



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ARMANDO SOLIS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
SECRETARIO: Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2º SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 111, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Fausto Rivero Cruz _____

SUSTENTANTE:

Armando Solis Vázquez _____

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química por brindarme el conocimiento y las herramientas necesarias para mi formación académica y profesional, que permitieron la culminación de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos económicos otorgados al proyecto de Ciencia Básica CB 252006 y al PAIP 5000 9138

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su valioso apoyo y dedicación en la realización y revisión del presente trabajo de tesis.

A los miembros del jurado por la revisión y corrección del manuscrito.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los distintos espectros solicitados en este trabajo de tesis.

ÍNDICE:

LISTA DE FIGURAS.	V
LISTA DE CUADROS.	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN:	1
2. ANTECEDENTES:	3
2.1. Productos naturales.	3
2.1.1. Aspectos históricos.	3
2.2. Propóleo.	6
2.2.1. Aspectos históricos.	7
2.2.2. Principales fuentes vegetales.	8
2.2.3. Proceso de producción de propóleo y probables usos en colmenas.	9
2.2.4. Proceso de recolección y tratamiento de propóleo.....	10
2.3. Panorama o situación de la apicultura en México.	11
2.3.1. Producción de propóleo en México.	13
2.3.2. Regionalización de la producción apícola en México.	14
2.4. Composición química del propóleo.	16
2.4.1. Flavonoides.	17
2.4.2. Principales compuestos aislados de propóleos de diferentes ubicaciones geográficas.....	18
2.5. Usos del propóleo en la industria.	30
2.6. Generalidades en los métodos de extracción del propóleo.	31
2.7. Métodos cromatográficos de separación para lograr el aislamiento de compuestos del EEP y su determinación.	32
2.8. Actividades biológicas del propóleo.	33

2.8.1. Actividad antimicrobiana del propóleo.....	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	42
5.1 Recolección del propóleo.....	42
5.2. Procedimientos generales de análisis.....	42
5.2.1. Análisis cromatográficos.....	42
5.3. Estudio químico.....	43
5.3.1. Preparación del extracto etanólico.....	43
5.3.2. Fraccionamiento primario del EEP.....	43
5.4. Determinación de la actividad antibacteriana del EEP mediante la inhibición en el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.....	44
5.4.1. Microorganismos de prueba.....	44
5.4.2. Determinación de CMI.....	44
5.5. Fraccionamiento secundario a partir de la FX-III primaria.....	46
5.6. Fraccionamientos terciarios.....	47
5.6.1. Fraccionamiento terciario a partir de la fracción F-VI secundaria.....	47
5.6.2. Fraccionamiento terciario a partir de la fracción F-VII secundaria.....	48
5.6.3. Fraccionamiento terciario a partir de la fracción F-VIII secundaria.....	48
5.7. Procedimiento Experimental.....	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
6.1. Elección del propóleo.....	51
6.2. Actividad inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano.....	52
6.3. Caracterización estructural de metabolitos aislados.....	55
6.3.1 Figuras de los espectros RMN- ¹ H de los compuestos aislados.....	58

6.4. Propiedades biológicas de los compuestos aislados.....	61
6.4.1. Propiedades biológicas de la acacetina.	61
6.4.2. Propiedades biológicas del kaempferol.....	61
6.4.3. Propiedades biológicas de la apigenina.....	62
7. CONCLUSIONES.	64
8. PERSPECTIVAS.....	65
9. REFERENCIAS.....	66
10. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.	79

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Muestra de Propóleo.

Figura 2. Proceso de raspado en la recolección de propóleo.

Figura 3. Producción de toneladas de polen y propóleo durante el periodo 2000 – 2008.

Figura 4. Regiones apícolas en la República Mexicana.

Figura 5. Distribución de los tipos de propóleo clasificados de acuerdo a la distribución geográfica de las especies vegetales (Salatino, 2011).

Figura 6. Compuestos aislados del propóleo de la Comarca Lagunera (Gómez Palacio), Durango.

Figura 7. Espectro de RMN-¹H del compuesto acacetina (a).

Figura 8. Espectro de RMN-¹H del compuesto kaempferol (b).

Figura 9. Espectro de RMN-¹H del compuesto apigenina (c).

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Características de los tipos de propóleo de acuerdo a la distribución geográfica de las especies vegetales (Salatino, 2011).

Cuadro 2. Principales compuestos aislados de muestras de propóleo de diferentes países.

Cuadro 3. Principales compuestos aislados previamente de diversos propóleos mexicanos.

Cuadro 4. Fraccionamiento primario del EEP de Durango.

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario realizado a partir de la FX-III derivada del EEP.

Cuadro 6. Fraccionamiento terciario realizado a partir de la F-VIII secundaria derivada del EEP.

Cuadro 7. Fraccionamiento Cuaternario realizado a partir de la F-B derivada del EEP.

Cuadro 8. Resultados de CMI (mg/mL) del ensayo del fraccionamiento primario del EEP.

Cuadro 9. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H de los compuestos aislados, acacetina (**a**), kaempferol (**b**) y apigenina (**c**).

LISTA DE ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
ANOVA	Análisis de Varianza
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro Corazón)
C(+)	Control positivo
C(-)	Control negativo
°C	Grados centígrados
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CHX	Digluconato de clorhexidina
DE	Desviación Estándar
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
EtOH	Etanol
FX	Fracción
GTF	Glucosiltransferasa
h	Hora
H ⁺	Protón
H ₂ O	Agua

HTS	High-Throughput Screening
λ	Longitud de onda
mg	Miligramos
min	Minuto
μL	Microlitro
μmol	Micromol
mL	Mililitro
M	Masa
nm	Nanómetros
O_2	Oxígeno molecular
O_2^-	Radical superóxido
OH^-	Radical hidroxilo, Ión hidroxilo
-OH	Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Segundo
T	Tiempo

1. INTRODUCCIÓN:

Los productos naturales han sido una de las fuentes más importantes para el descubrimiento de nuevos compuestos y farmacóforos prototipos para el desarrollo de medicamentos en el área de la química farmacéutica. Su importancia es tal que durante el periodo de 1981 a 2010 el 40% de los agentes terapéuticos aprobados por la FDA fueron productos naturales, sus derivados o bien productos sintéticos miméticos relacionados con estos (Chen *et al.*, 2015)

El propóleo ha sido uno de los productos naturales más ampliamente estudiados y, sin embargo, a la fecha es posible encontrar publicaciones que gracias a estudios químicos de composición reportan nuevas variedades de propóleo que presentan novedosas actividades biológicas para su potencial aplicación en la industria farmacéutica. Estudios han demostrado que el propóleo presenta una amplia variedad de actividades biológicas, citando como ejemplo su actividad antibacteriana (Kujumgiev *et al.*, 1999; Kartal *et al.*, 2003), antidiabética (Sforcin, Bankova, 2011), antiviral (Amoros *et al.*, 1994; Kujumgiev *et al.*, 1999), antioxidante (Isla *et al.*, 2001; Kumazawa *et al.*, 2004), antifúngica (Kujumgiev *et al.*, 1999; Murad *et al.*, 2002), antiinflamatoria (Wang *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 2005) y anticancerígena (Kimoto *et al.*, 2001; Sforcin *et al.*, 2007; Wu, *et al.*, 2009); estas propiedades son atribuidas a su composición química, la cual es altamente variable dependiendo de diversos factores (Bankova *et al.*, 2000), principalmente por la ubicación geográfica y, consecuentemente, por la vegetación característica de la zona de recolección (Salatino *et al.*, 2011).

La composición química del propóleo es muy compleja y variable, pudiendo estar constituido por al menos 300 compuestos (Falcão *et al.*, 2010) encontrándose entre los más importantes los polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres), esteroides, terpenoides, y aminoácidos; siendo los constituyentes mayoritarios las flavonas, flavonoles y flavanonas (Sharaf *et al.*, 2013).

Entre estos compuestos mencionados destacan la familia de los flavonoides, los encontrados en un extracto etanólico mayoritariamente son la pinocembrina, galangina, crisina, quercetina, kaempferol y naringenina (Sharaf *et al.*, 2013) y, por lo general, a estos principios se les atribuye las diferentes actividades biológicas que presentan.

En la actualidad, los extractos etanólicos de propóleo (EEP) se utilizan en la fabricación de una diversa gama de productos tales como cápsulas antioxidantes, aerosoles para la garganta, como ingredientes en cosméticos, pasta de dientes y en agentes antibacterianos, antivirales, antioxidantes, anticancerígenos y anti-inflamatorios e inclusive se ha encontrado un uso potencial del extracto acuoso como conservador para productos alimenticios debido a su actividad antibacteriana (Ferreira *et al.*, 2014; Tosi *et al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES:

2.1. Productos naturales.

Un producto natural es una molécula o compuesto producido por una fuente biológica; si el producto natural es aislado directamente del organismo, sintetizado en laboratorio, biosintetizado *in vitro*, o bien aislado de un organismo modificado puede ser considerado “natural” si el producto resultante es químicamente equivalente al producto natural original. La investigación de los productos naturales se enfoca en las propiedades químicas, biosíntesis y funciones biológicas de los metabolitos secundarios, que frecuentemente son únicos de un organismo en particular o bien es una expresión de individualidad de una especie y, generalmente, no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de un organismo, y son producidos como resultado de adaptación al ambiente que le rodea o bien como mecanismo de defensa (Dias *et al.*, 2012; Nature Chemical Biology, 2007).

Los efectos biológicos de un extracto varían cuantitativamente con la cantidad relativa de sus constituyentes, lo que indica una relación cuantitativa de la composición y su actividad. Este concepto ha sido demostrado en la medicina Tradicional China (Cheng *et al.*, 2006). La composición de los productos naturales presenta variaciones que dependen de diversos factores (Harvey, 2008).

2.1.1. Aspectos históricos.

La naturaleza ha sido una fuente de productos medicinales durante miles de años, encontrándose los primeros registros alrededor de 2600 A.C. documentando el uso de aproximadamente 1000 sustancias derivadas de plantas en Mesopotamia (Cragg *et al.*, 2013).

Sin embargo, el registro más representativo y conocido es el “Papiro Ebers”, que data de aproximadamente 1500 A.C. en el cuál se documentan alrededor de 700 fármacos, la mayoría de origen vegetal (Cragg *et al.*, 2013).

Asimismo, los registros encontrados de China desde alrededor de 1100 A.C. y de India de 1000 A.C. demuestran el enorme interés en el conocimiento de los fármacos, así como de los remedios usados en esa época; además los Griegos y Romanos contribuyeron al desarrollo racional del uso de fármacos provenientes de plantas (Cragg *et al.*, 2013).

Las diferentes formas de uso de los productos naturales como remedios en la medicina tradicional a través de la historia abarcan desde el uso de plantas completas, secas, ciertas partes vegetales y animales, tinturas, infusiones, aceites, etc. Entre estos inclusive algunos de sus compuestos bioactivos permanecen sin identificar (Dias *et al.*, 2012).

A finales de la década de 1980 y principios de 1990, el desarrollo del High-Throughput Screening (HTS) permitió acelerar el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos al proporcionar una vasta cantidad de nuevos compuestos en un reducido periodo de tiempo. La introducción de la química combinatoria causó una disminución importante en el interés e inversión para los programas de investigación de productos naturales, que habían sido la fuente más importante para el descubrimiento de compuestos biológicamente activos generando alrededor del 80% de las sustancias con interés farmacéutico las cuales eran productos naturales o bien derivados de un compuesto natural al proporcionar compuestos líderes para el tratamiento de cáncer, infecciones microbianas, hipercolesteremia y rechazo de trasplantes de órganos (Dias *et al.*, 2012).

Esta pérdida de interés e inclusive abandono de los programas de descubrimiento en los productos naturales se debió principalmente a la tasa alta inicial de moléculas potenciales sintetizadas, la disponibilidad inmediata de una amplia variedad de bibliotecas de compuestos de origen sintético, la incompatibilidad en la implementación de este tipo de sistema para productos de origen natural, la

reducción de tiempo y costos necesarios para el proceso de descubrimiento (Sneader *et al.*, 1996).

Sin embargo, a finales de 1990 se observó que las librerías de los compuestos sintetizados por HTS carecían de la complejidad característica de aquellos sintetizados naturalmente (Dias *et al.*, 2012). Además el tiempo ha demostrado una disminución de nuevas entidades químicas descubiertas con interés farmacéutico (Cragg *et al.*, 2013). Esta tendencia junto con los avances científicos y tecnológicos citando como ejemplos el beneficio de aplicar la química combinatoria a la búsqueda de compuestos en productos naturales, avances en el campo de genética y biosíntesis de productos naturales que permiten tener un mayor entendimiento y control sobre la manipulación y optimización de diversos métodos con el fin de lograr un mayor rendimiento en la producción de ciertos compuestos provenientes de fuentes naturales, además del uso de herramientas como son las librerías estructurales de productos naturales y el mejoramiento en la sensibilidad de la instrumentación así como en las técnicas de RMN (Lam, 2007) que permiten resolver estructuras complejas con una masa menor a 1 mg de compuesto (Harvey, 2008) para una identificación accesible y rápida de los compuestos bioactivos han presentado una nueva oportunidad para retomar el interés en la investigación de los productos naturales.

Datos mas recientes indican que durante el periodo de 1981 a 2010 el 40% de los agentes terapéuticos aprobados por la FDA eran productos naturales, sus derivados o bien miméticos sintéticos relacionados con estos (Chen *et al.*, 2015). Las numerosas aportaciones y ventajas que ofrecen los productos naturales no deben ser desaprovechadas ni pasar desapercibidas, especialmente aquellos derivados de plantas, que suelen ser la base de sistemas sofisticados de medicina tradicional.

2.2. Propóleo.

La palabra propóleo significa “protección de la colmena” al derivarse de los vocablos griegos “pro” (en frente de, defensa de) y “polis” (ciudad o en este caso colmena) (Wagh, 2013; Burdock, 1998). El propóleo es el resultado de la adición de las secreciones enzimáticas de las glándulas mandibulares de las abejas, a las resinas recolectadas de diferentes fuentes vegetales (Gómez *et al.*, 2006).

Es una sustancia resinosa parecida a la cera, presenta una diversa gama de colores que van de verde a café y rojizo dependiendo de su fuente vegetal (Burdock, 1998), generalmente posee un sabor acre aunque a veces es amargo y tiene un aroma semejante al de la miel debido a los aceites aromáticos presentes en el mismo (Farré *et al.*, 2004), a elevadas temperaturas es un material flexible, suave y pegajoso, el propóleo generalmente presenta un punto de fusión de alrededor de 60° a 70° llegando incluso a 100°C para algunas muestras (Krell, 1996).



Figura. 1. Muestra de Propóleo.

2.2.1. Aspectos históricos.

Se conoce al propóleo desde hace siglos. Los antiguos griegos (que contaban con un sistema bien estructurado de apicultura), romanos, persas y egipcios eran conscientes de sus propiedades curativas y describieron los usos prácticos y médicos descubiertos en su época que lo convirtieron en una “medicina” muy usada. Se menciona en el Antiguo Testamento, donde se reconocen sus propiedades terapéuticas. Los usos del propóleo no sólo estaban limitados a la medicina, existen registros de su uso como ingrediente para el embalsamamiento de cadáveres en Egipto, incienso en Jerusalén y perfume en Grecia. Su importancia y uso en la medicina convencional decayó durante la edad media; sin embargo, el conocimiento de sus propiedades medicinales prevalecieron en la medicina tradicional popular. Posteriormente, fue en Europa, durante el periodo del Renacimiento, donde creció nuevamente el interés en la enseñanza y medicina antigua, lo que permitió el redescubrimiento de tratamientos y remedios en desuso; algunas menciones del propóleo se encuentran en obras como “La Historia de las Plantas” de John Gerard, “Herbario Completo” de Nicholas Culpeper, es incluido en las farmacopeas inglesas del siglo XVII y aparece en “El Herbario Universal” en el año de 1824, durante el siglo XIX se llevaron a cabo numerosos estudios del propóleo. Sin embargo, después de la segunda guerra mundial (siglo XX), los avances científicos y tecnológicos revolucionaron los métodos analíticos cromatográficos, que permitieron la separación y extracción de varios componentes del propóleo (Kuropatnicki *et al.*, 2013), construyendo las bases de la investigación de la composición química del propóleo, donde a la fecha se han registrado más de 300 sustancias en una muestra de propóleo (Bankova *et al.*, 2000) y por lo menos 180 compuestos diferentes entre las distintas variedades de propóleo han sido identificados (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

2.2.2. Principales fuentes vegetales.

Las principales fuentes vegetales para el propóleo son las especies de árboles citadas a continuación: álamo (*Populus*), género nativo de regiones templadas del hemisferio norte; sauce (*Salix*), encontrado en regiones templadas y frías del hemisferio norte; olmo (*Ulmus*), extendido en la mayor parte del hemisferio norte; de la familia *Betulaceae* el abedul (*Betula*) ampliamente extendido a lo largo del hemisferio norte particularmente en climas templados y boreales, y el aliso (*Alnus*) distribuido en regiones templadas del norte, con algunas especies en Centroamérica, y en los Andes; haya (*Fagus*), en zonas templadas de Europa, Asia y Norteamérica; y coníferas (División: *Pinophyta*), característicos de los bosques boreales a lo largo del hemisferio norte y climas fríos en zonas montañosas en el sur (Ghisalberti, 1979; Gardana *et al.*, 2007).

