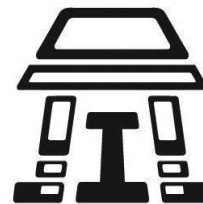




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE UN
PROPÓLEO DE *Apis mellifera* (Tribu Apini)**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
B I Ó L O G O
PRESENTA:**

JORGE LUIS VILLALOBOS EZETA

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Ma. Margarita Canales Martínez**



**LOS REYES IZTACALA, EDO.
DE MÉXICO, 2021**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Campus Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dra. Judith Salas Oropeza

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla

Para la realización de esta Tesis se contó con el Financiamiento:

UNAM-PAPIIT IN205020

DEDICATORIA

A la UNAM por ofrecerme esta oportunidad de estudio, por las instalaciones y el material usado durante mi carrera, todo este conocimiento lo aprovecharé de por vida, gracias por todo lo que pude aprender.

A la Dra. Margarita Canales, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por resolver mis dudas y brindar todo el apoyo y consejos que me sirven de guía para toda la vida, la recordaré con cariño y respeto.

A mis asesores, les doy las gracias por haberme guiado en este camino, por el tiempo y la dedicación que me ofrecieron para terminar esta tesis, Dr. Marco Aurelio Rodríguez, Dra. Ana Hernández, Mtra. Judith Salas, Mtro. Luis Barbo, mil gracias por este apoyo, los llevo en mi corazón.

A mis compañeros de laboratorio, Yoli, Juan y Uriel, con ustedes aprendí muchas cosas, dentro y fuera de las instalaciones, me dio gusto trabajar junto a ustedes.

A Sara Valenzuela y Raúl Ezeta, abuelos por fin lo logré, sé que donde estén me cuidan y están orgullosos de mi por acabar esta etapa, mi corazón siempre estará con ustedes.

A Juana Álvarez, abuelita Juanita, lo logré, gracias por siempre contar contigo en tus consejos de vida, sé que te hará feliz este paso en mi vida y estarás orgullosa de lo que soy.

A Laura Ezeta y Adalberto Villalobos, les dedico este trabajo ya que sin todo el apoyo que me dieron pude llegar a concretar esto, me siento feliz de ser su hijo.

A Nallely Hernández, gracias amiga por todo tu apoyo por ser el pilar en donde encuentro fortaleza, tu amistad es lo más valioso, me dan ánimos el vernos como profesionistas exitosos en un futuro ya que somos capaces de todo, éxitos!

A Carlos Serrano, mi buen Charly, lo logré, gracias por todos esos momentos que tu amistad me dio para tener buenos recuerdos en esta carrera, que memorias en las prácticas de campo junto a ti y Nalle.

A José Andrés Cantera, mil gracias por tu amistad por tu apoyo en esta etapa de estudios, que orgullo el tenerte como amigo, nos va a ir bien en la vida con nuestros proyectos de eso estoy seguro, ahora nos toca trabajar y esforzarnos por seguir adelante. Lorena Zabala, mil gracias por su sabiduría y por considerarme como un hijo, de todo corazón yo adoro la fortaleza que usted tiene frente a la vida, gracias por su apoyo!

A Jaqueline Villanueva Cruz y Luis Eduardo Beristain Maldonado, mis queridos amigos, les quiero dedicar este espacio para decirles cuánto los aprecio, tantos momentos y pláticas que hemos tenido en la vida y todos los recuerdos que nos faltan por hacer, los amo carnales.

A Héctor Martínez Gregorio, ese mi doc, muchas gracias por todo tu apoyo en mi tesis, sin tu asesoría no sabría decir en donde estaría en este punto, tu amistad y consejos me sirven para mejorar como persona en mi futuro, tu me entiendes como amigo y te lo agradezco, mucho éxito en tu vida.

A la familia Sahagún Gutiérrez, a papá Ramón, mamá Ángeles, Ramoncito y Chuchin, mil gracias por sus consejos y apoyo, ustedes me demostraron que la familia está donde el corazón se siente feliz, ustedes son un gran ejemplo de éxito!

Abuelita Raquel, mil gracias por todos los consejos y palabras de aliento, de verdad usted es un ángel para mi, la llevo con alegría por todos los recuerdos que pasé junto a usted, diosito siempre está en su camino, la quiero un montón!

A tía Julia y Alina, por todas estas memorias que llevo en mi corazón, gracias por su apoyo, por sus enseñanzas y tiempo que pasé con ustedes, les dedico este espacio en agradecimiento, que Dios las cuide mucho.

A Fátima Marlenne Gutiérrez Alcazar, junto a ti paso por grandes momentos, este es uno más, gracias por tu apoyo, tus palabras de aliento, por acompañarme en esta etapa de estudios, esto es solo un paso más junto a ti y lo que nos falta por vivir, te amo!

Índice

Resumen	1
Introducción	3
El Propóleo	3
Uso e historia del propóleo	3
Origen Botánico y perfil palinológico del propóleo del Valle de México.	4
Composición química del propóleo	6
Propiedades antioxidantes del propóleo	9
Propiedades biomédicas del propóleo	10
Antecedentes	11
Justificación	13
Problema	13
Hipótesis	14
Objetivos	14
Objetivo general	14
Objetivos particulares	14
Materiales y Métodos	15
a) Colecta del material	15
Obtención del extracto metanólico	15
b) Pruebas biológicas	15
Actividad antibacteriana	15
- Difusión en agar de Kirby-Baüer	15
- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)	16
c) Pruebas químicas	16
Actividad antioxidante del extracto	16
Fenoles Totales	16
Flavonoides Totales	17
Caracterización química de los extractos	17
Resultados	18
a) Colecta de Material	18
Obtención de los extractos metanólicos	18

b) Pruebas Biológicas	19
Actividad Antibacteriana	19
- Evaluación Cualitativa	19
- Evaluación Cuantitativa	26
c) Pruebas Químicas	30
Capacidad Antioxidante del extracto de propóleo de Cuautitlán Izcalli	30
Composición Química del extracto	31
a) Pruebas Cualitativas	31
b) Cuantificación de fenoles	31
c) Cuantificación de flavonoides totales	33
d) Caracterización Química del extracto de propóleo de <i>A. mellifera</i>	35
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	35
Cromatografía de Gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS)	38
Discusión	42
Conclusiones	47
Apéndices	48
Referencias	70

