 2006).

De tal manera que es muy importante evaluar la capacidad antioxidante de los propóleos utilizados en este estudio, ya que los seres vivos se encuentran constantemente expuestos a las especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, es de suma importancia destacar que las células pueden tolerar estados de estrés oxidativo leve; sin embargo, situaciones severas de estrés oxidativo pueden afectar el metabolismo celular: a través de la rotura de moléculas de ADN, del

aumento de la concentración de calcio intracelular, del daño a proteínas y/o de peroxidación de lípidos (Soledad, 2007).

Además, con lo mencionado anteriormente cabe destacar que el extracto metanólico del propóleo mostró un total de compuestos fenólicos de 0.670 mg (eAG/g) y 10.644 µg/mL (eQ/g) de flavonoides, esto es importante pues va relacionado con la capacidad antioxidante donde mostró una CA₅₀ media de 412 µg/mL (Figura 18). Esta propiedad antioxidante está relacionada con el gran contenido de flavonoides. Se sabe que el propóleo es una de las fuentes más ricas en flavonoides y ácidos fenólicos, que son ampliamente reconocidos como fuertes antioxidantes (Jasprica *et al.*, 2007).

A este respecto existen reportes contrastantes con respecto al papel de la Pinocebrina como un buen antioxidante ya que, Ahn *et al.*, (2009), encontraron que la pinocebrina mostró una deficiente capacidad antioxidante. Además, Sala *et al.*, (2003), estudiaron las propiedades antiinflamatorias de flavonoides, concluyendo que la pinocebrina exhibe actividad antiinflamatoria.

De este modo; en cuanto a la composición química, los resultados obtenidos mediante el análisis de HPLC y GC-MS realizado a cada uno de los extractos de propóleo, encontramos que son ricos en flavonoides, y el principal compuesto identificado fue la Pinocebrina, esto concuerda con lo reportado por Tolosa y Cañizares (2002), quienes señalan que entre los principales compuestos del propóleo están flavononas (Domingo y López-Brea, 2003), flavonas, flavonoles (Figuras 20, 21, y 22).

El compuesto encontrado en mayor abundancia fue la Pinocebrina la cual posee propiedades antibacterianas, antifúngicas (Cartaya y Reynaldo 2001) así como antioxidantes, ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Castro, 2002). Por otro lado, los compuestos que no se lograron identificar con la base del equipo se debió a que los propóleos son de reciente estudio por lo cual no hay una actualización de la base de datos.

El estudio del propóleo durante los últimos años ha tenido una gran importancia, ya que se han encontrado un gran número de propiedades y el hombre se ha

encargado de aprovechar los nutrimentos en una opción insuperable para satisfacer las carencias en nutrimentos, o para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades (Londoño *et al.*, 2008).

Sin embargo, y a pesar de que en México el propóleo es empleado desde hace muchos años como parte de la medicina tradicional y de que existe una gran variedad de productos comerciales, son muy pocos los estudios que se han realizado respecto a su actividad biológica (Quintero-Mora *et al.*, 2008). Además, en México, la información referente a su composición química y sus propiedades biológicas es escasa. Es así que son importantes los estudios que avalen el uso de estos productos naturales para conocer y establecer las propiedades y composición química de nuestros propóleos mexicanos, ya que estos han demostrado no sólo su eficacia sino su diversidad en cuanto a su composición química y propiedades biológicas.

CONCLUSIONES.

- ❖ Las bacterias Gram positivas fueron más susceptibles que las bacterias Gram negativas a los tres extractos.
- ❖ La especie bacteriana más susceptible resultó ser *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* la más resistente para los tres extractos.
- ❖ El extracto metanólico presentó la mayor actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- ❖ Los tres extractos presentaron una actividad bactericida sobre *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Los extractos metanólico y clorofórmico presentaron una cantidad importante de compuestos fenólicos y flavonoides.
- ❖ El compuesto de mayor abundancia fue la Pinocembrina.
- ❖ Los compuestos fenólicos son importantes en las propiedades antimicrobianas del propóleo.

REFERENCIAS.

- Aguilar A. y Camacho J. R., 1985. Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas. Archivos de la investigación Médica. México suplemento 6, 3-14.
- Aguilar O.C., Sosa V., Aguilar O.M., 2003. Toxic Phenols in Various Anacardiaceae Species. Economic Botany 57, 354-364.
- Ahn M. R., Kumazawa S. A., Usui Y. A., Nakamura J., Matsuka M. B., Zhu F. C., Tsutomu N., 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry 101(4), 1383-1392.
- Ahn M.R., Kunimasa K., Kumazawa S., Nakayama T., Kaji K., Uto Y., Hori H., Nagasawa H., Ohta T., 2009. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. Molecular Nutrition & Food Research 53, 643 – 651.
- Arrate, L., 2008. Propóleo, el “antibiótico” natural de la colmena. Revista Agropesquera 85,56-61.
- Asis, M., 1989. Los productos de la colmena. Centro de Información y documentación, Agropecuario. Cap. 4. Vedado, La Habana, Cuba 45-52.
- Astudillo S., Ávila L. R., Morrison F. R., Gutiérrez M., Bastida J. J., Codina C., Schmeda H.G., 2000. Biologically active compounds from Chilean propolis. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 45, 577-581.
- Ataç U., Kadriye S., Özant Ö., Dilşah Ç., Ömür G., Berkir S., 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiological Research 160,189-195.
- Bankova V. S., De Castro S.L., Marcucci M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31, 3–15.
- Barberán F.A., García V. C., Oliver P.V., Ferreres F., 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry. 34, 191-6.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., Rodríguez, E., 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo argentino. Acta Farmacéutica Bonaerense 23 (3), 369-372.