En Europa, Asia occidental, Norteamérica y algunas regiones de Sudamérica, el material vegetal predominante recolectado para la elaboración del propóleo es el exudado de los brotes del género *Populus* (álamo).

El propóleo derivado del álamo (anteriormente llamado poplar) es el que ha generado un mayor interés en el ámbito científico, ya que se han identificado varios cientos de sustancias. Como ejemplo, generalmente la composición de esta variedad de propóleo contiene un 40-60% de resinas, las cuales presentan diferentes sustancias de interés como son fenoles, ácidos fenólicos, ésteres, flavanonas, dihidroflavanonas, flavonas, flavonoles, chalconas y glicéridos fenólicos (Bogdanov, 2007).

Es necesario hacer énfasis en la numerosa cantidad de estudios y el interés que ha generado el propóleo proveniente de Brasil. En Brasil, se conocen alrededor de 12 tipos de propóleo clasificados según sus propiedades fisicoquímicas, estos presentan una amplia diversidad en su composición química, debido a la vasta biodiversidad existente en el país; es por ello que resulta de gran interés para la búsqueda de sustancias bioactivas. La mayoría de los estudios parecen enfocarse en dos tipos de propóleo brasileño, el propóleo rojo que contiene una alta

proporción de isoflavonoides, que son compuestos comúnmente encontrados en la familia de las leguminosas (Silva *et al.*, 2007) y el propóleo verde que contiene varios compuestos fenólicos, entre los más estudiados se encuentra la artepilina-C o ácido 3,5- diprenil-4-hidroxicinámico presente en regiones donde las especies vegetales de *Baccharis* son abundantes. La cuantificación de artepilina-C en esta variedad de propóleo ha sido usada como un indicador de la calidad del producto (Hitomi *et al.*, 2008), además de mostrar actividad antiinflamatoria (Niraldo, 2008).

Sin lugar a duda, el rastreo del origen botánico de las diferentes variedades de propóleo es un enfoque que resulta de vital importancia, ya que proporciona información sobre la alta probabilidad de encontrar los mismos compuestos característicos o una composición química similar en muestras de propóleo de distintas regiones que presenten similitudes en la vegetación que las compone (Silva *et al.*, 2007).

2.2.3. Proceso de producción de propóleo y probables usos en colmenas.

La actividad apícola mantiene una estrecha dependencia con las condiciones climáticas, esto tradicionalmente genera incertidumbre entre los productores. No obstante, con el cambio climático derivado del calentamiento global, los riesgos y temores se incrementan, obligando al sector a la adopción de acciones que contrarresten los efectos negativos derivados, tanto en la planta productiva como en la vegetación de características apibotánicas de las regiones productoras más importantes. La principal afectación y consecuencia de dichas contingencias es la inestabilidad en las épocas de floración, pudiéndose encontrar retrasos en los inicios de las cosechas, la baja o nula producción de néctar, o simplemente la ausencia de floración de los árboles (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

Las abejas de la especie *Apis mellifera* recolectan resina de las yemas y las grietas en las cortezas de los arboles y brotes de las hojas. Posteriormente, secreciones enzimáticas mandibulares son añadidas a la resina y el material

parcialmente digerido es mezclado con la cera de abeja para utilizarse en la colmena principalmente como material de construcción para sellar agujeros en los panales, dar forma a las paredes de la colmena con el fin de proteger la entrada a la misma y mantener una temperatura y humedad adecuadas, además se cree que el propóleo también sirve como antiséptico para crear superficies internas libres de gérmenes (Burdock, 1998; Kuropatnicki *et al.*, 2013), generalmente la producción de propóleo de una colonia depende de factores climáticos, de los recursos forestales, de las mismas abejas y del método o mecanismo de recolección, sin embargo los datos encontrados en la literatura muestran resultados variados, que van de 150 a 200 g (Ghisalberti, 1979) y de 10 a 300 g de propóleo al año por colonia (Ochi *et al.*, 1981; Andrich *et al.*, 1987).

2.2.4. Proceso de recolección y tratamiento de propóleo.

La recolección del propóleo de las colmenas se realiza mediante los métodos de raspado o trampas, siendo este último el que ofrece la mejor calidad ya que permite disminuir la contaminación de la resina provocada por la manipulación a diferencia del raspado de las colmenas en malla. La temporada de recolección se realiza dependiendo de las condiciones ambientales estacionales, donde se ha observado una propolización más activa; en las zonas templadas la obtención se realiza antes de la llegada del invierno, mientras que en los climas tropicales se hace al inicio de la estación lluviosa (Farré *et al.*, 2004).



Figura 2. Proceso de raspado en la recolección de propóleo.

Si el propóleo es muy ceroso se lava con agua fría para remover ceras y es secado con aire en pantallas de acero inoxidable. Posteriormente, se disuelve en etanol al 95% para remover ceras y se filtra para retirar residuos de material orgánico no deseado (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

2.3. Panorama o situación de la apicultura en México.

La apicultura en México ha formado parte importante a lo largo de la historia de nuestro país, estaba particularmente desarrollada en el periodo de la cultura Olmeca en el sudeste del país, destacando la cultura Maya por sus prácticas apícolas. Actualmente, tiene una gran importancia socioeconómica y ecológica, ya que es considerada como una de las principales actividades pecuarias generadora de divisas. La apicultura, es conocida y apreciada, principalmente, por la producción de miel, pero también los productos derivados de la colmena, que son el polen, la cera, la jalea real, el propóleo y el veneno, destacan ya sea por la importancia que desempeñan dentro de la misma colmena como por sus aplicaciones en las industrias cosmética, farmacéutica y por supuesto la de los

alimentos (SAGARPA, 2015a), sin embargo, las abejas son fundamentales para un equilibrio del medio ambiente ya que las abejas al obtener el alimento de las flores fomentan en las plantas la capacidad de fecundarse. Lo anterior se conoce como polinización cruzada, gracias a ésta, las plantas generan una cantidad significativa oxígeno y además, aumentan el rendimiento en los cultivos, lo que favorece un incremento en la cantidad de alimentos de origen vegetal, materia prima textil, e insumos agropecuarios.

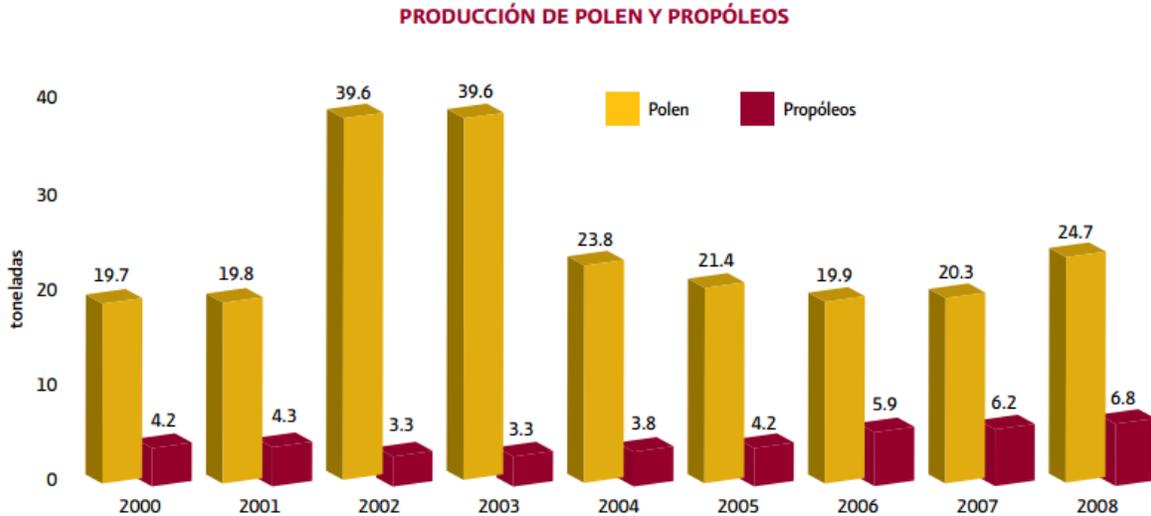
De seguir presentándose a nivel mundial la pérdida de las abejas, y aunado a diversos factores como el cambio climático, el empleo de plaguicidas, entre otros, las abejas están en riesgo en ciertas regiones, así como la sustentabilidad del apicultor. Las pérdidas económicas que esto originaría a la apicultura serian mínimas comparadas con los daños en los ecosistemas, medio ambiente, y en la disponibilidad de alimento (SAGARPA, 2015b).

Mexico es productor de una de las mieles de mejor calidad y más cotizadas en el mundo, por lo cual desde hace más de cinco décadas ha comercializado su producto en Alemania, Estados Unidos, Gran Bretaña, Irlanda del Norte, Arabia Saudita y Bélgica. Además, en Japón existe una alta demanda de miel de cítrico procedente de Nuevo León y San Luís Potosí (SAGARPA, 2015a), no obstante Alemania y Estados Unidos, son los países que importan la mayor parte de la producción de miel del país, específicamente un 43 y 25%, respectivamente (SAGARPA, 2015b). En 2015 se reportó una producción de 61 mil 881 toneladas de miel, un incremento del 2.1 % con respecto a las 57 mil de toneladas anuales promedio, posicionándose en el sexto lugar a nivel mundial en producción de miel de abeja y el tercero en cuanto a exportación, reportando cifras de 45 mil toneladas con un valor superior a los 150 millones de dólares (SAGARPA, 2015a).

2.3.1. Producción de propóleo en México.

Por otro lado, los países que destacan en la producción mundial de propóleo son China, Argentina, Brasil, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá (CONACYT Agencia Informativa, 2015).

La producción de propóleos en México es muy limitada y de no muy buena calidad, debido a que muchos apicultores mexicanos carecen del conocimiento para la extracción y el procesamiento del propóleo y la mayoría ignora el valor de la resina, por lo que la mayor parte de su producción está basada en el raspado interno que realiza el productor durante la revisión de sus colmenas, también influye la falta de demanda por parte de las empresas, ya que el mercado de los productos de la colmena está principalmente enfocado al comercio de la miel, resultando en el lento desarrollo de la promoción para incrementar la producción y uso del propóleo, sin embargo, por ser un producto que da alternativas económicas al productor, mediante la capacitación y asistencia técnica se puede fomentar la producción utilizando la tecnología, a través de trampas que permitan coleccionar un propóleo de mejor calidad en el mediano plazo para cubrir la demanda nacional, e incursionar en el largo plazo en mercados internacionales como lo es Japón, que adquiere alrededor del 85 por ciento de la producción mundial de propóleos (SAGARPA, 2009), y sabiendo que el precio internacional del propóleo es aproximadamente de 100 dólares por kilogramo (CONACYT Agencia Informativa, 2015), sin lugar a dudas es una importante fuente alterna de ganancias para los apicultores que necesita ser promovida y explotada. En la Figura 3 se ilustra la tendencia relativamente lenta en el aumento de la producción del propóleo en el transcurso de 8 años.



Fuente: Coordinación General de Ganadería / SAGARPA (2008 cifras preliminares).

Figura 3. Gráfico que muestra la producción de toneladas de polen y propóleo durante el periodo 2000 – 2008, en el se aprecia la tendencia en el incremento de la producción de propóleo.

2.3.2. Regionalización de la producción apícola en México.

La producción de miel está supeditada a las condiciones del medio ambiente y a la disponibilidad de recursos naturales, como son el polen y el néctar de las flores, por lo que en la mayor parte del país ésta se presenta fundamentalmente en dos épocas del año. La primera, en las regiones del sureste y costas del país, donde la producción se obtiene entre los meses de marzo y mayo (primavera-verano), generando el 40 por ciento de la producción. La segunda, se obtiene en el altiplano y norte del país, entre los meses de septiembre y de noviembre (otoño-invierno), obteniendo el 60 por ciento restante de la producción.

Gracias a sus diferentes climas y flora, que influye sobre la composición de recursos de néctar y polen, México se divide en cinco regiones apícolas bien definidas, con diferente grado de desarrollo y variedad de tipos de mieles en

cuanto a sus características de humedad, color, aroma y sabor; estas regiones son: región del norte, región de la costa del Pacífico, región del Golfo, región del altiplano y región sureste o península de Yucatán (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010). Dado que la zona geográfica es uno de los factores primordiales a considerar en la composición y por ende en la actividad biológica de los propóleos, éstos se han clasificado de acuerdo a la región apícola en la cual fueron obtenidos; en el mapa de la Figura 4 se ilustran las diferentes regiones apícolas del país, además se observa que el estado de Durango pertenece a la región Norte.



Fuente: Coordinación General de Ganadería / SAGARPA.

Figura 4. Mapa de regiones apícolas en la República Mexicana que clasifican los propóleos mexicanos de acuerdo a su origen de obtención (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

2.3.2.1. Región del Norte de México.

Caracterizada por la excelente miel que produce, principalmente de mezquite, miel extra clara ámbar cuya producción en su mayoría se destina a un mercado

fuertemente demandante como es el de los EE.UU. Aunque la zona sureste es la región con mayor producción y reconocimiento en el mercado internacional el precio de esta miel es uno de los mejores a nivel nacional. Los estados que integran esta región son Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León y parte del norte de Tamaulipas y el altiplano de San Luis Potosí.

2.4. Composición química del propóleo.

Diversos estudios estiman que la composición del propóleo es de aproximadamente un 55% de resinas y bálsamos aromáticos (entre los cuáles se encuentran flavonoides, flavonas, ácidos y aldehídos aromáticos, cumarinas y terpenos), 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, y finalmente un 5% de polen (Sharaf *et al.*, 2013; Burdock, 1998).

El propóleo puede estar constituido por más de 300 compuestos, por lo que tiene una composición química extremadamente compleja y variable, que depende principalmente de la flora local del sitio de recolección y, por lo tanto, de las características geográficas y climatológicas de dicho sitio (Bankova *et al.*, 2000); sin embargo, la composición química cualitativa a grandes rasgos del propóleo es similar, encontrándose frecuentemente una alta proporción de compuestos fenólicos (como flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres), terpenoides, azúcares, esteroides y aminoácidos, aldehídos volátiles y cetonas (Sharaf *et al.*, 2013; Kalogeropoulos *et al.*, 2009). En el extracto de propóleo se puede encontrar una alta concentración de flavonoides y compuestos fenólicos (Bankova *et al.*, 2005). La composición del extracto varía con el disolvente usado en el proceso de extracción, encontrándose ácidos fenólicos y compuestos más polares que el agua en un extracto etanólico (Mello *et al.*, 2010).

Entre estos compuestos mencionados destacan la familia de los flavonoides, los encontrados en un extracto etanólico de propóleo mayoritariamente son la

pinocembrina, galangina, crisina, quercetina, kaempferol y naringenina (Sharaf *et al.*, 2013) y, por lo general, es a los cuáles se les atribuye la amplia variedad de actividades biológicas que presentan.

2.4.1. Flavonoides.

Los flavonoides son una gran familia de compuestos polifenólicos sintetizados como metabolitos secundarios por las plantas, pueden clasificarse en 6 subclases mayores que son: antocianidinas, flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, flavonas e isoflavonas, siendo los flavonoles, los más abundantes en la dieta humana, (Higdon, Linus Pauling Institute, Oregon University). Los flavonoides polifenólicos que tienen el esqueleto difenilpropano o $C_6C_3C_6$ incluyen a los subgrupos de flavonoles monoméricos, flavonas, flavonoles y flavanonas (Fong, *et al.*, 2010).

Los flavonoides poseen una amplia variedad de efectos biológicos, diversos estudios han evidenciado su actividad neuroprotectora, antiinflamatoria, antitrombogénica, antidiabética, anticancerígena, quelante y antioxidante a través de diferentes mecanismos de acción en modelos animales e *in vitro*, además de regular ciertas rutas de señalización celular y prevenir enfermedades cardiovasculares. En los últimos años ha crecido el interés científico en su potencial para explicar algunos de los beneficios para la salud asociados a dietas ricas en este grupo de compuestos; sin embargo, muchos de sus efectos biológicos parecen estar relacionados a su habilidad para modular rutas de señalización celular más que a su actividad antioxidante (Higdon, Linus Pauling Institute, Oregon University).

2.4.2. Principales compuestos aislados de propóleos de diferentes ubicaciones geográficas.

Los constituyentes característicos de los propóleos provenientes de zonas templadas, de ambos hemisferios son flavonoides sin sustituyentes en el anillo B, entre los cuáles se encuentran principalmente pinocembrina, pinobanksina, galangina y crisina; además de ácidos fenilpropanóicos y sus ésteres, por ejemplo el CAPE. Patrones quimiogeográficos han permitido establecer diferentes tipos de propóleo dependiendo de la distribución geográfica de las especies vegetales y las muestras recolectadas. Aun y cuando la diversidad de compuestos encontrados en el propóleo es muy amplia, es posible identificar los patrones químicos característicos (Salatino *et al.*, 2011). En el siguiente mapa se muestra la distribución de los cinco tipos de propóleo y un cuadro que resume algunas de las características más importantes de esta clasificación.