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Composición promedio de propóleos (Sforcin, 2016).	7
Cuadro 2. Composición de compuestos activos de propóleo (Fernández, 2008).	7
Cuadro 3. Actividad antibacteriana del extracto de propóleo de <i>A. mellifera</i> .	20
Cuadro 4. Sensibilidad de los antibiogramas sobre las cepas bacterianas (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>E. coli</i> respectivamente).	26
Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).	27
Cuadro 6. Resultados de Pruebas Colorimétricas.	31
Cuadro 7. Espectro de UV.	36
Cuadro 8. Compuestos volátiles en el extracto metanólico.	40

Índice de Figuras

Figura 1. Extracto metanólico del propóleo de <i>A. mellifera</i>	18
Figura 2. Extracto metanólico de propóleo de <i>A. mellifera</i>	18
Figura 3. Concentrado de extracto metanólico de <i>A. mellifera</i> con un rendimiento de 36.49 g	19
Figura 4. Halos de Inhibición Bacteriana del extracto del propóleo de <i>A. mellifera</i> .	21
Figura 5. Actividad antibacteriana del extracto de propóleo	22
Figura 6. Comparación cualitativa del extracto sobre bacterias por tipo bacteriano.	23
Figura 7. Halos de inhibición del extracto de propóleo de <i>A. mellifera</i> sobre cepas bacterianas Gram Positivas (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> respectivamente)	24
Figura 8. Halos de inhibición del extracto de propóleo de <i>A. mellifera</i> sobre cepas bacterianas Gram Negativas (<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>E. coli</i> respectivamente).	24
Figura 9. Halos de inhibición del control positivo sobre las cepas bacterianas (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>E. coli</i> respectivamente).	25
Figura 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto metanólico de propóleo sobre <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> y <i>P. aeruginosa</i> respectivamente.	28
Figura 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto metanólico de propóleo sobre <i>K. oxytoca</i> y <i>E. coli</i> respectivamente.	29
Figura 12. Capacidad Antioxidante del extracto metanólico del propóleo por método DPPH.	30
Figura 13. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales con estándar de ácido gálico.	32
Figura 14. Tubos con las concentraciones seriadas de la curva patrón de ácido gálico.	32
Figura 15. Curva patrón para el cálculo de flavonoides totales.	33
Figura 16. Curva patrón de Quercetina.	34
Figura 17. Muestras problema en placa ELISA (cuantificación de flavonoides totales).	34
Figura 18. Cromatograma HPLC-DAD del extracto metanólico de propóleo de Cuautitlán.	35
Figura 19. Cromatograma de la GC-MS del extracto metanólico de <i>A. mellifera</i> .	39
Figura 20. Mapa del municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.	48
Figura 21. Propóleo de Cuautitlán en greña	50
Figura 22. Matraz Erlenmeyer con propóleo y metanol.	51
Figura 23. Destilación del extracto metanólico.	51
Figura 24. Capacidad Antioxidante del extracto	59
Figura 25. Cuantificación de Fenoles Totales	62

Índice de Apéndices

Apéndice 1. Zona de Colecta	48
Apéndice 2. Técnica de maceración	50
Apéndice 3. Método de difusión en agar Kirby-Baüer	52
Apéndice 4. Microtécnica de dilución en caldo	54
Apéndice 5. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)	56
Apéndice 6. Conteo de fenoles totales (CFT) (Método modificado de Singleton et al., 1999)	60
Apéndice 7. Contenido de flavonoides totales Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)	63
Apéndice 8. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	66
Apéndice 9. Cromatografía líquida acoplada a arreglo de diodos (HPLC-DAD)	68

Resumen

El propóleo es un producto apícola que se compone de resinas, ceras, aceites esenciales, ácidos grasos, polen entre otros elementos.

Tiene una variedad de propiedades biomédicas usos en distintas industrias como la alimenticia, la dermatológica como antiséptico, desinfectante, antiinflamatorio, antihelmíntico y antifúngico.

Las bacterias presentan una alta capacidad adaptativa al medio donde se desarrollan, lo que les permite ajustarse a condiciones adversas y garantizar su sobrevivencia, esta resistencia antibiótica se define como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en presencia de un compuesto tóxico (antibiótico o antiséptico), permitiendo que éstas se multipliquen en presencia del fármaco.

Por la anterior razón, el presente estudio tuvo como objetivo general determinar la actividad antibacteriana de una muestra de propóleo obtenida de la región de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

La actividad antibacteriana de este propóleo fue evaluada cualitativamente, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración Bactericida Mínima (CBM) por la microtécnica de dilución en caldo, se determinó la actividad antioxidante por el método de DPPH, se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides totales, se determinó la composición química mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Se probó su efectividad antibacteriana del extracto metanólico de propóleo de *A. mellifera* sobre cepas Gram positivas y Gram negativas, siendo *Staphylococcus aureus* CDBB-1044 la más sensible.

La Capacidad Antioxidante media (CA_{50}) mostrada en el ensayo de reducción de DPPH fue de 165 $\mu\text{g/mL}$, la cantidad de compuestos fenólicos de 62.8 mg (e AG/g) y 8.62 mg/mL (e Q/g) de flavonoides. La caracterización química del

extracto metanólico de propóleo se realizó por cromatografía líquida con arreglo de diodos (HPLC-DAD) y el compuesto detectado fue naringina y una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) detectó los compuestos galangina, crisina y pinocebrina en mayor abundancia.

El extracto metanólico de propóleo de Cuautitlán Izcalli presenta una mayor actividad antibacteriana en bacterias Gram positivas que en Gram negativas, el compuesto con mayor abundancia fue galangina, el extracto tiene una capacidad antioxidante, ligada a la concentración de sus compuestos bioactivos.

Palabras clave: Propóleo, *Apis mellifera*, capacidad antioxidante, actividad antibacteriana.

Introducción

El Propóleo

El origen etimológico viene del griego «προπλεως» (propoleōs), forma genitivo de «προπολις» (propolis); y significa en “defensa de la ciudad (o colmena)”, Geopropolis es el equivalente del propóleos de abeja melífera, producido por himenópteros (Hymenoptera: Meliponinae) (Peña, 2008).

La Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 define al propóleo como nombre genérico que se da a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas, de la especie *Apis mellifera*, de la vegetación circundante al apiario, es de aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante (NOM-003, 2017). El propóleo es una sustancia altamente adhesiva, usada por las abejas para sellar los agujeros, fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores y proteger la entrada contra los intrusos, difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recolecta, mucha de la investigación se ha realizado con muestras de propóleos alrededor del mundo, en Latinoamérica encabeza Brasil, México y Argentina (Kumazawa et al., 2003).

Uso e historia del propóleo

El uso del propóleo para fines curativos no es reciente, existe evidencia histórica que data del año 300 a. C. sobre el uso de los propóleos con fines medicinales, en el antiguo Egipto lo utilizaban para embalsamar a sus momias (Russo et al., 2004) y en Grecia se conocían sus propiedades antisépticas y cicatrizantes, Hipócrates en el año 460-377 a. C. lo administró para el tratamiento de úlceras en piel y por ello lo utilizaban para combatir numerosas enfermedades, y Aristóteles en el año 384-322 a. C. para el tratamiento de abscesos y heridas (Fernández, 2008). En Roma también fue muy importante en su mitología cuando señala que el dios Júpiter transformó a la bella Melisa en una abeja para que pudiera producir una

sustancia curativa: el propóleo. Aparece citado en el Corán y se tiene constancia de que los incas utilizaban este para tratar estados febriles (Bermello, 2010). Se tienen registros en el México prehispánico del uso de la miel y el propóleo para distintos malestares como curaciones, caspa, dolor de garganta, tos, quemaduras de piel, hipo y dolor en articulaciones (Nárez, 1988).

Origen Botánico y perfil palinológico del propóleo del Valle de México.

El origen botánico de algunos propóleos se ha determinado mediante el análisis polínico y por comparación de fracciones epidérmicas de plantas de referencia con secciones aisladas de propóleos. Con el advenimiento de los métodos instrumentales de análisis, se han podido determinar más de 300 principios activos según su origen biogeográfico en zonas templadas y tropicales del mundo (Urushisaki et al., 2011). A diferencia de las anteriores, en ambientes tropicales las abejas acuden a otras fuentes para suplir las necesidades de sostenimiento de las colonias y buscar resinas y exudados de las plantas para la elaboración de sus propóleos, en consecuencia, se presentan importantes diferencias en su composición química, la cual depende de la flora local (Silva-Carvalho et al., 2015).

La flora apícola de mayor interés involucra una serie de especies propias que se pueden clasificar según las zonas de vida y los pisos térmicos, como lo indican varios trabajos de identificación taxonómica y palinológica de plantas visitadas por las abejas en áreas andinas y páramos (García et al., 2011). Los propóleos de tonalidades rojizas de Cuba y México se han relacionado con especies del género *Clusia* (*C. grandiflora*, *C. lanceolata*, *C. paralicola*, *C. parviflora* y *C. espisanctensis*) (Corbellini et al., 2017).

La gran diversidad de condiciones ecológicas tiene como reflejo, la existencia de numerosas comunidades vegetales dentro del Valle de México, sus caracteres más sobresalientes de los principales tipos de vegetación descritos por Rzedowski y Rzedowski (2005) son:

- Bosque de Abies: Su distribución se concentra en las serranías de la mitad meridional del Valle, en altitudes entre 2700 y 3500 m. La especie dominante y exclusiva en el estrato superior es *Abies religiosa*; de otros árboles a veces presentes pueden mencionarse: *Alnus jorullensis*, *Cupressus lusitanica*, *Quercus laurina*, *Salix paradoxa*, *Pseudotsuga macrolepis*, *Garrya laurifolia*, *Prunus serotina* spp. *capuli*. Los más comunes en estratos inferiores son: *Symphoricarpos microphyllus*, *Eupatorium glabratum*, *Senecio angulifolius*, *S. platanifolius*, *S. barba-johannis*, *S. sanguisorbae*, *Acaena elongata*, *Brachypodium mexicanum*, *Sigesbeckia jorullensis*, *Alchemilla procumbens*, *Salvia elegans*, *Thuidium delicatulum*.
- Bosque Mesófilo de Montaña: En las laderas abruptas y fondos de algunas cañadas del Iztaccíhuatl y de la Sierra de las Cruces se encuentra este tipo de vegetación, se le observa entre 2500 y 2800 m de altitud y las especies dominantes son *Clethra mexicana*, *Cornus disciflora*, *Garrya laurifolia*, *Ilex tolucana*, *Meliosma dentata*, *Prunus prionophylla* y *Quercus laurina*.
- Bosque de *Quercus*: Prosperan en altitudes entre 2350 y 3100 m y los árboles dominantes son *Q. laeta*, *Q. deserticola*, *Q. crassipes* y *Q. obtusata*.
- Bosque de *Juniperus*: Ocupa extensiones grandes sobre laderas de cerros en altitudes entre 2450 y 2800 m. La especie dominante es *Juniperus deppeana*, tienen entre sí mucho espacio libre que favorece la presencia de arbustos y plantas herbáceas heliófilas como *Agave inaequidens*, *Quercus microphylla*, *Gymnosperma glutinosum*, *Brickellia veronicifolia*, *Eupatorium espinosarum*, *E. scorodonioides*, *Stevia salicifolia*.
- Matorral de *Quercus*: Esta es una comunidad arbustiva baja dominada por *Quercus frutex*, en altitudes entre 2350 y 3100 m, de las pocas especies que conviven con *Q. frutex* pueden mencionarse *Dasyllirion acrotriche*, *Nolina parviflora*, *Painteria leptophylla*, *Rhus standleyi*.
- Pastizales: Domina *Hilaria cenchroides*, en laderas de pendientes moderadas de lomeríos y cerros entre 2300 y 2700 m de altitud, Las especies que acompañan a la dominante son: *Abildgaardia mexicana*, *Bouteloua radicata*, *B. hirsuta* y *Stevia serrata*.

Para la zona de estudio en Cuautitlán Izcalli las especies de plantas dominantes son *Eucalyptus globulus* Labill., *Ricinus communis* L. y *Callistemon citrinus* conocidas como Eucalipto, Higuera y Cepillo o Escobillón rojo respectivamente (Rodríguez et al., 2020).