- Bergey D. R., Howe G. A., Rayn, C. A., 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.* 93, 12053-12058.
- Brehm-Stecher, B., F., Johnson E., A., 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3357-3360.
- Burdock G. A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36, 347–363.
- Callejo, A., A. Armentia, M. Lombardero., C. Martínez, S. Rebollo, E. Sedano E., R. de la Fuente, y A. Fernández., 2001. Hypersensitivity to propolis. Case report. *Alergología e Inmunología Clínica* 16,113-117.
- Castaldo S., y Capasso F., 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73, 1-6.
- Carrillo M.L., Castillo L.N., y Mauricio R., 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Información tecnológica* 22, 5-2011.
- Carson, C., F., Mee, B., J., Riley, T., V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by timekill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1914-1920.
- Cartaya, O., Reynaildo, I., 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales* 22, 5-14.
- Castro, G., M., I., 2002. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia* 27, 128 – 136.
- Céspedes C. T. y Sánchez S. D., 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología* 14 (1), 55-60.

- Chaillou, L., L., Herrera, H., A., Maidana, J., F., 2004. Estudios de propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 24, 11-15.
- Chen J., Long Y., Han M., Wang T., Chen Q., Wang R., 2008. Water-soluble derivate of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90 (3), 441-6.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers de Bruney, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J., 2002. Correlation between chemical compositor and antibacterial activity of essential oils come aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 213-220.
- Clardy, J., Fischbach, M., A., Walsh, C., T., 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology* 24, 1541-1550.
- Copping, L., G., Duke, S., O., 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science* 63, 524-554.
- Cowan, M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology 12, 564-582.
- Cué, B., Morejón, M., G., 1998. Antibacterianos de acción sistemática. Parte I. Antibióticos betalectamámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14, 40-48.
- Cushnie, T., P., T., Lamb, A., J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *The international Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343-356.
- Cupull-Santana, R. D., R. Cortés-Rodríguez, E. E. Olazábal-Manso y C A. Hernández-Medina., 2013. Actividad antifúngica de propóleos obtenidos en tres provincias de Cuba sobre hongo contaminantes en cultivos de tejidos vegetales. *Acta Universitaria* 23 (6), 3-9.
- Delgado A. Ma. de L., Andrade O.J.Á., y Ramírez B.C.A., 2015. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque la Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara 6 (28),74-87.

- Drago S. M., López L. M., Sainz E. T., 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37 (4), 58-68.
- Domingo, D., López-Brea, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16, 385- 393.
- Domínguez. A. X., 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Primera edición. Editorial Limusa. México, 281.
- Duarte S., Rosalen P., Hayacibara M., Cury J., Bowen W., Marquis R., 2006. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Archives of Oral Biology* 51, 15-22.
- El economista., 2015 México podría convertirse en un país exportador de propóleo. Consultado el 6 de febrero de 2017. Disponible en: <http://eleconomista.com.mx/entretenimiento/2015/10/27/mexico-podria-convertirse-pais-exportador-propoleo>
- Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México., 2010. Estado de Michoacán de Ocampo. Consultado el 12 de enero de 2018. Disponible en: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM16michoacan/municipios/16107a.html>
- Espinoza I, Gómez F., 2007. Evaluación de la efectividad del aceite esencial de orégano sobre microorganismos y su aplicación en producto cárnico. Tesis de grado. Instituto Tecnológico de Durango 2-13.
- Fabricant, D., S., Farnsworth, N., R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug Discovery. *Environmental Health Perspective*, 109, 69-75.
- Farré R., Frasset I., Sánchez A., 2004. El propolis y la salud. *ARS. Pharmaceutica* 45 (1), 21-43.
- Gambichler, T., S. Boms, y M. Freitag., 2004. Contact dermatitis and other skin conditions in instrumental musicians. *BMC Dermatology* 4, 3.
- Ghisalberti E. L., 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60, 59–84.

- Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21, 263-277.
- Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Moreno-Torres R., García-Salas P., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., 2007. Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 4, 595-603.
- Grange J. M. y Davey R. W., 1990. Antibacterial properties of propolis. *J. of the Royal Society of Medicine* 83(3), 2-6.
- Gros, G., E., Pomilio, A., Burton, G., 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washignton, 147.
- Gutiérrez, A., D., Ortiz, G., C., Mendoza, C., A., 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro, 1-5.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27,1-93.
- Hasan, T., K. Rantanen, K. Alanko, J. Harvima, R. Jolanki, K. Kalimo, A. Latí, K. Lammintausta, I. Lauerma, A. Laukkanen, T. Luukkaala, R. Riekkí, K.Turjanmaa, E. Varjonen, y A.- M. Vuorela., 2005. Patch test reactions to cosmetic allergens in 1995-1997 and 2000- 2002 in Finland- A multicenter study. *Contact Dermatitis* 53,40-45
- Ingraham J. L. e Ingraham C. A., 1998. Introducción a la Microbiología. Ed. Reverté. España, 751.
- Jara, M.R.P., 2014. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Escuela de Odontología. Perú, 152.
- Jasprica Ivona., Bojic Mirza., Mornar Ana., Besic Erim., Bucan Kajo., Medic-Saric Marica., 2007. Evaluation of antioxidative activity of Croatian

propolis samples using DPPH and ABTS stable free radical assays. *Molecules* 12, 1006-1021.

- Jiang L., Fang, G., Zhang Y., Cao G., Wang S., 2008. Analysis of flavonoids in propolis and *Ginkgo biloba* by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(24), 11571-11577.
- Kalita, P., Barman, T., K., Pal, T., K., Kalita, R., 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3, 33-37.
- Koneman, W., E., 1996. *Diagnóstico Microbiológico* (11ª edición). Médica Panamericana, México, 339.
- Kuegler, K., T. Brinkmeier, P.J. Frosch, y W. Uter., 2005. Anogenitaldermatosen - allergische und irritative Ausloesefaktoren Analyse von Daten des IVDK und Literaturübersicht. *Journal der deutschen dermatologischen Gesellschaft* 3,979-986.
- Lessio M. Riveiro W, Zauli R, Ikegaky M, García M, Floggjo M, Roslen P., 2009. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. *BMC. Complementary and Alternative Medicine* 9, 25.
- Londoño, A., J. Penieres, C. García, L. Carrillo, M. Quintero, S. García, M. Mendoza y T. Cruz., 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha* 21 (1) ,49-55.
- Lotti C., Campo Fernández M., Piccinelli A. L., Cuesta-Rubio O., Márquez Hernández I., Rastrelli L., 2010. Chemical Constituents of red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (4), 2209-2213.
- Lozano-Guzmán, Eduardo., López-Guzmán, Olga Dania., Bocanegra-Salazar, Melissa., Davis-Figueroa, Laura Cristina., de la Cruz Flores, Lidia Beatriz., Cervantes Flores, Maribel., 2013. Interacción sinérgica de propóleo (Propolis) y orégano (*Lippia graveolens* Kunth s.l.) contra

Staphylococcus aureus. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas Distrito Federal, México 44 (4) ,73-78.

- Manrique, A., J., 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. Zootecnia Tropical, 24,1-6.
- Martínez, J. G., C. García P., D. Durango R. y J. Gil G., 2012. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. Revista MVZ Córdoba 17 (1), 2861-2869.
- Meneses, H., 2005. Propolis uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. Arquivos do Instituto Biológico. 72,405-411.
- Mesa A. C., Bueno J. G y Betancur L. A., 2004. Productos naturales con actividad micótica. Revista Española de Quimioterapia. 17 (4), 325-331.
- Moreno, H., Zulma, M., A., P, Figueroa, Judith., 2007. Efecto antimicrobiano *in vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. NOVA 5, 70-75.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylcrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin, Journal Science Technology 26,211-219.
- Muñoz, O., S. Copaja, H. Speisky, R. C. Peña, y G. Montenegro., 2007. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Química Nova 30,848-851.
- Muroi, H., Kubo, A., Kubo, I., 1993. Antimicrobial activity of cashew Apple flavor compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41, 1106-1109.

- Norma Oficial Mexicana, NOM-003-SAG/GAN/-2017, propóleos y especificaciones para su procesamiento. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 6 de octubre de 2017. Diario Oficial. Primera sección, 27-34.
- Sala A., Recio M.C., Schinella G.R., Máñez S., Giner R.M., Cerdá-Nicolás M., Ríos José-Luis., 2003. Assessment of the anti-inflammatory activity and

free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* 461, 53– 61.