Figura 5. Mapa que indica la distribución de los tipos de propóleo clasificados de acuerdo a la distribución geográfica de las especies vegetales (Salatino *et al.*, 2011).

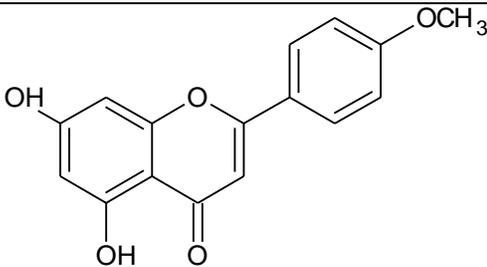
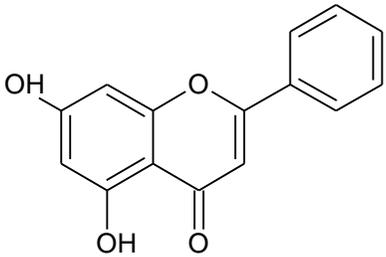
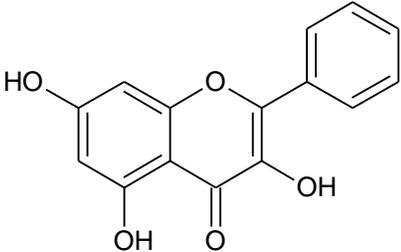
Cuadro 1. Características de los tipos de propóleo de acuerdo a la distribución geográfica de las especies vegetales (Salatino *et al.*, 2011).

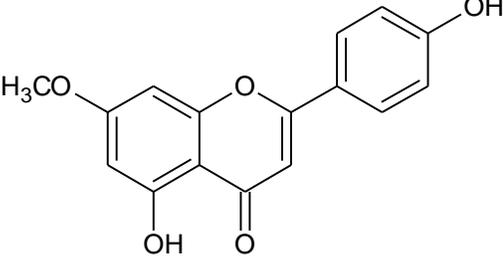
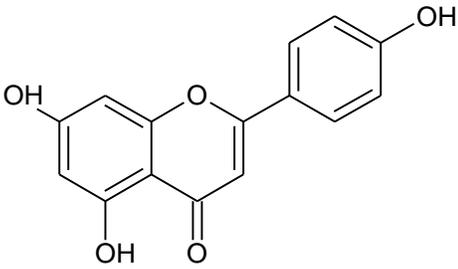
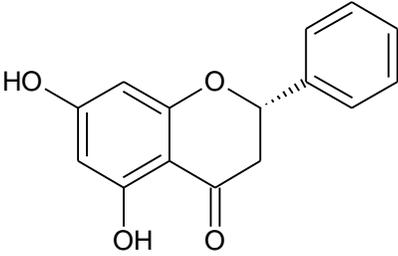
Tipo de propóleo	Tipo de compuestos	Procedencia
I	Flavonoides sin sustituyentes en el anillo B y ésteres de fenilpropanoides.	Derivados de <i>Populus</i> (álamo). Regiones templadas de ambos hemisferios. <i>Populus</i> , principalmente <i>P. nigra</i> .
II	Fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoilquínicos.	Brasil, principalmente propóleo verde. <i>Baccharis dracunculifolia</i> .
III	Benzofenonas polipreniladas.	Derivados de <i>Clusia</i> . Región tropical, como Cuba, Venezuela y algunas regiones de Brasil.
IV	Geranil flavonoides.	Derivados de <i>Macaranga</i> . Regiones tropicales de África y Asia.
V	Diterpenoides o antraquinonas.	Grecia, Creta, Turquía.

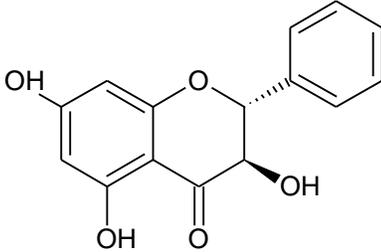
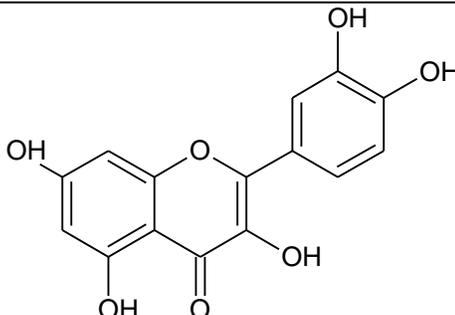
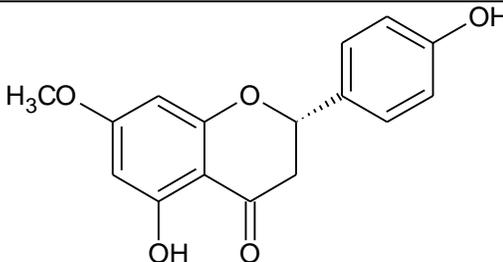
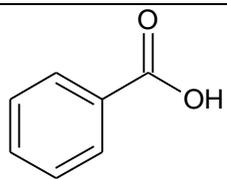
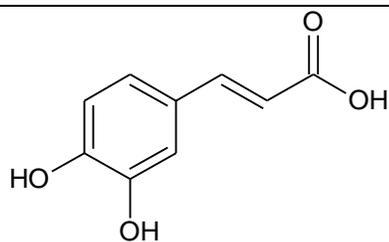
Fuente: Salatino *et al.*, 2011.

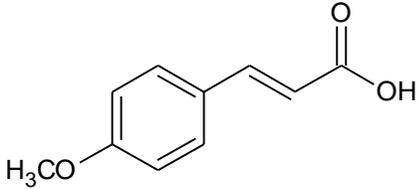
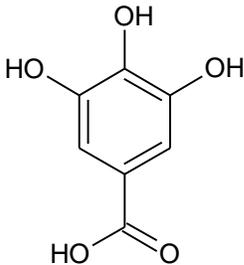
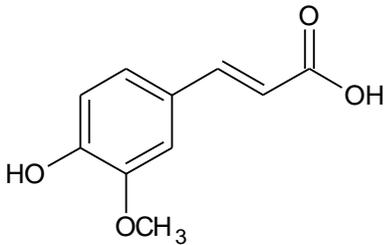
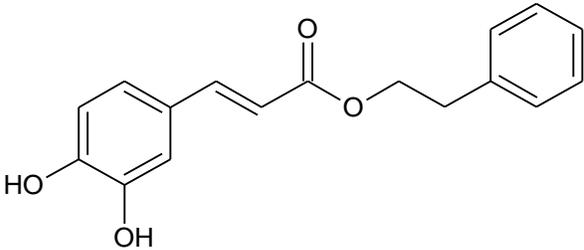
En el siguiente cuadro se ilustran algunos de los compuestos aislados del propóleo que presentan actividad biológica de importancia terapéutica así como su procedencia.

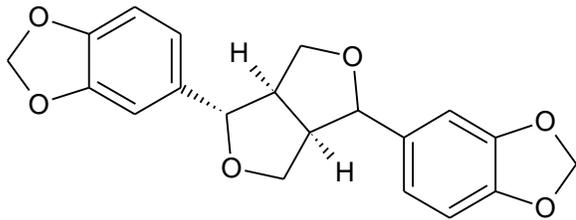
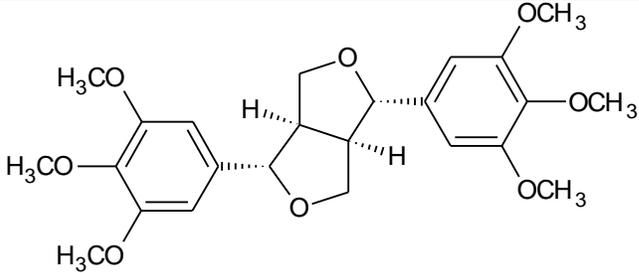
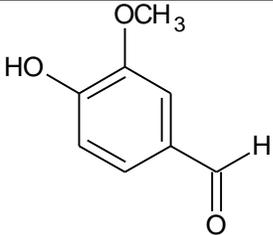
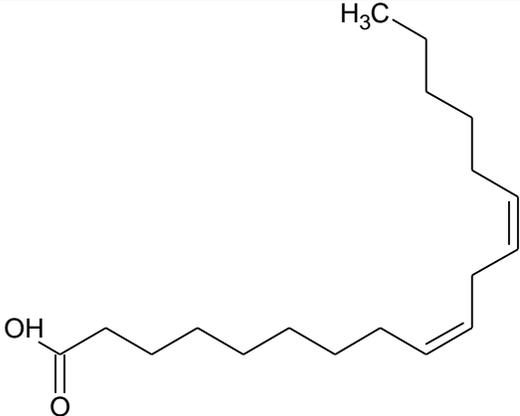
Cuadro 2. Principales compuestos aislados de muestras de propóleo de diferentes países.

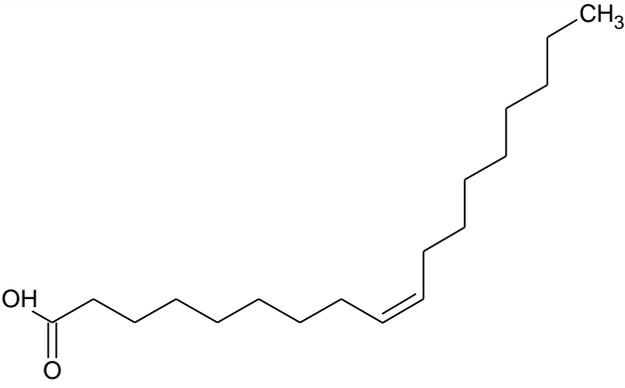
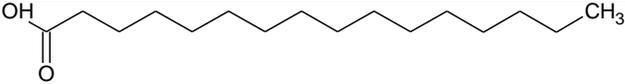
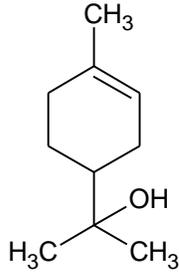
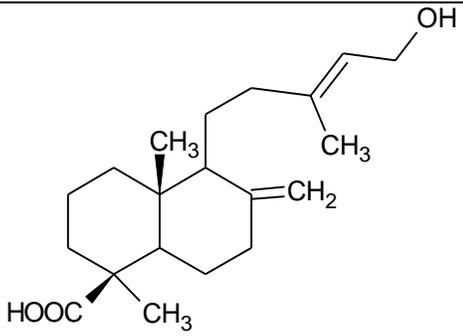
Compuesto	Estructura	País	Referencia
FLAVONOIDES			
Acacetina		México	Valencia <i>et al.</i> , 2012.
Crisina		Chile China Holanda	Castro <i>et al.</i> , 2014. Yang <i>et al.</i> , 2015. Popova <i>et al.</i> , 2007.
Galangina		Chile China Corea	Castro <i>et al.</i> , 2014. Yang <i>et al.</i> , 2015. Kim <i>et al.</i> , 2011.

Genkwanina		China	Yang <i>et al.</i> , 2015.
Naringenina		China Turquía	Yang <i>et al.</i> , 2015. Ataç Uzel <i>et al.</i> , 2005.
Pinocembrina		Australia Canadá China Corea España México Portugal Rumania	Massaro <i>et al.</i> , 2015. Cottica <i>et al.</i> , 2015. Yang <i>et al.</i> , 2015. Kim <i>et al.</i> , 2011. Kumazawa <i>et al.</i> , 2004. Valencia <i>et al.</i> , 2012. Ahn <i>et al.</i> , 2007. Falcão <i>et al.</i> , 2010.

Pinobanksina		Chile Chipre Grecia Corea	Castro <i>et al.</i> , 20145 Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009. Kim <i>et al.</i> , 2011.
Quercetina		Corea	Kim <i>et al.</i> , 2011.
Sakuranetina		Corea	Kim <i>et al.</i> , 2011.
ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÉSTERES			
Ácido benzoico		Turquía	Ataç Uzel <i>et al.</i> , 2005.
Ácido caféico		Chile	Castro <i>et al.</i> , 2014.

<p>Ácido cinámico</p>		<p>China</p>	<p>Yang <i>et al.</i>, 2015.</p>
<p>Ácido gálico</p>		<p>Australia Canadá</p>	<p>Massaro <i>et al.</i>, 2015. Cottica <i>et al.</i>, 2015.</p>
<p>Ácido ferúlico</p>		<p>Chile China Corea</p>	<p>Castro <i>et al.</i>, 2014. Yang <i>et al.</i>, 2015. Kim <i>et al.</i>, 2011.</p>
<p>CAPE (Feniletil éster del ácido caféico)</p>		<p>Chile China</p>	<p>Castro <i>et al.</i>, 2014. Yang <i>et al.</i>, 2015.</p>

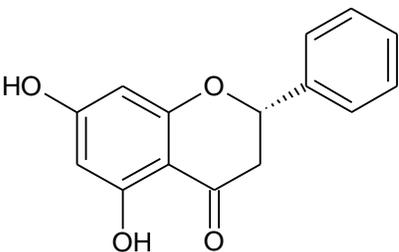
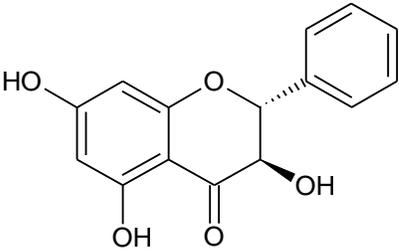
LIGNANOS			
Sesamina		Bulgaria	Bankova <i>et al.</i> , 2000.
Yangambina		Bulgaria	Bankova <i>et al.</i> , 2000
ALDEHIDO			
Vainillina		Chile	Castro <i>et al.</i> , 2014.
ÁCIDOS GRASOS			
Ácido linoléico		Turquía	Ataç Uzel <i>et al.</i> , 2005.

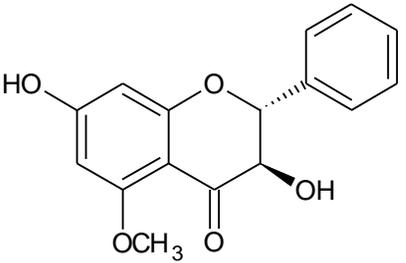
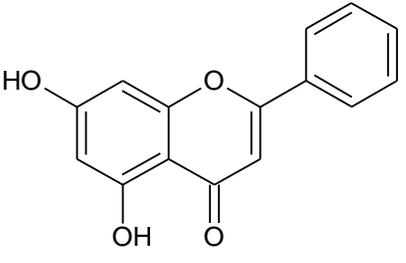
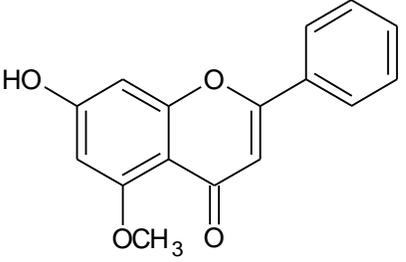
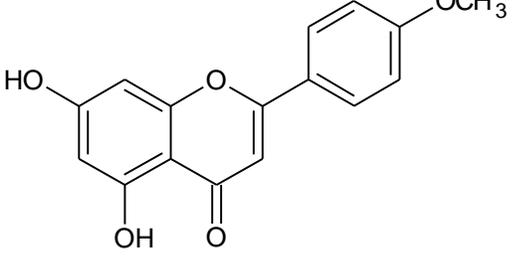
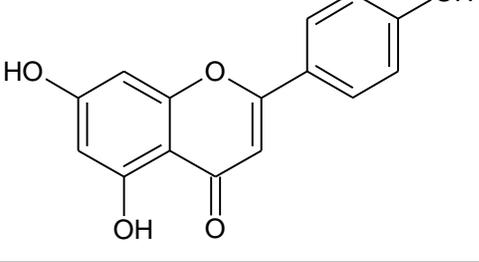
Ácido oleico		Corea	<i>Chang et al.</i> , 2003.
Ácido palmítico		China	<i>Yang et al.</i> , 2015.
TERPENOIDES			
Terpineol		Brasil	<i>Koo et al.</i> , 2005.
Ácido isocuprésico		Brasil	<i>Koo et al.</i> , 2005.

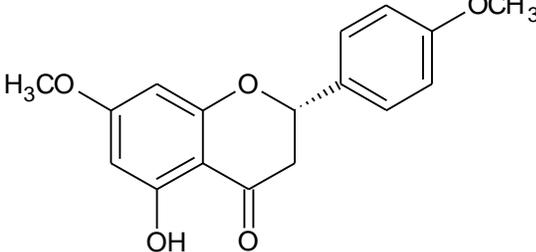
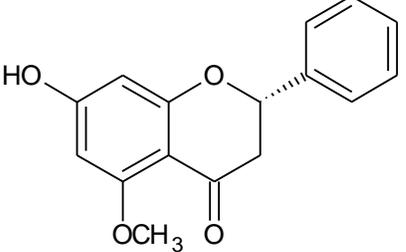
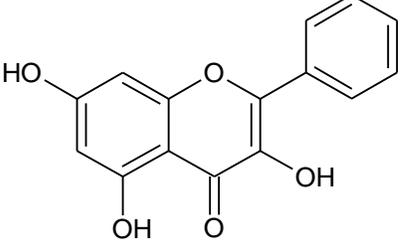
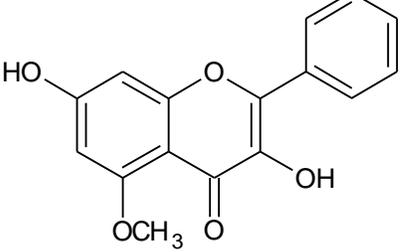
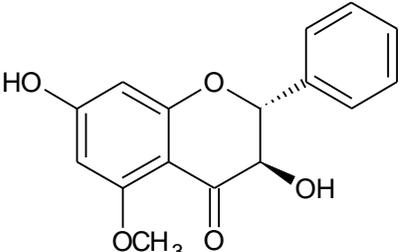
2.4.2.1 Principales compuestos aislados de propóleos provenientes de diferentes regiones apícolas de México.