Composición química del propóleo

Los compuestos activos del propóleo incluyen carbohidratos, minerales, terpenoides, polifenoles, vitaminas, aminoácidos, entre otros componentes activos que dependen de la ubicación geográfica y taxa de la abeja (Gao et al., 2018). El propóleo por composición contiene 30% de ceras, 50% de resinas viscosas y otros materiales orgánicos, polen 5% y un 20% de aceites esenciales. Sus componentes bioactivos pueden ser tanto como 70%, del cual 58% son polifenoles, y 20% flavonoides (Sforcin, 2016) (Cuadro 1, 2).

Los flavonoides son conocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti mutagénicas, anti carcinogénicas y recientemente se han hecho estudios que han comprobado la capacidad que tienen para modular la función enzimática como la xantina oxidasa (XO) y la ciclooxigenasa (COX), además ha despertado interés su uso para reducir enfermedades cardiovasculares, estas moléculas consisten en estructuras fenólicas de 15 carbonos con dos anillos bencénicos A y B, que se conectan de un anillo de pireno el cual contiene un átomo de oxígeno (Panche et. al., 2016). En la actualidad se conocen alrededor de 6000 flavonoides diferentes, entre diferentes subgrupos que incluyen las chalconas, las flavonas, flavonoles e isoflavonas, en conjunto tienen como función proteger las plantas de los rayos UV, contra sequías, heladas, aportarles coloración y aroma (Seal, 2016).

Un ejemplo se encuentra en el trabajo realizado por Velikova et al. 2000, en el cual se determinó la composición química de propóleos provenientes de Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia en donde se encontró principalmente flavonoides y ésteres de ácidos cafeicos (Ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico) y ácido ferúlico (ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)propil-2-enoico), e indicó que la

fuente principal de estos provenían de los capullos de álamo del género *Aegieros* (Velikova et al., 2000). Otro estudio con muestras de propóleo recolectado en Brasil y analizado por técnicas de cromatografía encontraron que los componentes principales fueron compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos y benzopirenos), diterpenos, triterpenos, aceites esenciales entre otros compuestos en menor concentración (Boudourova-Krasteva et al., 1997).

Cuadro 1. Composición promedio de propóleos (Sforcin, 2016).

COMPOSICIÓN	%
Resinas	45-55
Ceras	7.55-35
Aceites esenciales	5-10
Ácidos grasos	5
Polen	5
Otros compuestos	5

Cuadro 2. Composición de compuestos activos de propóleo (Fernández, 2008).

Grupo Químico	Compuesto
Alcaloides	<ul style="list-style-type: none"> ● 12-Azabicyclo [9.2.2] pentadeca-1(14),11(15)-dien-13-one ● Oreophilin ● 3',4'-Dihydro-2'-(morpholin-4-yl)-5',7'-dinitrospiro[cyclopentane-1,3'-quinazoline]

<p>Ácidos Aromáticos y Ésteres</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Ácido Benzoico ● Ácido Hidroxibenzoico ● Ácido vanílico ● Ácido <i>p</i>-cumárico ● DBP (Dibutilftalato) ● Ácido Ferúlico ● Ácido Isoferúlico ● Ácido Caféico (Ácido(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico) ● Ácido Fenilacético 2-(6-Amino-2,4-dichlorophenoxy)
<p>Ácidos Grasos</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Ácido Palmítico ● Ácido Margárico ● Ácido Oleico ● Ácido Esteárico ● Ácido Esteárico 3-Hidroxi ● Ácido Araquídico (Ácido eicosanoico) ● Ácido Behénico (ácido docosanoico) ● Ácido Nefrosteránico ● 2-Methoxycarbonyl-2-(cis-2'pentenyl)-3-methoxy carbonyl ● Metilciclopentano
<p>Fenilpropanoides</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Osthol (cumarina) ● Pinostrobinchalcone ● 2',4',6'-Trihydroxy chalcone ● 2-(1-(2-Methylcortonyloxy)-1-methylethyl)-8-oxo-1, ● 2-dihydrofurano[2,3-H]2H-chromen ● 3-Methyl-but-2- enoicacid,2,2- dimethyl-8-oxo-3, ● 4-dihydro-2H,8H- pyrano[3,2- g]chromen-3-yl éster

	<ul style="list-style-type: none"> ● Naringenina ● Naringina ● Pinocembrina ● Quercetina ● Galangina
Terpenos	<ul style="list-style-type: none"> ● 2H-Cyclopentacyclooctene,4,5,6,7,8,9-hexahydro-1,2,2, ● 3-tetramethyl ● Germanicol ● Dimethyl-1,3,5,6-tetramethyl-[1,3-(13C2)] bicycle [5.5.0] ● Dodeca-1,3,5,6,8,10-hexaene-9,10-dicarboxylate ● Spiro [benzo[a] cyclopenta [3,4] cyclobuta [1,2-c] cycloheptene

Propiedades antioxidantes del propóleo

Estudios previos utilizando los métodos del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), poder de reducción antioxidante del ión férrico (FRAP), ácido 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolín-6-sulfuro (ABTS⁺) y capacidad absorbente del radical oxígeno (ORAC) han demostrado las capacidades antioxidantes de los propóleos (Andrade et al., 2017). La actividad antioxidante de estos propóleos es similar al butilhidroxitolueno y a la vitamina C (Bonamigo et al., 2017).

Los propóleos tienen entre 30–200 mg (EAG)/g de ácido gálico equivalente a fenoles en peso seco y 30–70 mg (EQ)/g de quercetina equivalentes a flavonoides (Kocot et al., 2018). La actividad del captador de radical libre DPPH en propóleos es del rango de 20–190 µg/mL (Zhang et al., 2017).

Más de trescientos compuestos han sido detectados en los propóleos a la fecha, entre ellos se encuentran compuestos cerosos, resinas, bálsamos, aceites esenciales, aminoácidos y azúcares, con prevalencia de flavonoides y ácidos

cinámicos (Ácido (E)-3-fenil-2-propenoico) (de Castro, 2001), el propóleo se caracteriza por presentar una gran variedad de colores, esto se debe al cambio natural que se lleva a cabo en la flora y la fauna, además del tipo de plantas endémicas de acuerdo al clima de la región (Ahn et. al., 2007). Estudios variados muestran que la composición de los propóleos, están en gran parte influenciados por las especies de abejas, zona geográfica, fuentes de comida, y plantas vasculares que las abejas utilizan, sin embargo, se ha demostrado que los propóleos de distintas partes del mundo, incluyendo Países Bajos, China, Brasil y Perú tienen una actividad antioxidante similar y propiedades depuradoras de radicales libres (Ahangari et al., 2018).