- Organización Mundial de la Salud., 2010. Consultado el 8 de febrero de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/es>.
- Okusa, P., N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 112, 476-481.
- Palomino-García, L., R., 2009. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias-Escuela de Química Medellín.
- Pearce G., Moura D. S., Stratmann J., Rayan C. A., 2001. Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature* 411, 817-820.
- Pelczar, Jr. M., J., Chsn, E., C., S., 1984. Elementos de microbiología. Mc Graw-Hill. México, 334-336.
- Pereira A. S., Seixas F., Mathias Silva, Aquino Neto., 2002. Propolis: 100 años de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova* 25,321-326.
- Polunin M. y Robbins C., 1992. *The Natural Pharmacy. An Illustrated Guide to Natural Medicine*. Editorial Dorling Kinderley. Alemania.36-45.
- Praveen, K., R., Awang, B., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* 2, 70-80.
- Quintero-Mora, M., L., Londoño, O., Amparo., Hernández, H., F., Manzano,G., P., López, M., R., Soto, Z., C., I., Carrillo, M.,L., Penieres, C., G., García, T., C., G., Cruz, S., T., A., 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.
- Quintana J., Alonso O., Díaz M., López M., 1997. Empleo de tintura de propóleo al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. *Revista Cubana de Estomatología* 34 (1), 25-27.

- Ramamoorthy, P., K., Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* 2, 70-80.
- Romero F.J., 2010. Nomenclatura Geográfica de Michoacán, Morelia, Mich., *Investigaciones Lingüísticas*, 52.
- Sala A., Recio M., Carmen, Schinella Guillermo R., Máñez S., Giner R. M., Cérda-Nicolás M., Ríos José-Luis., 2003. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *ELSEVIER. European Journal of Pharmacology*. 461, 53-61.
- Salatino A., É. Weinstein Teixeira, G. Negri y D. Message., 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis 2, 33-38. Consultado el 12 de enero de 2018. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2005/759396/abs/>
- Saravana K. J., Mahitosh M., 2009. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2,65-70.
- Saucedo A. T., 2011. Propiedades del propóleo: una alternativa en odontopediatría. *TESINA*. México, 65.
- Scalbert A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
- Singleton, V., L., Orthofer, R., Lamuela, R., R., M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299,152-178.
- Sonmez S., Kirilmaz L., Yucesoy M., Yücel B., Yilmaz B., 2005. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblast. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 371-376.
- Soledad A. J., 2007. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Tesis Doctorado. Universidad de Granada, 123.

- Soto, H., M., 2007. Actividad antioxidante. *Fitotécnica mexicana*. 30, 43-49.
- Stavri, M., Piddock, L., J., V., Gibbons S., 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 1247-1260.
- Tholl D., 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity, and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 297-304
- Tolosa, L., Cañizares, E., 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche, México, 187-204.
- Torres, C., M., 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Colegio oficial de farmacéuticos de Zaragoza. España, 15-36.
- Trusheva B., Popova M., Bankova V., Simova S., Marcucci M., Laguna C., Da Rocha P., Pasin F., Tsvetkova I., 2006. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Advance Access Publication*, 1-6.
- Urzua, A., 2004 Secondary metabolites in the epicuticle of *Haplopappus foliosus* DC. (Asteraceae). *J. Chil. Chem. Soc.* 49, 137-141.
- Vanden Berghe, D. A. & Vlietnick A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Hostettmann, K. (Ed). *Methods in plant Biochemistry* 6, 47-69.
- 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. and Hernández J., 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1747–1756.
- Verpoorte R., 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today* 3 (5), 232-238.

- Wang B. J., Lien Y. H., Yu Z. R., 2004. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. Food Chemistry 86, 237-243.

APÉNDICES.

APÉNDICE 1. Zona de colecta.

El propóleo se obtuvo en greña (propóleo en bruto) por los propios apicultores en noviembre de 2016 y antes de ser procesado se conservó en oscuridad y a temperatura ambiente.

El apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Michoacán se encuentra ubicada en el Cerro la Mole, perteneciente a Tiríndaro, situado en el municipio de Zacapu (figura 26). Se localiza al norte del estado, en las coordenadas 19°49' de latitud norte y 101°47' de longitud oeste, a una altura de 1,990 metros sobre el nivel del mar. Las principales actividades económicas de Zacapu son la agricultura, industria, comercio, ganadería y la artesanía (Romero F.J, 2010).

Su clima es templado con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 1068.9 milímetros y temperaturas que oscilan entre 7 y 24° C. Domina el bosque mixto, con pino, encino y liquidámbar. Su fauna se conforma por zorro, cacomiztle, liebre, gato montés, tlacuache, zorrillo, coyote, comadreja y pato. Como recursos naturales cuenta con una superficie forestal o maderable, que es ocupada por pino y encino, la no maderable, es ocupada por matorrales diversos. (Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, 2010)