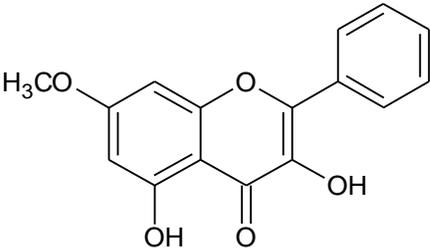
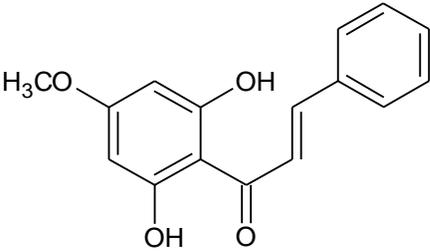
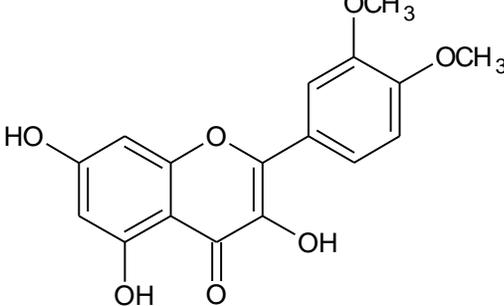
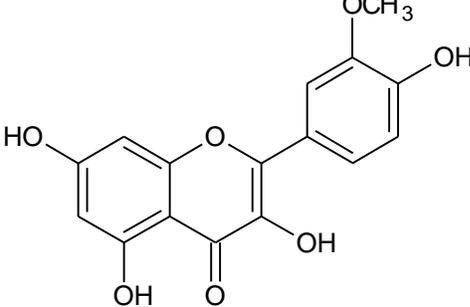
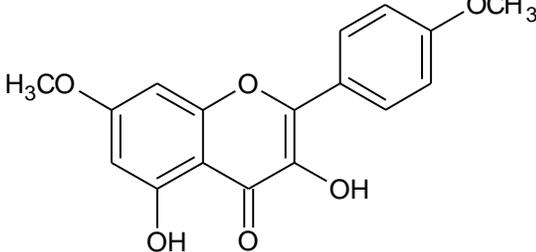
En el caso particular de México, la clasificación propuesta por Salatino *et. al* en 2011, incluye a los propóleos mexicanos dentro del tipo I, que corresponde al derivado del álamo, encontrado en regiones templadas, sin embargo es necesario considerar la variedad de climas y vegetación característica presentes en distintas regiones del país, por esta razón el uso de la clasificación de las regiones apícolas de México propuesto por la SAGARPA es un enfoque más preciso. Se han llevado a cabo estudios químicos de propóleos de las diferentes regiones apícolas anteriormente expuestas que han permitido el aislamiento de diferentes compuestos, es importante destacar la invaluable aportación de conocimientos en este aspecto que ha generado el trabajo realizado en el lugar de realización de esta tesis. Algunos de los compuestos aislados hasta la fecha se presentan en el cuadro siguiente.

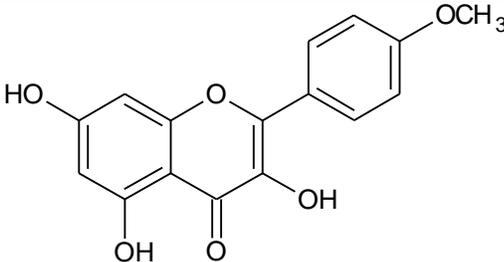
Cuadro 3. Principales compuestos aislados previamente de diversos propóleos mexicanos.

Compuesto	Estructura	Procedencia
Pinocembrina		Comarca Lagunera (Gómez Palacio), Durango. Acuexcomatl, Xochimilco, D.F. Puebla. Guanajuato.
Pinobanksina		Comarca Lagunera (Gómez Palacio), Durango.

5-O-metilpinobanksina		Guanajuato.
Crisina		Comarca Lagunera (Gómez Palacio), Durango. Puebla. Guanajuato.
5-O-metilcrisina		Guanajuato.
Acacetina		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F.
Apigenina		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F.

4',7-dimetilnaringenina		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F.
Alpinetina		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F. Guanajuato.
Galangina		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F. Puebla. Guanajuato.
5-O-metilgalangina		Guanajuato.
5-metileterpinobanksina		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F.

Izalpinina		Puebla.
2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona		Puebla.
Dillenetina		Guanajuato.
Isorhamnetina		Guanajuato.
4',7-dimetilkaempferol		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F.

Kaempferida		Acuexcomatl, Xochimilco, D.F.
-------------	--	----------------------------------

2.5. Usos del propóleo en la industria.

Hoy en día el propóleo ha sido utilizado en diversas áreas, en las que ha llegado a ser un ingrediente esencial para la elaboración de una diversa gama de productos comerciales en el área de la medicina, industria cosmética, farmacéutica y alimenticia.

Es posible encontrar el extracto de propóleo como ingrediente en productos finales que van desde alimentos, medicamentos y cosméticos incluidos en diferentes formulaciones de formas farmacéuticas, por ejemplo: tabletas, cápsulas, jarabes, tizanas, cremas, ungüentos, lociones, shampoos, jabones, lápices labiales, mascarillas faciales, sprays bucales y nasales, pasta dental y enjuague bucal (Krell, 1996). En la tecnología de alimentos estudios han demostrado que el extracto acuoso es un potencial conservador alimenticio por sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas (Tosi *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2014). Además, se ha reportado que como aditivo en la dieta de gallinas incrementa la ganancia de peso y mejora significativamente la producción de huevo (Ghisalberti, 1979; Bonomi *et al.*, 1976).

Los extractos de propóleo han sido ampliamente usados en odontología, en el tratamiento de alveolitis dental, encías y membranas mucosas, y se han estudiado sus efectos en el tratamiento de hipersensibilidad dentinaria (Mahmoud *et al.*, 1999), parodontopatías, candidiasis oral (Santos *et al.*, 2005), caries y sus complicaciones (Hayacibara *et al.*, 2005).

2.6. Generalidades en los métodos de extracción del propóleo.

Generalmente, el proceso de extracción del crudo de propóleo es relativamente sencillo y, dependiendo del tipo de compuestos deseados, se recomienda el uso de cierto tipo de solventes, ya que se ha reportado el uso de agua para la extracción de ácidos fenólicos y solventes orgánicos comunes principalmente etanol, metanol, diclorometano, dietileter, cloroformo para la extracción de flavonoides (Gómez *et al.*, 2006).

Se ha observado mediante análisis en CCF que el número de componentes presentes en un EEP, incrementa proporcionalmente a la concentración etanólica del disolvente usado para la extracción (Sawaya *et al.*, 2004), al presentar un buen rendimiento en la extracción de componentes de interés, el etanol se ha convertido generalmente en el disolvente de elección.

Es posible remover las ceras y los residuos orgánicos durante el proceso de extracción etanólica. El extracto obtenido contiene la mayoría de los constituyentes bioactivos del propóleo por lo que el EEP es una de las fuentes más ricas para la obtención de flavonoides y ácidos fenólicos (Kalogeropoulos *et al.*, 2009).

Antes de su uso en la industria los extractos deben ser concentrados, para eliminar o reducir el disolvente en los extractos de propóleo se usan diferentes procesos como liofilización, destilación al vacío y evaporación, sin embargo es necesario considerar que generalmente el uso de altas temperaturas (alrededor de 70°) puede degradar algunos compuestos presentes (flavonoides y compuestos fenólicos), por ello se han propuesto alternativas como el uso de procesos de permeación selectiva mediante membranas, este método se caracteriza por el uso de bajas temperaturas, ausencia de fase de transición y consumo bajo de energía (Mello *et al.*, 2010), sin embargo la evaporación es un método más rentable para la industria por el bajo costo del equipamiento requerido a diferencia de los métodos anteriores presentados.

El etanol es el disolvente más comúnmente utilizado en el proceso de extracción, sin embargo a pesar de sus numerosas ventajas existen algunos problemas con su uso como el fuerte sabor residual, reacciones adversas y la intolerancia al alcohol para algunas personas, por esta razón se ha probado con la adición de compuestos tensoactivos para sustituir al etanol con agua, lográndose resultados eficientes y obteniéndose extractos con una buena actividad antimicrobiana (Konishi *et al.*, 2004), a pesar de esto es fundamental reiterar que el uso de alcohol como disolvente de extracción permite la obtención de una mayor cantidad de compuestos.

2.7. Métodos cromatográficos de separación para lograr el aislamiento de compuestos del EEP y su determinación.

Para el proceso de fraccionamiento, se realiza una cromatografía en columna Sephadex LH-20 (medio formado de perlas de dextrano y usado específicamente para la filtración en gel de productos naturales como esteroides, terpenoides, lípidos y péptidos de bajo peso molecular), usando comunmente metanol como eluyente. Una vez hecho esto, es posible la determinación de los compuestos fenólicos de las fracciones mediante HPLC o bien RMN (Aliyazicioglu *et al.*, 2013).

Se han aplicado un extenso número de métodos para el análisis y determinación de los componentes del propóleo, entre los más conocidos se encuentran la cromatografía de gas (GC) (Pereira *et al.*, 1998; Maciejewicz *et al.*, 2001), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Bruschi *et al.*, 2003; Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Chen J. *et al.*, 2008) y la cromatografía de capa fina (TLC) (Medic-Saric *et al.*, 2004), entre estos la técnica analítica más popular es el HPLC. Sin embargo, todo método cromatográfico presenta ciertas desventajas, para compensar estas limitaciones se han desarrollado métodos novedosos de análisis que proporcionan información selectiva como son la electroforesis capilar (CE) (Gómez R. *et al.*, 2007), la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

(Jiang *et al.*, 2008), entre otros, aunque los reportes de su uso en los análisis de propóleo no es tan frecuente en comparación del HPLC.

Las determinaciones cuantitativas de flavonoides se pueden llevar a cabo por métodos colorimétricos como el método de $AlCl_3$ para determinar flavonas y flavonoles, mientras que para cuantificar flavanonas y dihidroflavonoles se utiliza el método DNP, también es posible determinar el contenido total de flavonoides mediante el método de Folin-Ciocalteu (Aliyazicioglu *et al.*, 2013).

2.8. Actividades biológicas del propóleo.

Los flavonoides son los principales constituyentes del propóleo de la mayoría de las fuentes de recolección (Ghisalberti, 1979) y, generalmente, a este grupo pertenecen los compuestos químicos responsables de las actividades biológicas que presenta (Bankova *et al.*, 2000).

El propóleo posee una amplia variedad de actividades biológicas, como son anestésica (Paintz *et al.*, 1979), antibacterial (Kujumgiev *et al.*, 1999; Kartal *et al.*, 2003), antidiabética (Sforcin, Bankova, 2011), antiviral (Amoros *et al.*, 1994; Kujumgiev *et al.*, 1999), antioxidante (Isla *et al.*, 2001; Kumazawa *et al.*, 2004), antiinflamatoria (Wang *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 2005), anticancerígena (Kimoto *et al.*, 2001; Sforcin, 2007; Wu *et al.*, 2009) y antifúngica (Kujumgiev *et al.*, 1999; Murad *et al.*, 2002), citotóxica y hepatoprotectora (Banksota *et al.*, 2000).

Estos efectos biológicos han quedado evidenciados por la vasta cantidad de estudios realizados. Se ha utilizado en forma efectiva en el tratamiento de quemaduras, úlceras, en padecimientos dermatológicos, laringológicos y ginecológicos e inclusive se ha propuesto el uso de propóleo como estrategia para prevenir o ralentizar el desarrollo de ciertas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Chen J. *et al.*, 2008), en el tratamiento de gingivitis y estomatitis por su uso en pasta de dientes y enjuague bucal (Bankova *et al.*, 1983; Marcucci *et al.*, 1995), se ha probado su efecto antiviral contra el virus del herpes (Huleihel *et*

al., 2002; Vynograd *et al.*, 2000), se ha demostrado su efecto positivo en los procesos de cicatrización de heridas (Kuropatnicki *et al.*, 2013), regeneración de tejido (Sutta *et al.*, 1975), regeneración de tejido cartilaginoso y tejido óseo (Scheller *et al.*, 1977; Stojko *et al.*, 1978; McLennan *et al.*, 2008), también reduce los procesos inflamatorios y degenerativos de la pulpa dental, mejorando su regeneración (Scheller *et al.*, 1978).

Se ha reportado que los polifenoles presentan una potencial actividad antiproliferativa en varios tipos de células cancerígenas (Kumar *et al.*, 2009). Estos efectos biológicos han sido confirmados en una variedad de cultivos de líneas celulares y modelos tumorales en animales (Aso *et al.*, 2004; Scheller *et al.*, 1989). Este grupo de flavonoides ha evolucionado como agentes farmacológicos prometedores para el tratamiento de cáncer (Kumar *et al.*, 2009).

Estudios han demostrado que además de las propiedades antitumorales (Scheller *et al.*, 1989) el EEP es un agente modulador del sistema inmunológico (participa en la activación de la vía de los macrófagos C1q), estimula la inmunidad no específica, activa la inmunidad humoral y mejora la inmunidad celular (Orsolich *et al.*, 2003; Blonska *et al.*, 2004; Sforcin, 2007). Es muy probable que la mejora de la función inmune sea benéfica a la quimioprevención del cáncer.

2.8.1. Actividad antimicrobiana del propóleo.

Varios estudios han reportado el amplio espectro de propiedades antimicrobianas del propóleo y sus constituyentes destacando compuestos de tipo flavonoide, ácido fenólico y ésteres de ácidos fenólicos (Kujumgiev *et al.*, 1999). El propóleo presenta una considerable actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivo como *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., incluyendo bacterias anaerobias de la cavidad oral humana y Gram negativo entre las que destacan *Aerobacter aerogenes*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pilori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (Patel *et*

al., 2015; Ataç Uzel *et al.*, 2005 Marcucci *et al.*, 1996), además de demostrarse su actividad contra algunos virus como el virus del herpes, influenza A y B; hongos y levaduras citando como ejemplos a *Candida albicans*, *Microsporium* sp. y protozoarios, principalmente *Trypanosoma cruzi* (Marcucci *et al.*, 1995; Farré *et al.*, 2004). El propóleo y algunos de sus constituyentes han demostrado ser responsables del desacoplamiento de la transducción de energía de la membrana citoplasmática y de inhibir la motilidad bacteriana (Mirzoeva *et al.*, 1997). Aunque el mecanismo de acción para el efecto antimicrobiano no está del todo claro debido a su correlación con la composición compleja y variable que presenta el propóleo, diferentes estudios sugieren que los constituyentes del propóleo interfieren con la división celular bacteriana a través de la formación de formas pseudo multicelulares, desorganización del citoplasma, inhibición de la síntesis de proteínas y lisis celular (Takaisi-Kikuni *et al.*, 1994).

El aumento en la resistencia bacteriana a antibióticos se debe principalmente al uso extendido e indebido de antibióticos en diferentes áreas como la medicina y la veterinaria. El problema radica en la escasez de nuevos antibióticos que posean diferentes mecanismos de acción, evitando la activación de genes de resistencia. El propóleo puede ser usado como terapia alternativa en el tratamiento para ciertas infecciones causadas por microorganismos resistentes, con el fin de que posiblemente pueda ayudar a prevenir la propagación y desarrollo de cepas resistentes. Se ha observado que las bacterias Gram (-) son menos sensibles que las Gram (+) al EEP, muy probablemente debido a que la membrana más externa inhibe y/o retarda la penetración y difusión de los componentes del propóleo (Darwish, 2010), inclusive se ha reportado la incidencia de resistencia de algunas bacterias Gram (-) al propóleo (Kujumgiev *et al.*, 1999).

Se ha observado mediante análisis en CCF que el número de componentes presentes en un EEP, incrementa proporcionalmente a la concentración etanólica del disolvente usado para la extracción. Generalmente, los extractos obtenidos usando 30% de etanol contienen sólo los compuestos más polares y no la totalidad de aquellos responsables de la actividad antimicrobiana, resultando en

un extracto con actividad bactericida baja, mientras que las muestras extraídas con 70% de etanol mostraban una composición similar a las extraídas con etanol absoluto (100%) (Sawaya *et al.*, 2004); además de observarse una mayor actividad antioxidante en los extractos obtenidos con 70-80% de etanol (Farré *et al.*, 2004).