Propiedades biomédicas del propóleo

En las últimas décadas investigadores han atribuido al propóleo propiedades biológicas y farmacológicas como: antimicótico, anticolesterolémico, antiparasitario, anticancerígeno, antitumoral, antiulcerosos, antioxidante, antitóxico, antialérgico, analgésico, anestésico, antituberculoso, antiviral, citostático, desodorante, epitelizante (Chen et al., 2008; Gómez et. al. 2007, Lotti et. al., 2010), recientemente se encontró propiedades antiinflamatorias y antineoplásicas (Meneses, 2005; Valenzuela et. al., 2015). Sin embargo, la propiedad más importante del propóleo es la antimicrobiana, la cual se le atribuye principalmente a los flavonoides (Ruiz, 2020; Nam et. al., 2016).

Dada sus propiedades antimicrobianas, el propóleo ha sido objeto de innumerables estudios donde se ha evaluado el efecto inhibitorio sobre bacterias tales como *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescencia*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. mutans*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Pantoea agglomerans*, *Vibrio cholerae*, entre otros (Carrillo et al., 2011; Londoño et al., 2010; Heon et al., 2008).

El uso indiscriminado de antibióticos ha creado una presión selectiva que se ha reconocido como la base de la emergencia de resistencia adaptativa (Frye, 2013). Cobra importancia a nivel mundial como principal problema en el área de salud pública por su efecto en el control de enfermedades y su impacto en las limitaciones terapéuticas, restringiendo la capacidad de fármacos disponibles (Da Silva, 2016), prolongando estadías de hospitalización, aumentando costos médicos e incluso generando mortalidad (OMS, 2017).

Antecedentes

Rodríguez y colaboradores (2020), evaluaron la actividad antioxidante, propiedades químicas y actividad antimicrobiana en cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, de ocho propóleos distintos de México, registraron baja sensibilidad las cepas Gram negativas como *E. coli* (CMI 15 mg/mL y CMB 30 mg/mL) comparadas con las Gram positivas como *S. aureus* la cual resultó sensible al propóleo del Cuautitlán Izcalli, Estado de México (CMI 0.19 mg/mL y CMB 0.37 mg/mL) (Rodríguez et al., 2020).

Ruiz (2020) analizó la actividad antibacteriana y compuestos químicos de un propóleo de Santiago la Galera, Oaxaca. Encontrando que tiene dicha actividad sobre bacterias Gram positivas y negativas, así como actividad bacteriostática en *S. aureus* y *S. thyphi* (Ruiz, 2020).

Bonvehí y Gutiérrez (2012) reportaron la inhibición (halos de inhibición de 10 a 18 mm) de una cepa Gram-negativa (*Salmonella enterica*) de un extracto etanólico de propóleo de *Apis* en la región norte de España, encontrando que los flavonoides de éstos son un potente agente antibacterial (Bonvehí y Gutiérrez, 2012).

Nam y colaboradores (2016) encontraron efecto inhibitorio de varios propóleos de *Apis* de Corea del Sur contra *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus sanguinis*, teniendo efectos inhibitorios en estas bacterias orales (Nam et al., 2016).

Velázquez y colaboradores (2007) analizaron las propiedades antioxidantes de un propóleo de Sonora, se obtuvo mediante el método de DPPH alta capacidad antioxidante de $(86\% \pm 0.3)$ para el propóleo de Caborca y 255.3 mg equivalentes de pinocembrina-galangina/g de fenoles totales , por lo que las concentraciones del ácido cafeico tienen actividad inhibitoria sobre bacterias Gram-positivas, particularmente sobre *S. aureus* (Velázquez et al., 2007).

Justificación

En décadas recientes, investigadores de distintos países han tenido un interés especial en el propóleo, sobre todo en sus propiedades biológicas y farmacéuticas (Al-Ani et al., 2018) que estos pueden presentar para el control de cepas bacterianas y algunos hongos filamentosos (Boisard et al., 2015).

Las propiedades antimicrobianas del propóleo son atribuidas principalmente, a la presencia de flavonoides como la pinocembrina, galangina y al fenetil éster del ácido caféico (CAPE) ya que son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos (Nam et al., 2016). Estos propóleos ejercen sus propiedades antibacterianas sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y su grado de efectividad depende de la forma de extracción del propóleo, del disolvente empleado, la procedencia geográfica y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos metanólicos los más efectivos (Mavri et al., 2012). Por lo cual este trabajo pretende evaluar la actividad antibacteriana del propóleo de *Apis mellifera* de la región de Cuautitlán, Estado de México.

Problema

Las bacterias presentan una alta capacidad adaptativa al medio donde se desarrollan, lo que les permite ajustarse a condiciones adversas y garantizar su sobrevivencia, esta resistencia a los antibióticos en las últimas décadas ha impulsado a distintos científicos a buscar alternativas viables de distintos compuestos químicos presentes en la naturaleza para un uso como fármacos en la medicina, entre estos destacan los propóleos. Por lo antes mencionado, la pregunta a resolver es ¿el propóleo de Cuautitlán (apiario de la FESC) tendrá actividad antibacteriana?

Hipótesis

El propóleo de la abeja *A. mellifera* contiene distintos componentes activos provenientes del metabolismo secundario de las plantas como flavonoides y se tiene el reporte de que estos compuestos tienen actividad antimicrobiana, entonces el propóleo de Cuautitlán Izcalli mostrará actividad antibacteriana en distintas cepas.

Objetivos

Objetivo general

-Determinar la actividad antibacteriana de un propóleo de *Apis mellifera* de la región de Cuautitlán, Estado de México.

Objetivos particulares

-Determinar el rendimiento del extracto metanólico del propóleo de *Apis mellifera* de la región de Cuautitlán, Estado de México.

-Evaluar la actividad antibacteriana del propóleo por el método de difusión en agar de Kirby-Baüer.

-Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima del propóleo de *A. mellifera* por la microtécnica de dilución en caldo.

-Cuantificar la capacidad antioxidante media (CA_{50}), la concentración de fenoles totales y concentración de flavonoides totales.

-Determinar la composición química del propóleo de *A. mellifera* mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD) y Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Materiales y Métodos

a) Colecta del material

La colecta del propóleo se realizó durante el mes de noviembre de 2019 en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, que se localiza al norte del área metropolitana de la Ciudad de México, específicamente en el apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Apéndice 1).