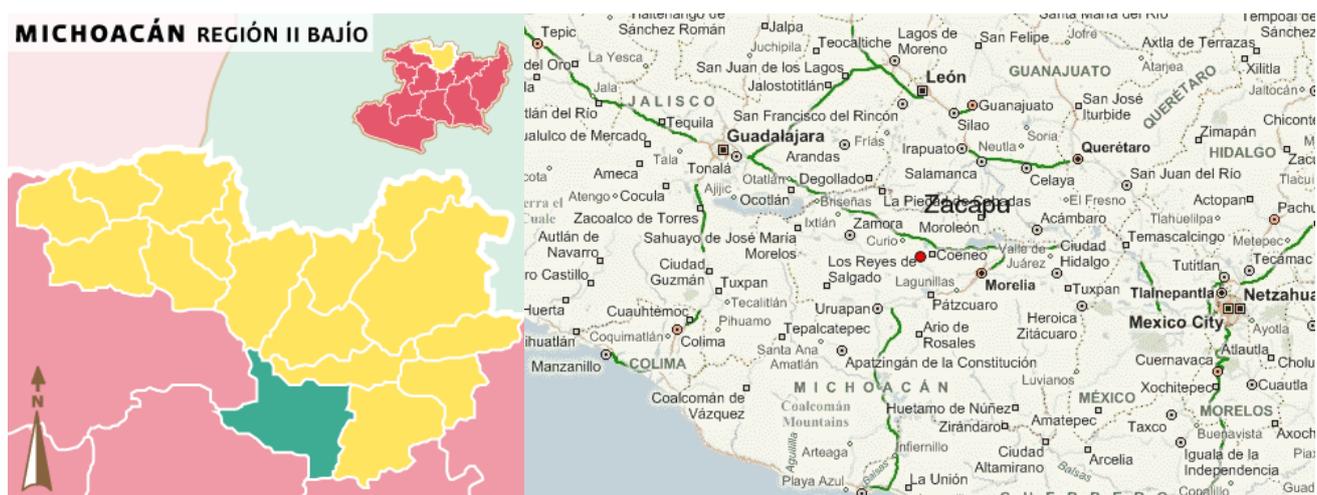


Figura 26. Mapa de la región de Zacapu Michoacán, México.

APÉNDICE 2

Técnica de maceración.

(Domínguez, 1973)

El propóleo en greña se limpió, pesó y se colocó en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se le agregó una cantidad de solvente hexánico necesario en donde el propóleo quedó cubierto por este mismo (98.26 g de muestra en 1.5 L de solvente), el recipiente se tapó con papel aluminio para evitar la evaporación del solvente (figura 27).

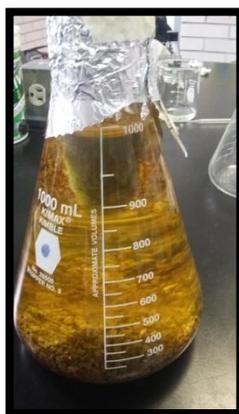


Figura 27. Matraz Erlenmeyer con propóleo y solvente hexano.

El propóleo se dejó reposar con un mínimo de 1 día y máximo de 3 días, teniendo en cuenta que la extracción de los compuestos se verá reflejada en la coloración del líquido, entre más oscuro mayor el rendimiento.

Por último, se realizó una destilación a presión reducida en un rotavapor, para obtener el extracto libre del solvente (figura 28).

Esta misma técnica se repitió para los tres extractos (hexánico, clorofórmico y metánolico).



Figura 28. Destilación de los extractos por medio de un rotavapor.

APÉNDICE 3

Método de difusión en agar de Kirby-Baüer

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)

Método para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los tres extractos (hexánico, clorofórmico y metanólico).

•**Medio:** Para los ensayos con las cepas bacterianas se utilizó agar y caldo Müller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

•**Aplicación de sustancias:** Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril, deben colocarse por lo menos a 22 mm uno del otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

•**Preparación de las muestras:** en todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 16 mg para bacterias de los extractos disueltos en 10 μ L del solvente correspondiente a cada extracto. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.

•**Control positivo:** Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos con 5 μ L de cloranfenicol (25 μ g).

•**Control negativo:** Sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L del solvente empleado para disolver el extracto a evaluar.

•**Incubación:** Las bacterias son cultivadas en una caja de Petri con 20 mL de agar, se colocan en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35°C, sin mayor tensión de CO₂.

•**Interpretación de resultados:** En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportarán los valores promedio, asociándoles su desviación estándar.

APÉNDICE 4

Microtécnica de dilución en caldo.

(Koneman, 1996)

La microtécnica de dilución en caldo se utiliza para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM).

Medio: La susceptibilidad de los microorganismos antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica con 96 pozos (placa de cultivo con fondo en “u”). La placa se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas (1,2,4,8,10,15,20 mg/mL).

•**Inóculo:** Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) (bacterias), posteriormente se incuba a 35°C durante 24 horas (produciendo en el caso de las bacterias una concentración de aproximadamente 1×10^8 UFC/MI y se diluyen en caldo Müller-Hinton, para obtener una concentración aproximada de 1×10^5 UFC/mL. En cada una de los 96 pozos se colocaron 50 µL de las suspensiones diluidas

•**Control negativo:** Como control negativo se coloca 50 µL de caldo Müller-Hinton (bacterias) con los microlitros del solvente empleado para disolver el extracto

•**Testigo:** El testigo se preparará colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton en los pozos más 50 µL del cultivo bacteriano.