Otros estudios han demostrado la existencia de una actividad sinérgica entre el uso conjunto de EEP y ciertos antibióticos, indicando que independientemente de la resistencia microbiana a los antibióticos, la actividad antimicrobiana y antifúngica fue significativamente mayor al probarse en bacterias Gram (+) y levaduras. Se encontró además que la resistencia a los antibióticos de las bacterias probadas no tiene influencia en la susceptibilidad al EEP (Stepanović *et al.*, 2003). Algunos extractos potencian el efecto de algunos antibióticos (Sforcin *et al.*, 2000) como biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina y estreptomicina contra *S. aureus* y *E. coli*.

Sin embargo, diferentes muestras de propóleo presentan un distinto potencial para mejorar la acción de los antibióticos y generalmente el potencial antimicrobiano se ve incrementado proporcionalmente con la concentración del EEP usado (Stepanović *et al.*, 2003).

Además se han elaborado sistemas de liberación basados en niosomas cargados de propóleo. Estos sistemas niosomales han demostrado un aceptable porcentaje de carga o atrapamiento (50.62 – 71.29%) además de una mejora significativa en la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* mediante aplicación tópica, atribuida probablemente por facilitar la difusión de los constituyentes del propóleo a través de la pared celular, además de la retención mejorada de los niosomas en la piel (Patel *et al.*, 2015).

Entre los microorganismos patogénicos más comunes encontrados en la cavidad oral destacan algunas especies de bacterias del género *Streptococcus*, que aunque habitualmente muchas especies forman parte de la microbiota de la boca, tracto respiratorio superior, piel e intestino, algunas son patógenas o bien pueden

presentar un riesgo al ocurrir un desequilibrio homeostático favoreciendo condiciones que permitan su crecimiento anormal desmedido. Se caracterizan por ser cocos Gram (+), generalmente no hemolíticos.

Algunas de las principales especies de *Streptococcus* aisladas de la cavidad bucal incluyen a *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*. Cabe destacar que estas especies tienen un papel esencial en la formación y desarrollo de la caries dental. La superficie dental esta predispuesta a varias infecciones debido a factores que favorecen el crecimiento microbiano (pH, sustrato disponible y cantidad de glucoproteínas ácidas presentes en la saliva), la más extendida y común es la caries dental, que de no tratarse adecuadamente puede producir padecimientos que van desde dolor, infección, pérdida de piezas dentales y llevar inclusive a la muerte en casos severos (Ophori *et al.*, 2010). La cariogénesis puede definirse como el daño estructural a la dentina y esmalte del diente provocado por la placa dentobacteriana (Kouidhi *et al.*, 2010).

La formación de caries dental es causada por la colonización y la acumulación de microorganismos orales y de polisacáridos extracelulares que son sintetizados de la sacarosa por la glucosiltransferasa principalmente de *S. mutans* en la superficie dental. Numerosas investigaciones han demostrado una correlación positiva entre el número de *S. mutans* en la placa dentobacteriana y la prevalencia de caries dental. Los polisacáridos extracelulares consisten de glucanos conteniendo predominantemente enlaces α -1,6 que son similares a los dextranos clásicos y de polímeros conteniendo más de 50% de uniones α -1,3. Estos polisacáridos son altamente insolubles en agua y se denominan mutanos (Ríos *et al.*, 1988; Park *et al.*, 1998; Koo *et al.*, 2000).

S. mutans tiene un papel importante en la formación de placa o biofilm en ambientes con altas cantidades de sacarosa (Park *et al.*, 1998) al fermentar los carbohidratos para producir ácido láctico provocando la desmineralización dental y el establecimiento de condiciones favorables para la formación de placa (Kouidhi *et al.*, 2010). La formación del biofilm se inicia en su adherencia a una sal de fosfato de calcio (hidroxiapatita), para la posterior adhesión de bacterias como *S.*

mutans, *S. sanguinis* y *S. oralis* al esmalte dental mediante la producción de polisacáridos extracelulares insolubles. La formación de la placa dentobacteriana también permite el desarrollo de otras bacterias que carecen de mecanismos de adherencia.

Se sabe que *S. mutans* produce al menos tres tipos distintos de la enzima glucosiltransferasa (GTF), el glucano sintetizado por la GTF-B presenta enlaces α -1,3 y es insoluble en agua; el producido por la GTF-D es soluble en agua y la GTF-C sintetiza una mezcla de glucano enlazado α -1,6 soluble e insoluble. Las GTF tipo B y C, que producen glucano insoluble, son las que presentan un papel más importante en el desarrollo de caries dental. Cabe destacar además que una considerable parte de los productos comerciales para la higiene oral no son efectivos inhibidores de las enzimas GTF productoras de glucano insoluble en agua, aún y cuando se ha reportado que es uno de los factores de virulencia más relevantes para interrumpir la colonización del diente por patógenos orales y la subsecuente formación de placa dentobacteriana (Duarte *et al.*, 2003).

Esta información es útil principalmente para el desarrollo de tratamientos y la prevención de caries mediante antibióticos u otros agentes que presenten un mecanismo de acción que alteren ciertos factores de patogenicidad como la adherencia dependiente de sacarosa por la inhibición de la síntesis de glucanos insolubles en agua catalizada por la enzima glucosiltransferasa, que permite la acumulación e infección de ciertos microorganismos que conllevan a la formación de placa dentobacteriana y posteriormente al desarrollo de caries dental.

El EEP presenta una actividad antibacteriana contra cierto número de microorganismos orales e inhibe la adhesión celular así como la formación de glucano insoluble en agua (Ophori *et al.*, 2010). La actividad antimicrobiana contra una cepa de *S. mutans* aislada de caries dental ha sido reportada previamente en diferentes estudios, los resultados demostraron que el EEP inhibe la actividad enzimática de la glucosiltransferasa y consecuentemente el crecimiento de *S. mutans* (Park *et al.*, 1998), demostrando su utilidad potencial para el control y tratamiento de caries dental causada principalmente por *S. mutans*, al ser

considerada la especie más cariogénica entre todo el género de *Streptococcus* presentes en la cavidad oral, ya que actúa sobre los carbohidratos disponibles en la cavidad oral, la degradación de estos carbohidratos conlleva a la producción de ácido láctico que eventualmente degrada el esmalte dental (Ophori *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN.

Poco más de 10% de la biodiversidad mundial ha sido evaluada en búsqueda de compuestos que presenten actividad biológica potencial; por lo que muchos otros compuestos lead de origen natural esperan a ser descubiertos (Dias *et al.*, 2012).

En este caso, el propóleo posee características que lo hacen único para su estudio, debido a la diferente composición química que puede ser encontrada dependiendo del lugar de procedencia de la muestra y que es un resultado de la vegetación en la zona, de la especie de abeja recolectora e inclusive de la temporada en la cual se recolecta.

Además, es necesario hacer hincapié en el extenso número de estudios que se han llevado a cabo, relativos a diferentes usos potenciales en diversas áreas como la industria farmacéutica, la medicina, e inclusive la industria alimenticia. Todos ellos, muestran la diferencia entre las propiedades que presentan y su lugar de procedencia la cual implica una determinada composición química.

Por ello es esencial la investigación continua y la realización de estudios químicos de la composición de ciertas variedades de propóleo que presentan propiedades biológicas novedosas. En el caso de México, la información encontrada en la literatura es limitada, sabiéndose que México es uno de los países con mayor biodiversidad, tanto en diversidad vegetal y de especies de abejas en América, encontrándose aproximadamente 2000 especies (aunque es bien sabido que la especie *Apis mellifera* es la más utilizada para la producción de miel, polen, propóleo, y jalea real, esta especie es común en América del Norte en algunas zonas desérticas de Sonora, Coahuila, Durango y Zacatecas); como resultado lo hace único para el estudio de la composición de diversos propóleos de algunas regiones del país (Quezada *et al.*, 2010).

4. OBJETIVOS.

➤ Objetivo general:

Evaluación química de una muestra de propóleo recolectada en la zona norte de México.

➤ Objetivos particulares:

- Recolectar y procesar una muestra de propóleo obtenida de la zona melífera del norte de México.
- Preparar el extracto etanólico de la muestra recolectada mediante un proceso de maceración.
- Fraccionar el extracto etanólico mediante métodos de partición y cromatográficos.
- Evaluar la actividad biológica del extracto obtenido (actividad antimicrobiana) y de las fracciones primarias con el fin de identificar aquellas que presenten una mayor actividad antimicrobiana.
- Purificar los compuestos mayoritarios a partir de las fracciones obtenidas.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante métodos espectroscópicos y espectrofotométricos.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.1 Recolección del propóleo.

La muestra de propóleo se colectó en la zona de la Comarca Lagunera en el estado de Durango.

Entre el conglomerado vegetal cultivado de mayor importancia en esta región se pueden encontrar diferentes especies silvestres siendo la más representativa el mezquite (*Prosopis juliflora*), el cuál es un árbol o arbusto caducifolio de 2 a 12 m de altura, que se puede encontrar en todo el país, pero principalmente en lugares áridos, desde Baja California y Chihuahua hasta Oaxaca y de Tamaulipas a Veracruz, además cabe destacar los numerosos usos que presenta, como adhesivo, para la preparación de varios comestibles y la resina en cocimiento para el tratamiento de disentería y algunas afecciones de los ojos, mientras que la corteza se emplea como astringente, y la corteza de la raíz, junto con las flores se utiliza como emético, purgante y antihelmíntico (CONABIO, 2016).

5.2. Procedimientos generales de análisis.

5.2.1. Análisis cromatográficos.

Las cromatografías en columna abierta se realizaron sobre dos tipos de fases estacionarias, gel de sílice 60 (Merck) y Sephadex LH-20 (Fluka).

Las cromatografías en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F254 Merck, tamaño de partícula 0.063 – 0.200 mm) utilizando diferentes sistemas de elución. Se observaron bajo luz U.V. a $\lambda=254$ nm y 315 nm, y posteriormente, se revelaron con diferentes agentes cromógenos como vainillina sulfúrica (a 100°), DPPH, $AlCl_3$.

5.3. Estudio químico.

5.3.1. Preparación del extracto etanólico.

Inicialmente, se tomó una cantidad de 80 g de una muestra de propóleo recolectado en el estado de Durango y se realizó una extracción continua con un equipo Soxhlet con 500 mL de etanol durante 6 horas, obteniéndose una masa de 43.8 g de extracto etanólico de propóleo.

5.3.2. Fraccionamiento primario del EEP.

Se utilizó una columna a presión reducida VLC (5 x 40 cm) y como fase estacionaria gel de sílice para el fraccionamiento primario de los 43.8 g obtenidos del extracto etanólico mediante una elución con un gradiente de concentración la mezcla de disolventes CH₂Cl₂ – Acetona (100:0 a 0:100).

El fraccionamiento primario permitió la obtención de un total de 34 fracciones (45 mL), las cuales fueron agrupadas finalmente en 10 fracciones combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica mediante el análisis cromatográfico en capa fina.

Las fracciones primarias obtenidas del extracto etanólico se emplearon para determinar la actividad antibacteriana contra las diferentes cepas bacterianas comúnmente encontradas en la cavidad bucal (*Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*). Para este estudio se utilizaron las fracciones FX-I, FX-II, FX-III, FX-IV y FX-V.

En el Cuadro 4 se detalla el fraccionamiento primario, así como las fracciones obtenidas.

Cuadro 4. Fraccionamiento primario del EEP de Durango.

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

5.4. Determinación de la actividad antibacteriana del EEP mediante la inhibición en el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.

5.4.1. Microorganismos de prueba.

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

5.4.2. Determinación de CMI.

El valor de MIC es definido como la concentración mínima del compuesto a probar necesaria para inhibir el crecimiento o desarrollo del microorganismo en estudio.

Esta inhibición en el crecimiento es perceptible al observar la ausencia de turbidez en el medio en el cual se realizó la inoculación. La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la determinación de la CMI, siguiendo la metodología de microdilución en placa de pozos descrita por el CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory for Standards Institute, 2006).

La evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones primarias (EEP) se determinó usando las bacterias *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, mediante un método de microdilución en placa de 96 pozos.

Para la determinación de la CMI, se procedió a preparar una disolución stock de cada una de las fracciones en estudio, para ello se pesaron 16 mg de cada una y se agregó agua destilada hasta obtener un volumen de 1.3 mL, obteniéndose una concentración inicial de 12.30 mg/mL.

Se utilizaron tres placas de 96 pozos en las cuales se determinaron por triplicado y de manera independiente las CMIs para *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*; para ello inicialmente se colocaron 100 μ L de medio BHI a todos los pozos y, posteriormente, se agregaron otros 100 μ L de todas las disolución stock preparadas de cada fracción (12.30 mg/mL), una vez mezcladas se realizaron diluciones seriadas de cada pozo. Posteriormente, se agregaron 80 μ L de medio BHI enriquecido con glucosa al 1% y 20 μ L de medio BHI con las bacterias viables de *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, con una concentración de 1×10^6 UFC.

El medio BHI fue utilizado como control negativo y digluconato de clorhexidina (CHX) como control positivo. Una vez finalizado el proceso de incubación (24 h a 37°C), se evaluó la inhibición del crecimiento debido a la fracción del EEP y se procedió a calcular la MIC.

Todas las fracciones presentaron una actividad antibacteriana, destacando la actividad de la FX-III, por lo cual se decidió continuar con su estudio químico.

5.5. Fraccionamiento secundario a partir de la FX-III primaria.

Al concentrar la FX-III a sequedad en rotavapor, se obtuvo una masa final de 2.2046g. Posteriormente, se disolvió esta fracción con un poco de metanol para el fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20, a esta columna cromatográfica se le realizó previamente un proceso de limpieza con hipoclorito de sodio, agua desionizada y finalmente metanol). Este soporte está formado de perlas de dextrano y se utiliza específicamente para la filtración en gel de productos naturales como esteroides, terpenoides, lípidos y péptidos de bajo peso molecular en disolventes orgánicos y como eluyente MeOH.

Como resultado se obtuvieron un total de 25 fracciones, las cuales se lograron agrupar en 8 fracciones combinadas con base en su similitud cromatográfica (CCF). Además estos análisis confirmaron la presencia de varios compuestos flavonoides y fenoles al utilizar diferentes reveladores o agentes cromógenos como vainillina sulfúrica (revelador universal que permite la detección de fenoles, esteroides, aceites esenciales y ésteres), Folin-Ciocalteu (usado para la determinación de los fenoles en los compuestos, la reacción puede ocurrir con cualquier grupo fenólico) y tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) usado para determinar el contenido de flavonas y flavonoles, permite su identificación por la coloración de estos debido a la formación de un complejo entre el ión Al (III) y los grupos carbonilo e hidroxilo del flavonoide. En el Cuadro 5 se describen las fracciones combinadas obtenidas del fraccionamiento secundario de la FX-III.

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario realizado a partir de la FX-III.

Numero de Fracciones	Fracciones Secundarias
1-3	F-I
4-6	F-II
7-9	F-III
10-11	F-IV
12-14	F-V
15-16	F-VI
17-19	F-VII
20-25	F-VIII

5.6. Fraccionamientos terciarios.

El análisis en cromatografía en capa fina evidenció la presencia de diferentes compuestos para su posterior separación mediante métodos cromatográficos, a continuación se detallan los procesos llevados a cabo con esta finalidad.

5.6.1. Fraccionamiento terciario a partir de la fracción F-VI secundaria.

La fracción F-VI se sometió a una cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como eluyente MeOH. Este proceso permitió la obtención de 12 fracciones, posteriormente el análisis cromatográfico realizado mediante CCF, usando como sistema de elución una mezcla de CH₂Cl₂/Acetona (90:10) demostró la presencia de un solo compuesto en la fracción 10 la cuál se concentró a sequedad mediante el rotaevaporador. De este proceso, se obtuvo un sólido cristalino rojizo con una masa de 4.2 mg. que se denominó compuesto C060316.

5.6.2. Fraccionamiento terciario a partir de la fracción F-VII secundaria.

Con la finalidad de separar los componentes de la fracción F-VII, se procedió a realizar una cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como eluyente MeOH. Este proceso permitió la obtención de 14 fracciones, al realizar una ccf usando las mismas condiciones del punto anterior se observó la presencia de un compuesto en la fracción 6, denominado C070316, el cual se concentró a sequedad y se obtuvo finalmente 13.7 mg de un sólido de color amarillo-rojizo de aspecto cristalino.

5.6.3. Fraccionamiento terciario a partir de la fracción F-VIII secundaria.

Posteriormente, la F-VIII se resolvió en una columna cromatográfica utilizando nuevamente como fase estacionaria Sephadex LH-20 y MeOH como eluyente. Este proceso permitió la obtención de 12 fracciones terciarias, las cuáles se agruparon en 3 fracciones combinadas en base a su similitud cromatográfica, y se muestra a continuación en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Fraccionamiento terciario realizado a partir de la F-VIII secundaria.