Obtención del extracto metanólico

Las muestras de propóleo en greña colectadas fueron limpiadas para retirar restos de materia orgánica vegetal, así como restos de abejas u otros insectos. Para la obtención del extracto metanólico se usó el método de maceración (Domínguez, 1973) Fue pesado (144.76 g) y colocado en un matraz con 600 mL de metanol al 70%, para posteriormente obtener el extracto metanólico crudo, se filtró el sobrenadante por papel filtro y se destiló a presión reducida utilizando un rotavapor. El contenido se depositó en charolas de vidrio para la evaporación del metanol restante, para después recuperar el extracto de propóleo y se depositó en un frasco de vidrio de 150 mL cubierto de aluminio y permaneció en refrigeración constante (-3 °C) sin exposición a luz solar (Apéndice 2).

b) Pruebas biológicas

Actividad antibacteriana

- Difusión en agar de Kirby-Baüer

Se realizó mediante la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991), para lo cual, se impregnaron sensidiscos con 2 mg/10 μ L del extracto a probar; como control positivo se usó cloranfenicol (25 μ g/sensidisco).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Apéndice 3).

- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de propóleo de *Apis mellifera* de Cuautitlán Izcalli, se realizó la microtécnica de dilución en caldo. Se preparó un stock con 80 mg del concentrado de propóleo en 2.5 mL de etanol y agua destilada, con un abanico de concentraciones seriadas del extracto disuelto en agua de 40 a 1.25 mg/mL y caldo Müller Hinton. Las cajas se inocularon con 50 μ L de un cultivo bacteriano de las 6 cepas a una concentración de 1×10^5 UFC/mL y se incubaron por 24 horas. Como testigo se empleó caldo Müller-Hinton con microorganismo y un testigo negativo con caldo Müller-Hinton sin el microorganismo. Para detectar la actividad respiratoria del microorganismo, se utilizó una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC) que genera un pigmento rojo (formazán) en presencia del microorganismo. Este procedimiento se realizó de la siguiente manera: 50 μ L de TTC se añadieron a cada pozo inoculado, se mezcló utilizando un agitador de placas y se incubaron a 37 °C por 30 min. Transcurrido este tiempo, se observó la caja de cultivo, donde disminuye drásticamente el color será la CMI (Rodríguez, 2020). Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Apéndice 4).

c) Pruebas químicas

Actividad antioxidante del extracto

Se determinó por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1picrilhidracil (DPPH) (Okusa et al., 2007). Se cuantificó la Concentración Antioxidante Media (CA_{50}), utilizando las concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 μ g/mL. Como control positivo se utilizó quercetina. Como blanco se usaron pozos con 200 μ L de metanol grado HPLC (Apéndice 5).

Fenoles Totales

La Concentración de Fenoles Totales (CFT) se cuantificó por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redox por el método modificado de

Singleton et al., 1999. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico con una solución estándar de 200 µg/mL. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.0250, 0.05 y 0.1 y 0.2 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg eAG/g)(Apéndice 6).

Flavonoides Totales

Se determinó por medio del método de Dowd (Kalita et al., 2013), empleando una solución de AlCl₃ al 2%. Se realizó una curva de quercetina a diferentes concentraciones (1-100 µg/mL). Se determinó la absorbancia a 415 nm y los resultados se expresaron como µg equivalentes de quercetina por gramo de extracto de propóleo de Cuautitlán (µg eQ/g)(Apéndice 7).

Caracterización química de los extractos

La composición química de los extractos se estudió mediante una Cromatografía Líquida de Alta Resolución con arreglo de diodos (HPLC por sus siglas en inglés) y una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS por sus siglas en inglés)(Apéndice 8, 9).

Resultados

a) Colecta de Material

El material se colectó en el municipio de Cuautitlán Izcalli, durante el mes de Noviembre de 2019, en el apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Obtención de los extractos metanólicos

Se colectaron y pesaron 144.76 g de propóleo (peso seco). A partir de esto se calculó el rendimiento del extracto metanólico, el cual fue 36.49 g, obteniendo así un rendimiento de 25.21 %.



Figura 1. Primer extracto metanólico del propóleo de *A. mellifera*.

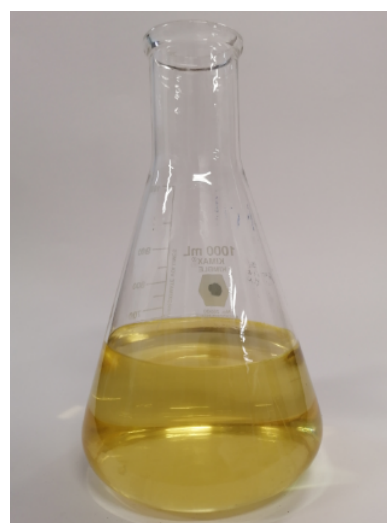


Figura 2. Último extracto metanólico del propóleo de *A. mellifera*



Figura 3. Concentrado de extracto metanólico de *A. mellifera* con un rendimiento de 36.49 g

b) Pruebas Biológicas

Actividad Antibacteriana

- Evaluación Cualitativa

Se obtuvieron los halos de inhibición, del extracto de propóleo de *Apis mellifera* de Cuautitlán Izcalli al interactuar con las distintas cepas bacterianas Gram positivas y Gram Negativas como se muestran en el cuadro 3 y la figura 3.

Cuadro 3. Actividad antibacteriana del extracto de propóleo de *A. mellifera*.