•**Incubación:** Una vez cargadas las placas con la suspensión microbiana, se cubren con una tapa para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas.

•**Interpretación de resultados:** Después del tiempo de incubación se añade a cada pozo 50 µL de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC). La placa se incuba 30 min.

En los pozos donde se desarrollan organismos, el colorante es reducido a color rojo visible, produciendo un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanecerá clara. La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM). En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado.

APÉNDICE 5

Actividad del extracto metanólico, hexánico y clorofórmico sobre la curva de crecimiento bacteriano.

(Muroi *et al.*, 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la inactivación.

•**Medio:** Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. El medio se coloca en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm.

•**Inóculo:** Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 UFC/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación).

Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1 mL de la suspensión bacteriana en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 UFC/mL en cada tubo. Se incubará en una estufa a 35°C sin presión de CO₂.

•**Aplicación de sustancias:** Se prepara en tubos con 10 mL de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de CMI, ½ CMI y CBM. Se muestreó cada hora durante los primeros 4 tiempos: T0-0, T1-1, T2-2, T3-3, T4-4 (tiempo-horas transcurridas), después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 hrs y finalmente a las 24 hrs. En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo.

- **Testigo:** Se prepara un tubo sin extracto como testigo.
- **Incubación:** Las cajas se incuban durante 24 hrs a 35°C.
- **Interpretación de resultados:** Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

APÉNDICE 6

Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

(Okusa *et al.*, 2007)

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) es un radical libre, con un electrón desapareado que le da una coloración violeta y que no se dimeriza. Cuando el DPPH está en contacto con una sustancia que le puede donar un átomo de hidrógeno, éste se reduce produciendo un cambio de color de violeta a amarillo, coloración dada por el grupo picril (Molyneux, 2004).

Con base a lo anterior, la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) se evalúa midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de DPPH, por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm). A partir de la medición obtenida por medio de espectrometría UV-VIS, se determina la concentración a la cual el radical es reducido al 50 %.

Solución DPPH

Se prepara en un matraz aforado pesando 0.00197 (0.002 gr) y agregando 50 mL de MeOH grado HPLC.

Las concentraciones a evaluar son las siguientes: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, y 1000 ppm, las cuales se preparan siguiendo la tabla, en frascos de 1 mL.

Para la concentración de 1, 2, 3 y 4 ppm hacer:

Del stock (5 mg en 5 mL MeOH) tomar 20 µL que llevarán 0.02 mg = 20 µg y agregar 180 µL de MeOH, el volumen final serán 200 µL. De este nuevo stock tomar:

[] ppm	µL stock	µL MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960

Del stock (5 mg en 5 mL de MeOH) tomar:

[] ppm	μL stock	μL MeOH
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	998
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750
300	300	700
400	400	600
500	500	500
600	600	400
700	700	300
800	800	200
900	900	100
1000	1000	0

Aplicación de sustancias

En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-1000 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protege de la luz envolviéndola con papel aluminio y se incuba durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. Es importante señalar que se emplean este tipo de placas debido a que el material no reacciona con los solventes empleados.

Blanco

Se llenan pozos con 200 µL de metanol grado HPLC.

Control positivo

Se realiza una curva patrón de quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de resultados

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente formula:

$$\% \text{ Reducción del DPPH} = (C - E / C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPH (150 µL) + Solución problema (50 µL)).

APÉNDICE 7

Determinación de la concentración de Fenoles Totales (CFT)

(Método modificado de Singleton *et al.*, 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica de óxido-reducción, donde es empleado el reactivo de Folin-Ciocalteu que actúa como agente oxidante. El reactivo de coloración amarilla y pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que tienen la capacidad de reaccionar 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 las moléculas (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que es una pequeña molécula que, debido a su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo $-OH$ (Aguilar *et al.*, 2003).

Curva de calibración

Se utiliza una solución estándar ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05 y 1 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL, cuadro 18.

Preparación del extracto

Se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), de la cual se tomó una alícuota de 250 μL y se agregan 750 μL de agua destilada, para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Cuadro 15. Curva patrón para la determinación de fenoles totales

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón (ácido gálico μL)	Agua destilada (μL)	Agua destilada (mL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na_2CO_3 (mL)
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25(31)	968	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937	7	500	1.5
3	0.025	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
problema	-----	250	750	7	500	1.5

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 7 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500 μL de reactivo Folin-Ciocalteu.

Después de cinco minutos se añadirá 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L).

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determina por triplicado.

Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar.

Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

APÉNDICE 8

Cuantificación de flavonoides totales.

Método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)

Este método se basa en el cambio de la coloración de una solución de AlCl_3 (incolora) a amarilla por la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4 y, o bien el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, así como por la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides (Kalita *et al.*, 2013)

Stock de quercetina

Se pesan 3 mg de quercetina en 3 mL de MeOH grado HPLC.

Curva patrón

Se toman alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm y se les agrega 1 mL de AlCl_3 al 2 %.