Numero de Fracciones	Fracciones Combinadas Terciarias
1-6	F-A
7-11	F-B
12	F-C

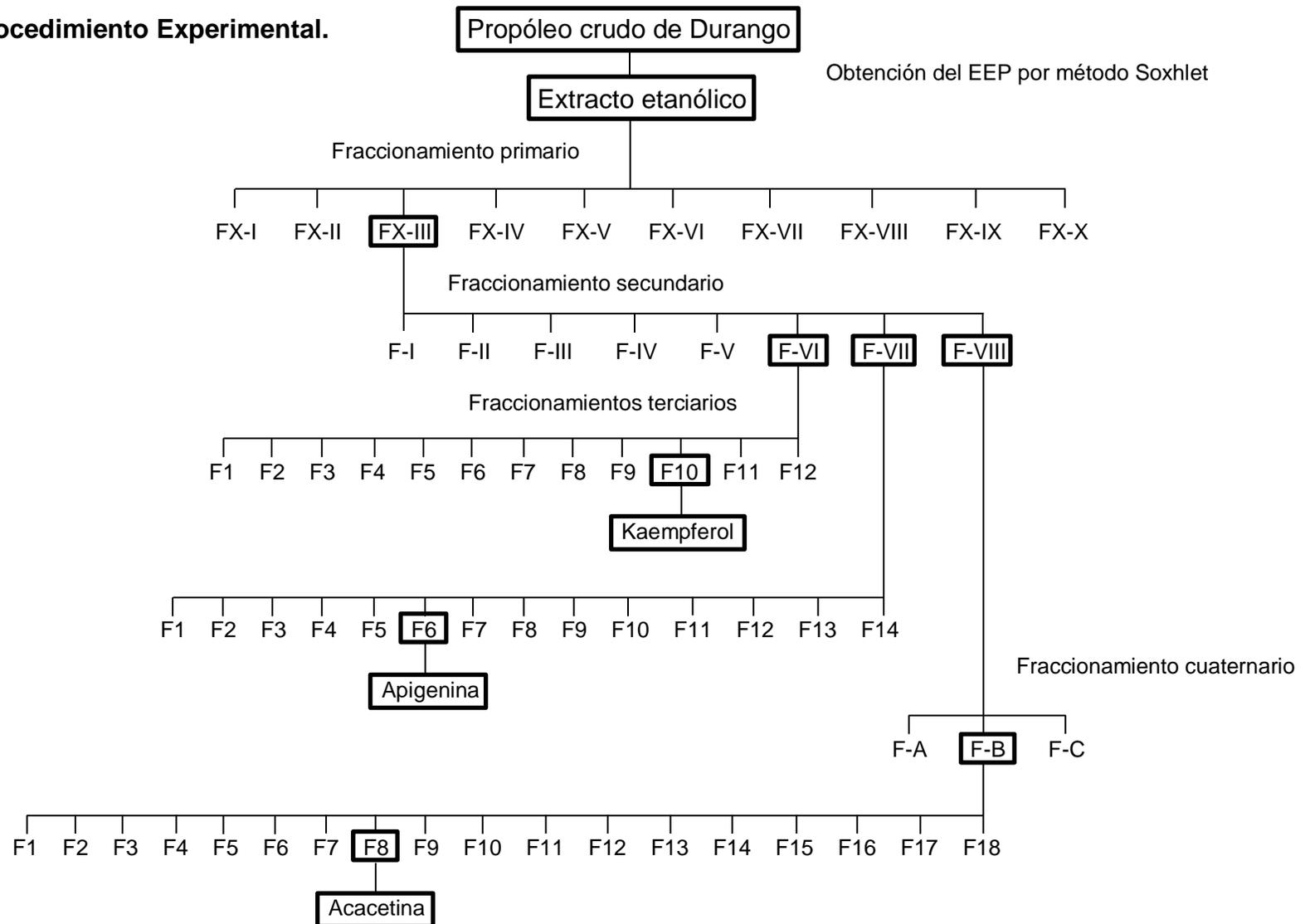
La fracción terciaria F-B se recromatografió en columna usando como adsorbente gel de sílice y eluyendo con un gradiente de disolventes CH₂Cl₂ – Acetona (100:0 a 0:100), obteniéndose 18 fracciones, las cuáles se indican en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Fraccionamiento Cuaternario realizado a partir de la F-B.

Numero de Fracciones	Disolvente	Proporción (%)
1-2	CH ₂ Cl ₂	100
3-4	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	99:1
5-6	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	98:2
7	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	95:5
8	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	90:10
9	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	80:20
10-11	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	70:30
12-13	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	60:40
14-17	CH ₂ Cl ₂ – Acetona	50:50
18	Acetona	100

De este último fraccionamiento, el análisis cromatográfico en capa fina demostró que la fracción 8 obtenida al eluir con la mezcla de CH₂Cl₂ – Acetona (9:1), con una masa de 10.7 mg, presentaba dos componentes. Con la finalidad de separar ambos componentes se procedió a realizar una cromatografía en capa fina preparativa (MACHEREY – NAGEL de 0.25 mm. de gel de sílice, con indicador fluorescente UV₂₅₄) utilizando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂/Acetona (90:10), una vez concluida la elución, se procedió a desadsorber con una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (9:1). Este proceso permitió la obtención de un sólido blanco (7.2 mg.) que se denominó compuesto C010316.

5.7. Procedimiento Experimental.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Elección del propóleo.

El propóleo ha sido ampliamente usado a lo largo de la historia y ha formado parte fundamental en la medicina tradicional de diversas culturas, actualmente existe una extensa gama de productos comerciales desarrollados a base de propóleo, en combinación ya sea con otros productos de la colmena o con diversas plantas medicinales para el tratamiento de diferentes padecimientos.

La selección del propóleo en estudio se realizó con base en un criterio etnomédico y en la revisión en la literatura. En este sentido, es importante mencionar que el número de estudios químicos y biológicos referentes a la caracterización y actividades biológicas realizados de propóleos mexicanos es relativamente escaso, en comparación con el encontrado en propóleos de regiones de Brasil, Europa, Asia y Canadá (Salatino *et al.*, 2011).

La muestra estudiada se recolectó en el municipio de Gómez Palacio, en la zona melífera de la Comarca Lagunera en Durango, mediante el método de raspado. El clima característico de esta zona es similar al encontrado en regiones templadas con inviernos definidos, temperaturas cercanas a 17°C y escasas precipitaciones (500 mm anuales). En esta región es posible encontrar una amplia diversidad de vegetación, las partes altas están constituidas principalmente por bosques de coníferas: pinos, (*Pinus spp.*), pinabetes (*Tamarix petandra Pallas*) y encinos (*Quercus spp.*), no obstante, el mezquite (*Prosopis juliflora Sw. DC.*) es predominante en las zonas bajas, además de huizache (*Acacia farnesiana (L.) Willd.*), yucas (*Yucca spp.*), nopales (*Opuntia spp.*), maguey (*Agave asperrima Jacobi*), entre otras, así como diversas cactáceas (INEGI, 2011).

6.2. Actividad inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano.

La actividad antibacteriana de los compuestos aislados y de los extractos etanólicos derivados de los diferentes propóleos, se determinó mediante un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos siguiendo la metodología indicada por el CLSI. Se ha reportado que el método más conveniente para la evaluación de la actividad antibacteriana de muestras de propóleo es la dilución seriada (Sawaya *et al.*, 2004).

Como control positivo se utilizó digluconato de clorhexidina, que es un excelente agente antimicrobiano de uso tópico, es un compuesto soluble en agua y alcohol, cuyo mecanismo de acción se debe a la interacción de la clorhexidina que es una molécula con carga positiva con las células bacterianas cargadas negativamente resultando en la alteración de la integridad de la membrana celular, causando la filtración de componentes intracelulares de los microorganismos (Wishart, DrugBank Database v5.0.). Caldo BHI se usó como control negativo.

En el Cuadro 8 se resumen los resultados obtenidos de la CMI para las fracciones derivadas del EEP.

Cuadro 8. Resultados de CMI (mg/mL) del ensayo del fraccionamiento primario del EEP.

Fracción / Cepa Bacteriana	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. oralis</i>
Extracto crudo Durango	Sin inhibición	0.024	0.024
FX-I Durango	Sin inhibición	1.537	0.192
FX-II Durango	1.537	0.192	0.096
FX-III Durango	0.768	0.192	0.096
FX-IV Durango	6.150	0.096	0.024
FX-V Durango	Sin inhibición	6.150	Sin inhibición

Se considera que un extracto vegetal es activo si su CMI es menor a 1 mg/mL al utilizarse el método de microdilución en placa (Ríos *et al.*, 1988) y un extracto crudo natural que posee actividad a concentraciones menores a 100 µg/mL pueden presentar un potencial antimicrobiano (Duarte *et al.*, 2003), esta actividad presente en los compuestos polifenólicos se debe a la alteración de la integridad y posterior degradación de la membrana citoplasmática, además de la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014).

Sólo tres fracciones demostraron tener actividad antimicrobiana contra las tres cepas bacterianas utilizadas; sin embargo, la inhibición de *S. mutans* solo se observó con las fracciones FX-II, FX-III, y FX-IV, siendo la de mayor potencia y actividad FX-III. Al observar los resultados se puede concluir que las fracciones FX-I y FX-V, no poseen una actividad antibacteriana destacable, y a excepción de la FX-V todas las fracciones presentaron un efecto antibacteriano potente contra

S. oralis. Además, cabe destacar que para las cepas *S. sanguinis* y *S. oralis*, la fracción FX-IV presentó una menor MIC a comparación de FX-II y FX-III, indicando mayor potencia, y a juzgar por la información presentada anteriormente se puede concluir que posee un gran potencial antibacteriano. También, es importante recalcar que el EEP crudo de Durango mostró la menor CMI contra las cepas de *S. sanguinis* y *S. oralis* muy probablemente debido al mayor contenido de compuestos flavonoides presentes por tratarse del extracto inicial, mientras que otras fracciones mostraron una disminución en la potencia antibacteriana probablemente como resultado del procesamiento por los métodos de purificación utilizados. Sin embargo, todas las fracciones estudiadas presentaron una cierta actividad antibacteriana, destacando la FX-III entre las demás, por lo cuál se decidió continuar su estudio químico.

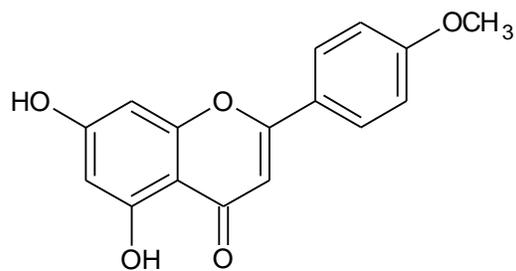
Un estudio químico previo de la fracción FX-II, de la misma muestra obtenida del estado de Durango, permitió el aislamiento de tres compuestos. Los compuestos C001, C002 y C003 fueron identificados como los flavonoides pinocembrina, pinobanksina y crisina, respectivamente. La FX-III a pesar de no presentar una concentración relativamente alta de pinocembrina en comparación con la fracción FX-II que se había estudiado en el trabajo de tesis anteriormente mencionado y en el que se concluyó que la pinocembrina posee actividad antimicrobiana al inhibir las GTF de *S. mutans*, presentó una actividad antibacteriana similar, muy probablemente debido al efecto sinérgico de varios componentes con actividad antibacteriana, cabe destacar que otros compuestos que no fueron completamente identificados pudieron haber contribuido al efecto bactericida, por lo que son necesarios estudios adicionales para determinar nuevos componentes y la actividad que presentan. No obstante, estos resultados concuerdan con las afirmaciones realizadas que indican que diferentes combinaciones de compuestos son esenciales para la actividad biológica del propóleo (Bankova, 2005).

Cabe destacar que la incidencia de resultados de actividad biológica similares en fracciones distintas, no significa necesariamente la existencia de una composición química similar, ya que en muestras de propóleo de diferente procedencia, es

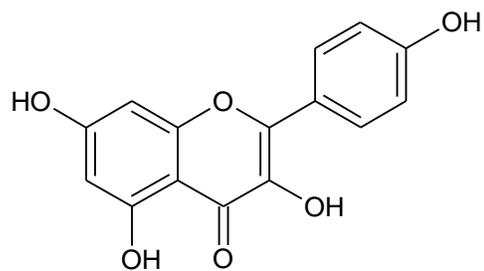
posible la existencia de distintas combinaciones de compuestos potencialmente responsables de una actividad biológica particular. Con el fin de encontrar una correlación estadísticamente significativa entre la actividad biológica (actividad antibacteriana) y la procedencia de muestras de propóleo de tres regiones, Europa, Brasil y Centroamérica, se han realizado análisis estadísticos (ANOVA), los resultados obtenidos de este estudio indican que los propóleos de Europa y Brasil presentan una actividad similar y mayor al de Centroamérica a pesar de la enorme diferencia en su composición química (Popova *et al.*, 2004). Esta evidencia prueba reiteradamente que en distintas muestras, diferentes combinaciones de compuestos son esenciales para la actividad biológica del propóleo (Bankova, 2005).

6.3. Caracterización estructural de metabolitos aislados.

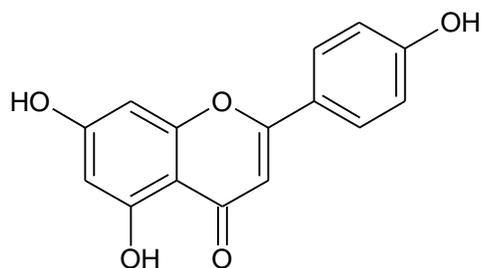
El estudio químico de la FX-III del EEP de Durango permitió el aislamiento de tres compuestos de tipo flavonoide (**C010316**, **C060316** y **C070316**, Figura 6). La elucidación estructural permitió identificar a los compuestos C010316, C060316 y C070316 como la acacetina (**a**) (Valencia *et al.*, 2012), el kaempferol (**b**) (Bankova, 2005) y la apigenina (Falçao *et al.*, 2010) (**c**). La caracterización estructural de los compuestos aislados se realizó utilizando RMN-¹H, en las Figuras 7, 8 y 9 se muestran los espectros de RMN. En el Cuadro 9, se resumen las constantes de RMN-¹H de los compuestos **C010316**, **C060316** y **C070316**, respectivamente



a) Acacetina



b) Kaempferol



c) Apigenina

Figura 6. Compuestos aislados del propóleo de la Comarca Lagunera (Gómez Palacio), Durango.

A manera de ejemplo se describirá a continuación la elucidación estructural del compuesto C010316, identificado como acacetina, cuya fórmula estructural se estableció como C₁₆H₁₂O₅ con base en el espectro de RMN-¹H, presentado a continuación en la Figura 7.

En este espectro las características más importantes se observan en la región aromática, en donde se aprecia un sistema A₂B₂ [δ_H 7.97 (2H, d, $J= 8.0$ Hz, H-2a y H-6a), 7.05 (2H, d, $J= 8.0$ Hz, H-3a y H-5a)] y dos singuletes anchos en δ_H 6.45 (1H, s, H-8) y 6.16 (1H, s, H-6). Estas señales son asignables a los anillos B y A del compuesto, respectivamente. Además, en δ_H 6.81 se aprecia un singulete correspondiente a H-3 del anillo C. Por último, en δ_H 3.82 se observa un singulete asignable a un grupo metoxilo en el carbono C-4a.

En el Cuadro 9 se resumen los desplazamientos químicos de RMN-¹H de la acacetina (a), kaempferol (b) y apigenina (c).

Cuadro 9. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H de los compuestos aislados, acacetina (a), kaempferol (b) y apigenina (c).