	Cepa Bacteriana	Cloranfenicol (mm)	Extracto metanólico de <i>A. mellifera</i> (mm)
1	<i>Staphylococcus aureus</i> CDBB-1044	24.0 ± 0.66	9.33 ± 0.66
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Caso Clínico	14.0 ± 0.33	8.00 ± 1.00
3	<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	16.00 ± 0.33	5.00 ± 0.00
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B-999	7.00 ± 0.66	5.00 ± 0.00
5	<i>Klebsiella oxytoca</i> CDBB-970	24.00 ± 0.33	5.00 ± 0.00
6	<i>Escherichia coli</i> Caso Clínico	10.00 ± 0.66	5.00 ± 0.00

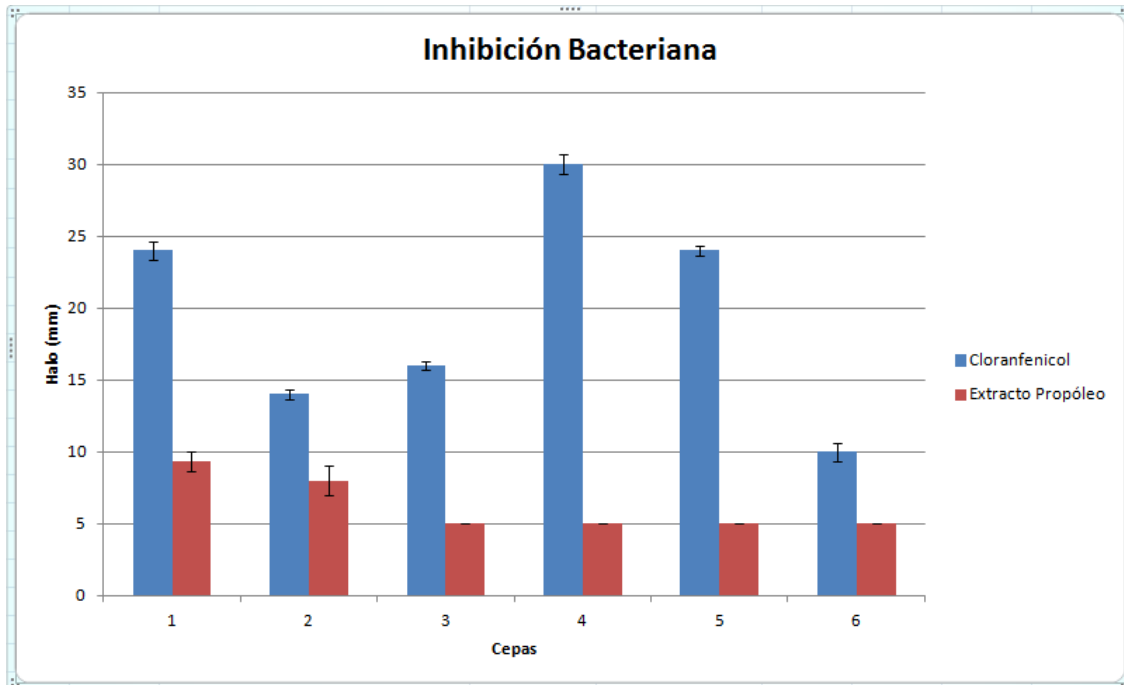


Figura 4. Halos de Inhibición Bacteriana del extracto del propóleo de *A. mellifera*.

Tanto en el Cuadro 3 y la Figura 4 se aprecia que el cloranfenicol obtuvo halos de inhibición de mayor tamaño que el extracto de propóleo. En específico, se observa un mayor halo de inhibición de las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Para ampliar los datos sobre la actividad inhibitoria del extracto, se agruparon las bacterias por tipo, es decir, como Gram Negativas y Gram Positivas, esto para comparar los promedios de estos 2 grupos y observar la actividad inhibitoria del propóleo de *A. mellifera*, se presentan los datos en la figura 5.

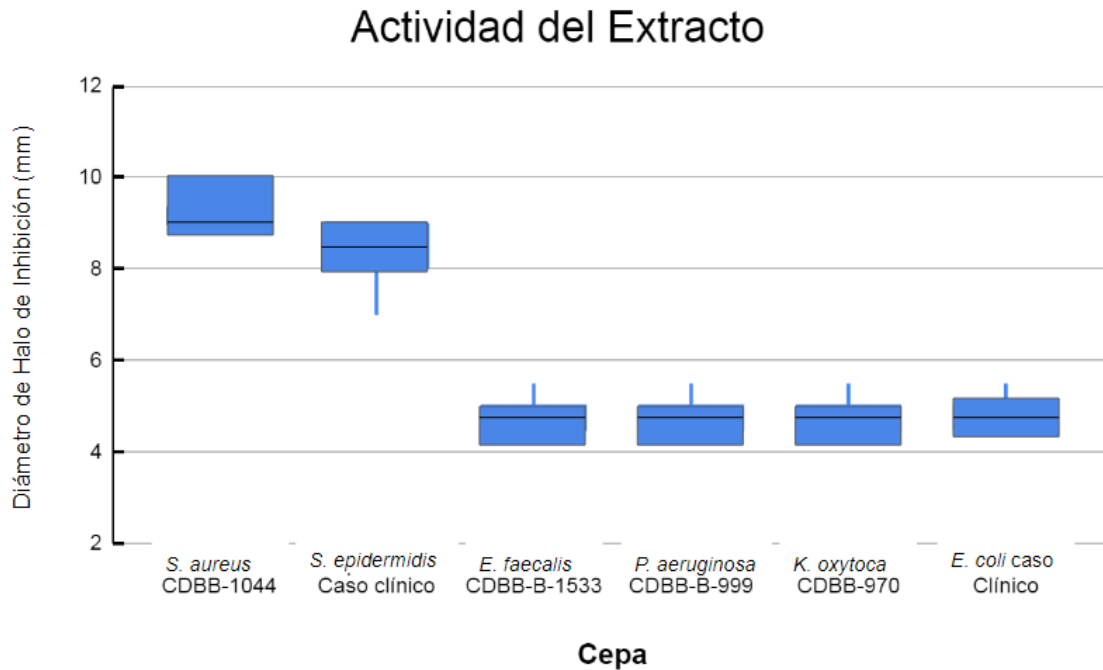


Figura 5. Actividad antibacteriana del extracto de propóleo sobre cada una de las cepas

En la figura 5 se muestran los valores de las medianas, calculadas para cada cepa bacteriana, éstas mostraron valores entre 9.00 mm y 5.00 mm. La cepa que presentó la mediana más alta fue *Staphylococcus aureus* CDBB-1044 con 9.00 mm seguida por *Staphylococcus epidermidis* Caso clínico con 8.5 mm. Por otra parte *Enterococcus faecalis* CDBB-B-1533, *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999, *Klebsiella oxytoca* CDBB-970 y *Escherichia coli* Caso Clínico presentaron 5.00 mm que representa la mediana más baja.