Para la concentración de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm hacer:

Del stock de quercetina tomar 20 μL que llevarán 0.02 mg = 20 μg y agregar 180 μL de MeOH, el volumen final serán 200 μL . de este nuevo stock tomar:

[] ppm	μL Stock Quercetina	μL MeOH	(AlCl_3) al 2 %
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

Del stock de quercetina (3 mg en 3 mL de MeOH) tomar:

[] ppm	μL Stock Quercetina	μL MeOH	(AlCl_3) al 2 %
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1

9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

Stock de extracto

Se pesa 0.02 g de extracto metanólico, se disuelve en 3 mL de MeOH grado HPLC.

Blanco

Se toma 1 mL del stock del extracto y 1 mL de MeOH grado HPLC.

Problema

Se toma 1 mL del stock del extracto y se le agrega 1 mL de AlCl₃ al 2 %.

Se vacían 200 µL de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA, por triplicado.

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 450 nm.

Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola el promedio de la absorbancia de la muestra a evaluar.

APÉNDICE 9

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

En cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Cromatógrafo de Gases Modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C, Marca Agilent Technologies.

Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película.

Condiciones de corrida para las fracciones (Método hexánico):

- Temperatura del inyector: 250 °C
- Modo de inyección: Split
- Radio: 33.5:1
- Purga de flujo del Split: 29.9 mL/min
- Flujo de corrida: 35 cm/seg

Horno:

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta 290 °C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 21.67 minutos
- Línea de transferencia: 290°C

Detector del espectrómetro de Masas:

- Método de adquisición de datos. Full Scan
- Rango de masas: 35-600 m/z
- Temperatura de cuádrupolo: 150°C
- Temperatura de la fuente de ionización: 230°C
- Impacto electrónico: energía de 70 eV

APÉNDICE 10

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC- DAD).

Este método es ampliamente usado para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes de productos naturales (Gurib-Fakim, 2006). Es un tipo de cromatografía en columna, se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Los elementos que participan en la interacción en un HPLC son: fase móvil, fase estacionaria y la muestra.

En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presenta pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasa mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluído de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

Análisis de la composición química del extracto metanólico del propóleo de Michoacán, México, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Se usó HPLC para caracterizar químicamente 30 µL/ de los extractos de propóleo. El extracto se inyectó a una concentración de 3 mg/mL en un HPLC modelo 1100 (HEWLETT-Packard, Wilmington DE, USA). Equipada con un detector de red de diodos (DAD) 1100 ChemStation A0903 operando bajo los siguientes parámetros:

- Separación isocrático usando una fase móvil: metanol-acetonitril-agua (25:25:50% acidificado) durante 60 minutos.
- Columna Discovery C-18 (250x4,6 mm) a 269 bar de presión y un rango de temperatura de 22 °C – 23 °C
- Velocidad de flujo: 1mL/min
- Matriz de detectores de diodos con ajuste del detector a 260 nm
- Escaneo completo de 200-400 nm
- Los constituyentes se identificaron en base a una comparación del tiempo de retención y el espectro UV con los de los estándares.

APÉNDICE 11.

Análisis estadístico.

Descriptive Statistics: Halo

Variable	Extracto	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Halo	Cloranfenicol	70	0	19.807	3.985	11.000	16.000	21.000	23.000	25.000
	Clorofórmico	70	0	5.941	2.495	0.000	6.000	7.000	7.000	8.000
	Hexánico	70	0	6.9000	0.5934	6.0000	7.0000	7.0000	7.0000	9.0000
	Metanólico	70	0	15.079	3.155	9.000	12.000	16.000	18.000	20.000

Descriptive Statistics: Halo

Variable	Cepa bacteriana	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Halo	A. viscosus	20	0	13.20	6.95	6.00	7.00	10.00	20.75	23.00
	E. aerogenes	40	0	12.13	7.17	0.00	7.00	10.00	17.00	25.00
	E. coli	20	0	11.95	7.10	0.00	7.00	9.00	20.75	23.00
	E. faecalis	20	0	10.75	5.25	7.00	7.00	8.00	16.75	20.00
	P. aeruginosa	20	0	10.80	5.96	0.00	7.00	10.50	16.75	18.00
	P. agglomerans	20	0	11.20	5.94	6.00	7.00	8.50	18.50	21.00
	P. miriabilis	20	0	12.00	5.23	0.00	8.00	11.50	17.00	19.00
	S. aureus	20	0	12.30	7.45	0.00	7.00	9.50	20.75	25.00
	S. epidermitis	20	0	10.20	5.42	0.00	6.00	9.00	16.25	19.00
	S. flexneri	20	0	13.50	7.33	7.00	7.00	9.50	22.00	24.00
	S. mutans	20	0	11.64	6.14	5.05	5.96	10.55	18.55	19.70
	S. typhi	20	0	13.05	6.48	7.00	7.00	11.50	20.25	22.00
	S. typhimurum	20	0	12.20	6.87	0.00	7.00	10.00	20.25	22.00