(MeOH-d₆, 400MHz)			
¹H	Acacetina (a)	Kaempferol (b)	Apigenina (c)
	δ (J Hz)		
1	-	-	-
2	-	-	-
3	6.81 (1H, s)	-	6.58 (1H, s)
4	-	-	-
5	-	-	-
6	6.16 (1H, s)	6.19 (1H, s)	6.19 (1H, s)
7	-	-	-
8	6.45 (1H, s)	6.39 (1H, s)	6.44 (1H, s)
9	-	-	-
10	-	-	-
1a	-	-	-
2a, 6a	7.97 (2H, d, $J= 8.0$ Hz)	7.98 (2H, d)	7.85 (2H, d)
3a, 5a	7.05 (2H, d, $J= 8.0$ Hz)	6.92 (2H, d)	6.93 (2H, d)
4a	-	-	-
-OCH ₃	3.82 (3H, s)	-	-
-5-OH	12.89 (1H, s)	-	-
-7-OH	10.75 (1H, s)	-	-

6.3.1 Figuras de los espectros RMN-¹H de los compuestos aislados.

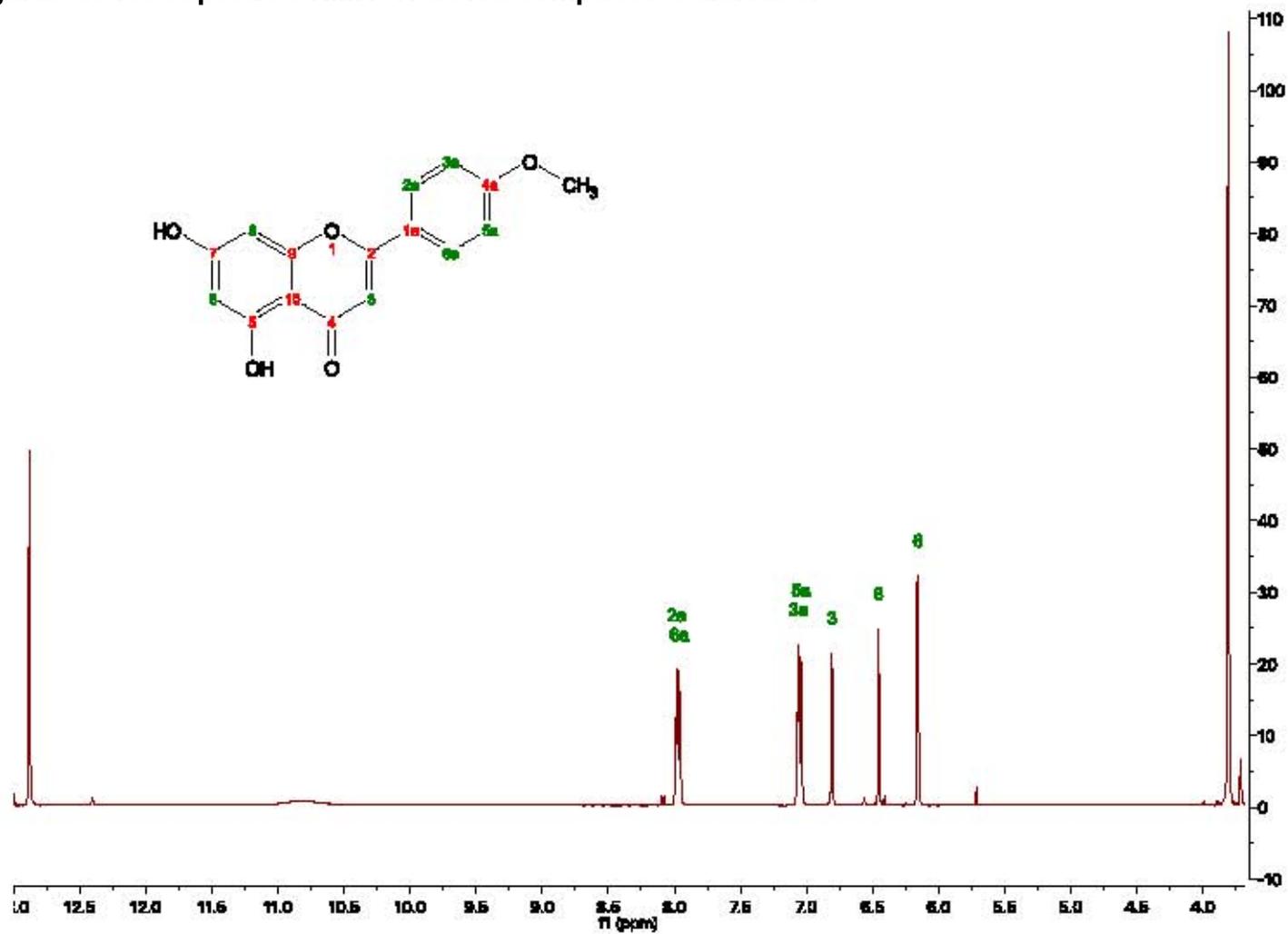


Figura 7. Espectro de RMN-¹H del compuesto acacetina (a).

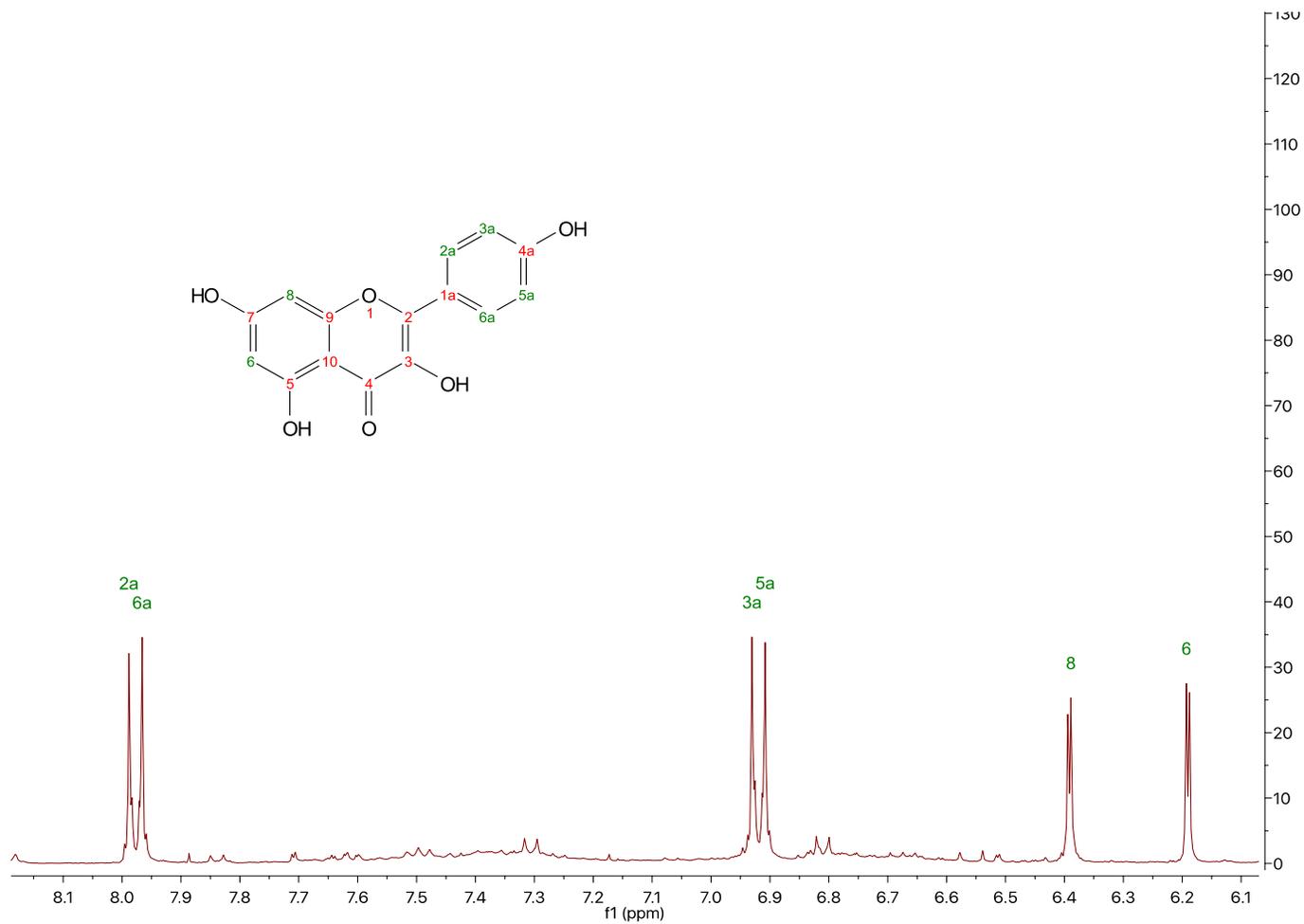


Figura 8. Espectro de RMN-¹H del compuesto kaempferol (b).

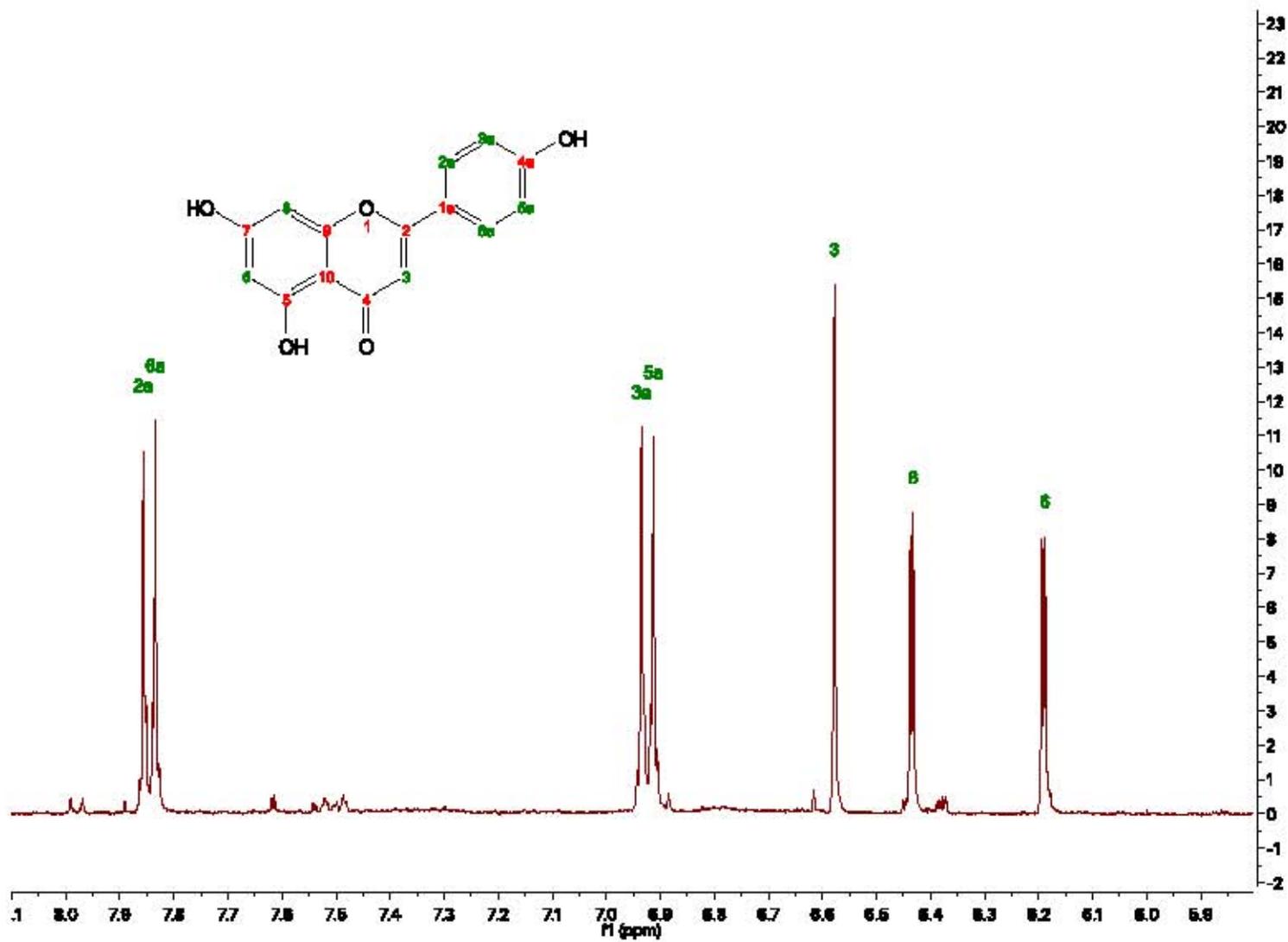


Figura 9. Espectro de RMN-¹H del compuesto apigenina (c).

6.4. Propiedades biológicas de los compuestos aislados.

6.4.1. Propiedades biológicas de la acacetina.

Estudios previos han reportado que la acacetina o 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona presenta efectos antiinflamatorios, antiperoxidativos y antiplasmodiales (Kraft *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2005, 2006; Yin *et al.*, 2008).

Además, se ha demostrado que tiene una actividad antiproliferativa contra células cancerígenas de hígado, próstata, pulmón, estómago, de glándulas mamarias y colon (Hsu *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Shim *et al.*, 2007). Por lo que ha resultado de gran interés para el estudio de su mecanismo de acción, en ensayos *in vivo*, y para su aplicación potencial en la prevención de ciertos tipos de cáncer y desarrollo de metástasis ya que el tratamiento quimiopreventivo eficaz y oportuno tiene un impacto significativo en la reducción de la tasa de incidencia y mortalidad de cáncer (Fong, *et al.*, 2010; Szliszka, *et al.*, 2009).

6.4.2. Propiedades biológicas del kaempferol.

El kaempferol es uno de los compuestos de tipo flavonoide de origen natural más estudiados y con una amplia variedad de actividades farmacológicas, incluyendo antioxidante (Bankova, 2005), antimicrobiana, anticancerígena, antidiabética, ansiolítica, analgésica y antialérgica (del Valle *et al.*, 2016; Calderón *et al.*, 2011), además se ha encontrado que inhibe la activación plaquetaria y la trombosis (Choi *et al.*, 2015).

Sin embargo, una de sus propiedades más estudiadas es su actividad antiinflamatoria, ya que actúa como inhibidor de la función celular inflamatoria y como modulador en la expresión de las enzimas pro-inflamatorias, destacando su potencial uso para el tratamiento de la inflamación crónica, condición que esta

directamente relacionada con una variedad de padecimientos, incluyendo cáncer, alergias, artritis, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Devi *et al.*, 2015).

Por esta razón, se han realizado numerosos estudios que han demostrado el efecto benéfico del kaempferol en diferentes padecimientos relacionados con la inflamación como cáncer al actuar como modulador en pasos importantes de la transducción de rutas de señalización celular ligadas a la apoptosis, angiogénesis inflamación y metástasis (Chen A. *et al.*, 2013), así como en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Devi *et al.*, 2015).

6.4.3. Propiedades biológicas de la apigenina.

Estudios han demostrado que la apigenina presenta una potente actividad antiviral contra el virus de Chikungunya (CHIKV), pudiendo ser utilizado como un potencial agente terapéutico contra infecciones por CHIKV. Estudios han comprobado que flavonoides con una estructura de 5,7-dihydroxiflavona como la apigenina, crisina, silbina y naringenina inhiben la replicación de rinovirus, picornavirus, CHIKV, VIH y enterovirus-71 (Saravana *et al.*, 2015).

Otras investigaciones demostraron numerosas actividades farmacológicas de la apigenina, que incluyen actividad antidepresiva (Li *et al.*, 2015) antiespasmódica, antiteratogénica, antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatoria y puede mejorar alteraciones del metabolismo de la glucosa y lípidos, al reducir significativamente los niveles de glucosa en sangre, lípidos en suero, malonaldehído, ICAM-1 y el índice de resistencia a la insulina, además de incrementar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y mejorar la intolerancia a la glucosa (Ren *et al.*, 2016). Cabe destacar que la evaluación de la actividad antibacteriana de la apigenina es relativamente reducida, sin embargo existen estudios que demuestran su actividad contra cepas de *S. aureus* y contra bacterias resistentes a la quinolona (Morimoto *et al.*, 2015).

Por otra parte, se ha reportado que en diferentes modelos tumorales la apigenina previene el cáncer de colon y próstata y es un potente inhibidor de la carcinogénesis de piel inducida por luz U.V. o algunos agentes químicos cocarcinógenos. Se propone que los efectos antitumorales que presenta pueden ser mediados debido a su habilidad para modular la diferenciación terminal, la expresión de la enzima COX-2, la proliferación celular y/o la apoptosis (Kiraly *et al.*, 2016). Además, se ha encontrado que la apigenina reduce significativamente la gravedad de la pancreatitis aguda recurrente, presentando un uso potencial como agente terapéutico para paciente con riesgo de pancreatitis crónica (Mrazek *et al.*, 2015).

7. CONCLUSIONES.

El estudio químico y biológico de la muestra de propóleo recolectada en la zona melífera de la Comarca Lagunera (Gómez Palacio) en el estado de Durango permitió el aislamiento de la acacetina, kaempferol y apigenina como componentes mayoritarios.

La presencia de pinocembrina en la muestra recolectada que fue evidenciada en un trabajo de tesis realizado previamente, permite clasificar a la muestra de propóleo de Durango dentro de los propóleos de la clase I, contrastando con el resultado obtenido para otros propóleos de la misma zona melífera que no contienen pinocembrina (Salatino *et al.*, 2011).

La actividad antibacteriana del EEP de la fracción FX-III de propóleo de Durango muy probablemente se debió al efecto sinérgico de varios componentes con actividad antibacteriana, cabe destacar que otros compuestos que no fueron completamente identificados pudieron haber contribuido al efecto bactericida, por lo que son necesarios estudios adicionales para determinar nuevos componentes.

De los flavonoides encontrados en la FX-III se ha reportado que la acacetina y la apigenina presentan una actividad anticancerígena, además la apigenina ha demostrado tener una considerable actividad antiviral contra ciertos virus, mientras que el kaempferol presenta una actividad antibacteriana potencial.

Estudios comparativos son invaluable para la estandarización del propóleo y el establecimiento de un patrón quimiogeográfico.

8. PERSPECTIVAS.

Actualmente, el uso de medicina herbolaria es habitual como tratamiento alternativo para diferentes padecimientos en la población, en este caso el propóleo presenta una amplia variedad de actividades biológicas que tienen una aplicación muy relevante como antiinflamatorio, tratamiento preventivo de cáncer, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, antibacteriano, antioxidante, etc. Por esta razón es de vital importancia continuar la investigación de este producto natural con el fin de conocer ampliamente sus propiedades y composición para encontrar nuevos usos, o bien comprender el mecanismo por el cuál actúan para lograr las actividades biológicas mencionadas.