Boxplot of Halo

Descriptive Statistics: Halo

Results for Extracto = Cloranfenicol

Variable	Cepa bacteriana	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Halo	A. viscosus	5	0	21.600	0.894	21.000	21.000	21.000	22.500	23.000
	E. aerogenes	10	0	19.50	5.42	13.00	14.75	19.50	25.00	25.00
	E. coli	5	0	22.600	0.548	22.000	22.000	23.000	23.000	23.000
	E. faecalis	5	0	19.400	0.548	19.000	19.000	19.000	20.000	20.000
	P. aeruginosa	5	0	15.000	0.707	14.000	14.500	15.000	15.500	16.000
	P. agglomerans	5	0	21.000	0.000000	21.000	21.000	21.000	21.000	21.000
	P. miriabilis	5	0	16.800	1.304	16.000	16.000	16.000	18.000	19.000
	S. aureus	5	0	23.800	0.837	23.000	23.000	24.000	24.500	25.000
	S. epidermitis	5	0	11.000	0.000000	11.000	11.000	11.000	11.000	11.000
	S. flexneri	5	0	23.800	0.447	23.000	23.500	24.000	24.000	24.000
	S. mutans	5	0	19.700	0.000000	19.700	19.700	19.700	19.700	19.700
	S. typhi	5	0	21.600	0.548	21.000	21.000	22.000	22.000	22.000
	S. typhimurum	5	0	22.000	0.000000	22.000	22.000	22.000	22.000	22.000

Results for Extracto = Clorofórmico

Variable	Cepa bacteriana	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Halo	A. viscosus	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	E. aerogenes	10	0	4.80	3.33	0.00	0.00	7.00	7.00	7.00
	E. coli	5	0	5.60	3.13	0.00	3.50	7.00	7.00	7.00
	E. faecalis	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	P. aeruginosa	5	0	4.00	3.67	0.00	0.00	6.00	7.00	7.00
	P. agglomerans	5	0	7.200	0.447	7.000	7.000	7.000	7.500	8.000
	P. miriabilis	5	0	6.20	3.49	0.00	3.50	8.00	8.00	8.00
	S. aureus	5	0	6.00	3.39	0.00	3.50	7.00	8.00	8.00
	S. epidermitis	5	0	5.20	2.95	0.00	3.00	6.00	7.00	7.00
	S. flexneri	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	S. mutans	5	0	5.770	0.402	5.050	5.500	5.950	5.950	5.950
	S. typhi	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	S. typhimurum	5	0	5.60	3.13	0.00	3.50	7.00	7.00	7.00

Results for Extracto = Hexánico

Variable	Cepa bacteriana	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Halo	A. viscosus	5	0	6.400	0.548	6.000	6.000	6.000	7.000	7.000
	E. aerogenes	10	0	6.900	0.316	6.000	7.000	7.000	7.000	7.000
	E. coli	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	E. faecalis	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	P. aeruginosa	5	0	6.800	0.447	6.000	6.500	7.000	7.000	7.000
	P. agglomerans	5	0	6.800	0.447	6.000	6.500	7.000	7.000	7.000
	P. miriabilis	5	0	8.400	0.548	8.000	8.000	8.000	9.000	9.000
	S. aureus	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	S. epidermitis	5	0	6.400	0.548	6.000	6.000	6.000	7.000	7.000
	S. flexneri	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	S. mutans	5	0	6.0000	0.000000	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	S. typhi	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	S. typhimurum	5	0	7.0000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000

Results for Extracto = Metanólico

Variable	Cepa bacteriana	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
Halo	A. viscosus	5	0	17.80	2.77	13.00	15.50	19.00	19.50	20.00
	E. aerogenes	10	0	17.300	1.494	15.000	16.000	17.000	18.250	20.000
	E. coli	5	0	12.60	2.51	11.00	11.00	12.00	14.50	17.00
	E. faecalis	5	0	9.600	0.548	9.000	9.000	10.000	10.000	10.000
	P. aeruginosa	5	0	17.400	0.548	17.000	17.000	17.000	18.000	18.000
	P. agglomerans	5	0	9.800	0.837	9.000	9.000	10.000	10.500	11.000
	P. miriabilis	5	0	16.600	1.517	14.000	15.500	17.000	17.500	18.000
	S. aureus	5	0	12.400	1.140	11.000	11.500	12.000	13.500	14.000
	S. epidermitis	5	0	18.200	0.447	18.000	18.000	18.000	18.500	19.000
	S. flexneri	5	0	16.20	2.77	12.00	13.50	17.00	18.50	19.00
	S. mutans	5	0	15.100	0.000000	15.100	15.100	15.100	15.100	15.100
	S. typhi	5	0	16.600	0.894	16.000	16.000	16.000	17.500	18.000
	S. typhimurum	5	0	14.200	1.095	13.000	13.000	15.000	15.000	15.000