Como perspectivas de este trabajo se plantea la caracterización química de diferentes muestras representativas mediante el fraccionamiento, el aislamiento y la identificación de los compuestos biológicamente activos, para la identificación de variedades químicas características de la misma zona geográfica con la finalidad de conocer el patrón de los metabolitos contenidos en cada una de ellas y eventualmente poder elaborar un patrón quimiogeográfico de los propóleos del norte de México, de este modo se pretende facilitar la determinación y la comparación de la composición química entre propóleos en estudio en la misma región o bien de diferentes zonas.

9. REFERENCIAS.

Aliyazıcıoğlu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E., Kolaylı, S. (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 16(2), 277-287.

All natural. (2007). *Nature Chemical Biology*, 3(7), 351.

Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M. (1994). Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*, 64, 235–240.

Andrich, G., Fiorentini, R., Consiglieri, A. (1987). Characteristics of some samples of propolis from the Ligurian Coast. *Citta delle api*, 28, 30-38.

Aso, K., Kanno, S. I., Tadano, T., Satoh, S., Ishikawa, M. (2004). Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 727-730.

Ataç-Uzel, K., Özant-Önçağ. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research*, 160, 189-195.

Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research, *eCAM*, 2, 29-32.

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

Bankova, V., Popov, S., Marekov, N. (1983). A study on flavonoids of propolis. *Journal of Natural Products*, 46(4), 471–474.

Banksota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A., Kadota, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 239–246.

Bestwick, C. S., Milne, L., Duthie, S. J. (2007). Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations. *Chemico-Biological Interactions*, 170, 76–85.

Blonska, M., Bronikowska, J., Pietsz, G., Czuba, Z. P., Scheller, S., Krol, W. (2004). Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 25-30.

Bonomi, A., Marletto, F., Bianchi, M. (1976). Use of propolis in the food of laying hens, *Revista di Avicoltura*, 45(4), 43-55

Bruschi, M. L., Franco, S. L., Gremião, M. P. (2003). Application of an HPLC method for analysis of propolis extract, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26, 2399-2409.

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

Calderón-Montaña, J. M., Burgos-Morón, E., Pérez- Guerrero, C., López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid Kaempferol. *Medicinal Chemistry*, 11, 298-344.

Chen, A. Y., Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138, 2099-2107.

Chen, J., Li, W., Yao, H, Xu, J. (2015). Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia*, 103, 231-241.

Chen, J., Long, Y., Han, M., Wang, T., Chen, Q., Wang, R. (2008). Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Journal of Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90, 441-446.

Cheng, Y., Wang, Y., Wang, X. (2006). A causal relationship discovery-based approach to identifying active components of herbal medicine. *Computational Biology and Chemistry*, 30, 148-154.

Choi, J. H., Park, S. E., Kim, S. J., Kim, S. (2015). Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie*, 115, 177-186.

Cragg, G. M., Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830: 3670-3695.

Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., Fernandez, M. C., Hernandez, I. M., Rosado, A., Rastrelli, L. (2007). Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7502–7509.

Darwish, R., Fares, R., Zarga, M., Nazer, I. (2010). Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(36), 5966-5974.

Del Valle, P., García-Armesto, M., Arriaga, D., González-Donquiles, C., Rodríguez-Fernández, P., Rúa, J. (2015). Antimicrobial activity of kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. *Food Control*, 61, 213-220.

Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. ,M., Daglia, M. (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*, 99, 1-10.

Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Journal Metabolites*, 2, 303-336.

Duarte, S., Koo, H., Bowen, W. H., Hayacibara, M. F., Cury, J. A., Ikegaki, M., Rosalen, P. L. (2003). Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(4), 527—531.

Dunne, W. M., (2012). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155-166.

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

Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45, 21-43.

Ferreira, C. J., Pereira, S. U., Benitez, M. L., Mestriner, F. A., Perrella, B. J., Paredes, G. E., Lima, C. C., Picoli, S. K., Lucas, S. E. (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 65, 374-380.

Fong, Y., Kun-Hung Shen, Tai-An Chiang, Yuan-Wei Shih. (2010). Acacetin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expression of human lung cancer cells through inactivation of JNK signaling pathway and reducing binding activities of NF- κ B and AP-1. *Journal of Food Science*, 75, 30-38.

Gardana, C., Scaglianti, M., Pieta, P., Simonetti, P. (2007). Analysis of the polyphenolic fraction of Propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 390-399.

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review, *Bee World*, 60, 59–80.

Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arráez, D., Segura, A., Fernández, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220–1234.

Gómez, R. M., Arráez, R. D., Moreno, T. R., García, S. P., Segura, C. A., Fernández, G. A. (2007). Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 30, 595-603.

- Harvey, A. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 12(19), 894-901.
- Hayacibara, M. F., Koo, H., Rosalen, P. L., Duarte, S., Franco, E. M., Bowen, W. H., Ikegaki, M., Cury, J. A. (2005). *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1–3), 110–115.
- Hegazi, A. G., Abd El Hady, F. K. (2002). Egyptian propolis: 3. antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57, 395-402.
- Hitomi, M. A., Bicudo, A. L. (2008). Validated Method for Quantification of Artepilin-C in Brazilian Propolis. *Phytochemical Analysis*, 19, 179-183.
- Hsu, Y., Kuo, P., Lin, C. (2004). Acacetin inhibits the proliferation of HepG2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 67, 823–829.
- Hsu, Y., Kuo, P., Liu, C., Lin, C. (2004). Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Cancer Letters*, 212, 53–60.
- Hu, F., Hepburn, H. R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S. E., Daya, S. (2005). Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 276–283.
- Huleihel, M., Isanu, V. (2002). Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Israel Medical Association Journal*, 4(11), 923–927.
- Isla, M. I., Nieva, M. M., Sampietro, A. R., Vattuone, M. A. (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 165–170.
- 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, 11571-11577.

- Kartal, M., Yildiz, S., Kaya, S., Kurucu, S., Topcu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 69–73.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.
- Kimoto, T., Aga, M., Hino, K., Koya-Miyata, S., Yamamoto, Y., Micallef, M. J., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M. (2001). Apoptosis of human leukemia cells induced by artemisinic acid, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Research*, 21, 221–228.
- Kiraly, A. J., Soliman, E., Jenkins, A., Van Dross, R. T. (2016). Apigenin inhibits COX-2, PGE₂, and EP1 and also initiates terminal differentiation in the epidermis of tumor bearing mice. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 104, 44-53.
- Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Mavi, S., Bienzle, U., Eich, E. (2003). *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytotherapy Research*, 17, 123–128.
- Krell, R. (1996). Value-Added Products from Beekeeping. *Food and Agriculture Organization of the United Nations: Agricultural Services, Bulletin no. 124, capítulos 5.2, 5.5, 5.6, 5.16.*
- König, B. (1985). Plant sources of propolis. *Bee World*, 66, 136–139.
- Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ambrosano, G. M., Murata, R. M., Yatsuda, R., Ikegaki, M., Alencar, S. M., Park, Y. K. (2000). Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on Mutans Streptococci. *Current Microbiology*, 41, 192–196.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., Bakhrouf, A. (2010). Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe*, 16, 566-571.

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

Kumar, J. S., Mandal, M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, volumen 2009, ID del artículo: 830616, 13 páginas.

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

Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *eCAM*. volume 2013, ID del artículo: 964149, 11 páginas.

Lam, K. S. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, 15(6), 279-289.

Li, F., He, Y., Awale, S., Kadota, S., Tezuka, Y. (2011). Two New Cytotoxic Phenylallylflavanones from Mexican Propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(9), 1194-1996.

Li, R., Zhao, D., Qu, R., Fu, Q., Ma, S. (2015). The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neuroscience Letters*, 594, 17-22.

Maciejewicz, W., Daniewski, M., Bal, K., Markowski, W. (2001). GC-MS identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis. *Chromatographia*, 53, 343–346.

Mahmoud, A. S., Almas, K., Dahlan, A. A. (1999). The effect of propolis on dentinal hypersensitivity and level of satisfaction among patients from a university hospital Riyadh in Saudi Arabia. *Indian Journal of Dental Research*, 10(4), 130–137.

Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83–99.

Marcucci, M. C. (1996). Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química nova*, 19, 529-536.

McLennan, S. V., Bonner, J., Milne, S., Lo, L., Charlton, A., Kurup, S., Jia, J., Yue, D. K., Twigg, S. M. (2008). The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 706–713.

Medic-Saric, M., Jasprica, L., Mornar, A., Smolic-Bubalo, A., Golja, P. (2004). Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in propolis by two-dimensional thin layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 17, 459–463.

Mello, B. C., Cunha, P. J., Dupas, H. M. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96, 533-539.

Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., Calder P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152, 239–246.

Morimoto, Y., Baba T., Sasaki, T., Hiramatsu, K. (2015). Apigenin as an anti-quinolone-resistance antibiotic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46, 666-673.

Mrazek, A. A., Porro, L. J., Bhatia, V., Falzon, M., Spratt, H., Zhou, J., Chao, C., Hellmich, M. R. (2015). Apigenin inhibits pancreatic stellate cell activity in pancreatitis. *Journal of Surgical Research*, 196, 8-16.

Murad, J. M., Calvi, S. A., Soares, A. M., Bankova, V., Sforcin, J. M. (2002). Effects of propolis from Brazil and Bulgaria in fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 331–334.

Niraldo, P., Avaliação. (2005). Da actividade antiinflamatória do extracto padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin C. Tesis de Doctorado, Florianópolis, Universidad Federal de Santa Catarina. Brasil, 137.

Niraldo, P., Lemos, A. S., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V. M., Vollmar, A. M., Scremin, A., Bretz, W. (2008). Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of Pharmacology*, 587, 296-301.

Ochi, T. (1981). A new method to collect propolis. *Honeybee Science*, 2(1), 16.

Ophori, E. A., Eriagbonye, B. N., Ugbodaga, P. (2010). Antimicrobial activity of propolis against *Streptococcus mutans*. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4966-4969.

Orsolich, N., Basic, J. (2003). Immunomodulation of water-soluble derivate of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 84, 265-273.

Paintz, M., Metzner, J. (1979). On the local anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Pharmazie*, 34(12), 839–841.

Pan, M. H., Lai, C. S., Hsu, P. C., Wang, Y. J. (2005). Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 620–630.

Pan, M. H., Lai, C. S., Wang, Y. J., Ho, C. T. (2006). Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1293–1303.

Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A., Ikegaki, M., Cury, J. A., Rosalen, P. L. (1998). Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms, *Current Microbiology*, 36, 24–28.

Patel, J., Ketkar, S., Patil, S., Fearnley, J., Mahadik, K. R., Paradkar, A. R. (2015). Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. *Integrative Medicine Research*, 4, 94–101.

Pereira, A. S., Pinto, A. C., Cardoso, J. N., Neto, R. F., Ramos, F. H., Dellamora-Ortiz, G., Dos Santos, E. (1998). Application of high temperature high resolution gas chromatography to crude extracts of propolis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 21, 396–400.

Popova, M., Bankova, V., Naydensky, C., Tsvetkova, I., Kujungiev, A. (2004). Comparative study of the biological activity of propolis from different geographic origin: a statistical approach, *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 50, 9–14.

Rahman, M. M, Richardson, A., Sofian-Azirun, M. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1872-1878.

Ren, B., Qin, W., Wu, F., Wang, S., Pan, C., Wang, L., Zeng, B., Ma, S., Liang, J. (2016). Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 773, 13-23.

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

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

Santos, V. R., Pimenta, F. J., Aguiar, M. C., do Carmo, M. A., Naves, M. D., Mesquita, R. A. (2005), Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytotherapy Research*, 19(7), 652–654.

Saravana, M. K., Sivasubramanian, S., Vincent, S., Bala, M. S., Giridaran, B., Dinesh, S., Gunasekaran, P., Krishnasamy, K., Sathishkumar, R. (2015). Anti-

chikungunya activity of luteolin and apigenin rich fraction from *Cynodon dactylon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 352-358.

Sawaya, A. C., Souza, K. S., Marcucci, M. C., Cunha, I. B., Shimizu, M. T. (2004). Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 104-109

Scheller, S., Ilewicz, L., Luciak, M., Skrobidurska, D., Stojko, A., Matuga, W. (1978). Biological properties and clinical application of propolis. IX. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on dental pulp regeneration, *Arzneimittel-Forschung*, 28(2), 289–291.

Scheller, S., Krol, W., Swiacik, J., Owczarek, S., Gabrys, J., Shani, J. (1989). Antitumoral property of ethanolic extract of propolis (EEP) in mice-bearing Ehrlich carcinoma. *Zeitschrift für Naturforschung*, 44C, 1063-1065.

Scheller, S., Stojko, A., Szwarnowiecka, I., Tustanowski, J., Obuszko, Z. (1977). Biological properties and clinical application of propolis. VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration. *Arzneimittel-Forschung*, 27(11), 2138–2140.

Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1-14.

Sforcin, J. M., Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253-260.

Sharaf, S., Higazy, A., Hebeish, A. (2013). Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 408-416.

Shim, H. Y., Park, J. H., Paik, H. D., Nah, S. Y., Kim, D. S., Han, Y. S. (2007). Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase

cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. *Molecules and Cells*, 24, 95–104.

Silva, B. B., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ikegaki, M., Souza, V. C., Esteves, A., Alencar S. M. (2007). Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *eCAM*, 5, 313-316.

Singh, R. P., Agrawal, P., Yim, D., Agarwal, C., Agarwal, R. (2005). Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure–activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis*, 26, 845–854.

Sneader, W. (1996). Drug prototypes and their exploitation. *Wiley*, UK.

Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I., Švabić-Vlahović, M. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, 158, 353–357.

Stojko, A., Scheller, S., Szwarnowiecka, I., Tustanowski, J., Ostach, H., Obuszko, Z. (1978). Biological properties and clinical application of propolis. VIII. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on the regeneration of bone tissue. *Arzneimittel-Forschung*, 28(1), 35–37.

Sutta, J., Hanko, J., Janda, J., Tkac, J. (1975). Experimental and clinical experience of the treatment of wounds of domestic animals with a locally applied solution of propolis. *Folia Veterinaria*, 18, 143–147.

Szliszka, E., Czuba, Z. P., Domino, M., Mazur, B., Zydowicz, G., Krol, W. (2009). Ethanol extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules*, 14, 738-754.

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

Tosi, A., Ortega, E., Cazzoli, F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Journal of Food Chemistry*, 104, 1025-1029.

Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J., Salas-Reyes, M., Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645-651.

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

Vynograd, N., Vynograd, I., Sosnowski, Z. (2000). A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7(1), 1–6.

Wagh, V. D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, volume 2013, ID del artículo: 308249, 11 páginas.

Wang, L., Mineshita, S., Ga, I., Shigematsu, T., Matsuno, T. (1993). Antiinflammatory effect of propolis. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 24, 223–224.

Wu, J. J., Shen, C. T., Jong, T. T., Young, C. C., Yang, H. L., Hsu, S. L., Chang, C. J., Shieh, C. J. (2009). Supercritical carbon dioxide anti-solvent process for purification of micronized propolis particulates and associated anti-cancer activity. *Separation and Purification Technology*, 70, 190-198.

Yin, Y., Gong, F. Y., Wu, X. X., Sun, Y., Li, Y. H., Chen, T., Xu, Q. (2008). Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 1–6.

10. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

-Bogdanov S., 2007, Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, Bee Product Science. A través de:

(<http://www.bee-hexagon.net>). Consultado el día 15 de octubre de 2018.

-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; información de especies de árboles. A través de:

(http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/46-legum44m.pdf). Consultado el día 15 de octubre de 2018.

-CONACYT, Agencia Informativa CONACYT. A través de:

(<http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/3646-validan-cientificamente-propiedades-de-productos-apicolas-reportaje>). Consultada el día 15 de octubre de 2018.

-DrugBank, Drug & Drug Target Database: Wishart D., Knox C., Guo A., Shrivastava S., Hassanali M., Stothard P., Chang Z., Woolsey J., *Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration*. Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1; 34 (Database issue): D668-72. A través de:

(<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00878>). Consultado el día 9 de octubre de 2018.

-Higdon, J., Drake, V. J., Delage, B., Crozier, A. Flavonoids. Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, Oregon State University. A través de:

(<http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>).

Consultado el día 9 de octubre de 2018.

-INEGI, Anuario Estadístico de Durango, 2011. A través de:

(<http://www.ciberhabitat.gob.mx/monografias/informacion/dur/territorio/clima.aspx?tema=me&e=10>). Consultado el día 9 de octubre de 2018.

-Quezada, E., José, G., Ayala, R. (2010). Abejas nativas de México. La importancia de su conservación. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 36(247), 8-13. A través de:

(<http://www.cyd.conacyt.gob.mx/247/Articulos/AbejasNativas/AbejasNativas1.html>)
Consultado el día 15 de octubre de 2018.

-SAGARPA. Recursos electrónicos. A través de:

(<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/documents/2015/apicultura/notiabj%202015-1.pdf>).

(<http://www.infoserca.gob.mx/claridades/revistas/199/ca199-3.pdf>).

(<http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/los-productos-de-la-colmena>)

(<http://www.gob.mx/sagarpa/prensa/reafirma-mexico-su-posicion-como-sexto-productor-mundial-de-miel>)

(<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B338.aspx>)

(http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/apicolas.pdf)

Consultados el día 9 de octubre de 2018.