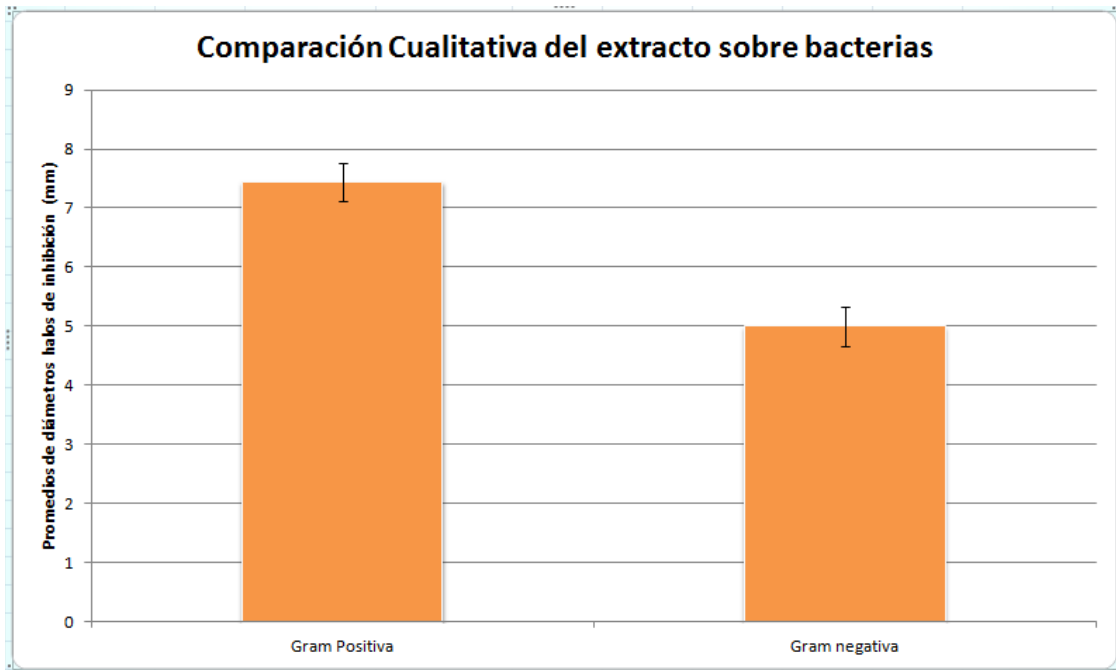


Figura 6. Comparación cualitativa del extracto sobre bacterias por tipo bacteriano.

En la figura 6 se puede apreciar una clara diferencia en la actividad antibacteriana del extracto de *A. mellifera* en promedio de diámetro de halos de inhibición por los grupos de cepas, por parte de las bacterias Gram Positivas en comparación a las Gram Negativas.

A continuación en las figuras 7 y 8 se observan los halos de inhibición del extracto metanólico de propóleo sobre las distintas cepas bacterianas y su control positivo, respectivamente.

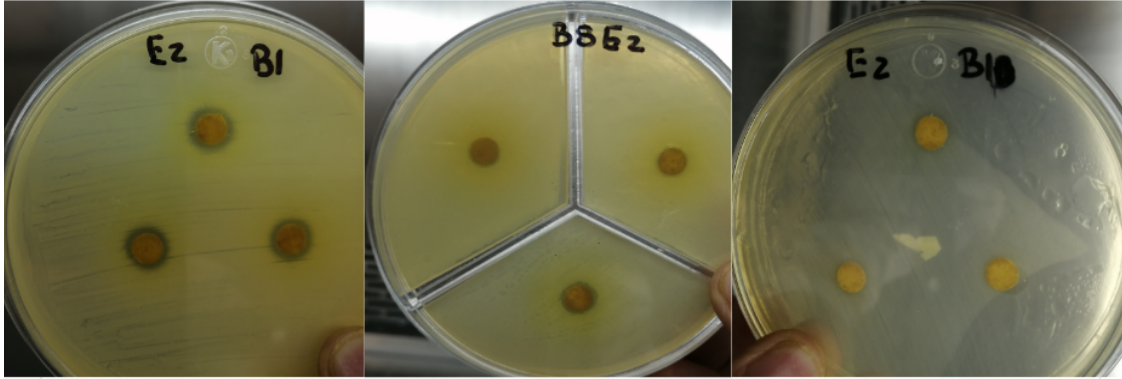


Figura 7. Halos de inhibición del extracto de propóleo de *A. mellifera* sobre cepas bacterianas Gram Positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* respectivamente)

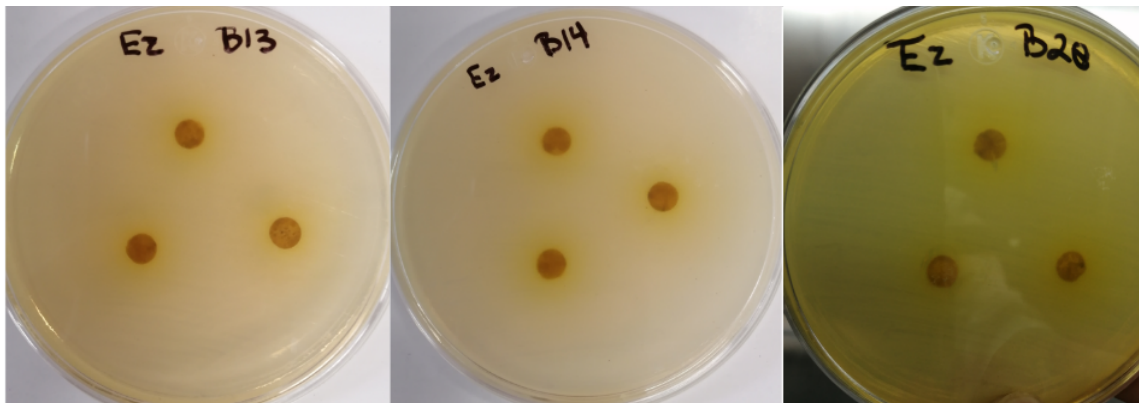


Figura 8. Halos de inhibición del extracto de propóleo de *A. mellifera* sobre cepas bacterianas Gram Negativas (*P. aeruginosa*, *K. oxytoca* y *E. coli* respectivamente).

En el cuadro 4 y figura 9, se muestran los datos de la actividad de los antibiogramas sobre las cepas bacterianas. Se puede observar que estas especies de bacterias son resistentes a diferentes antibióticos.

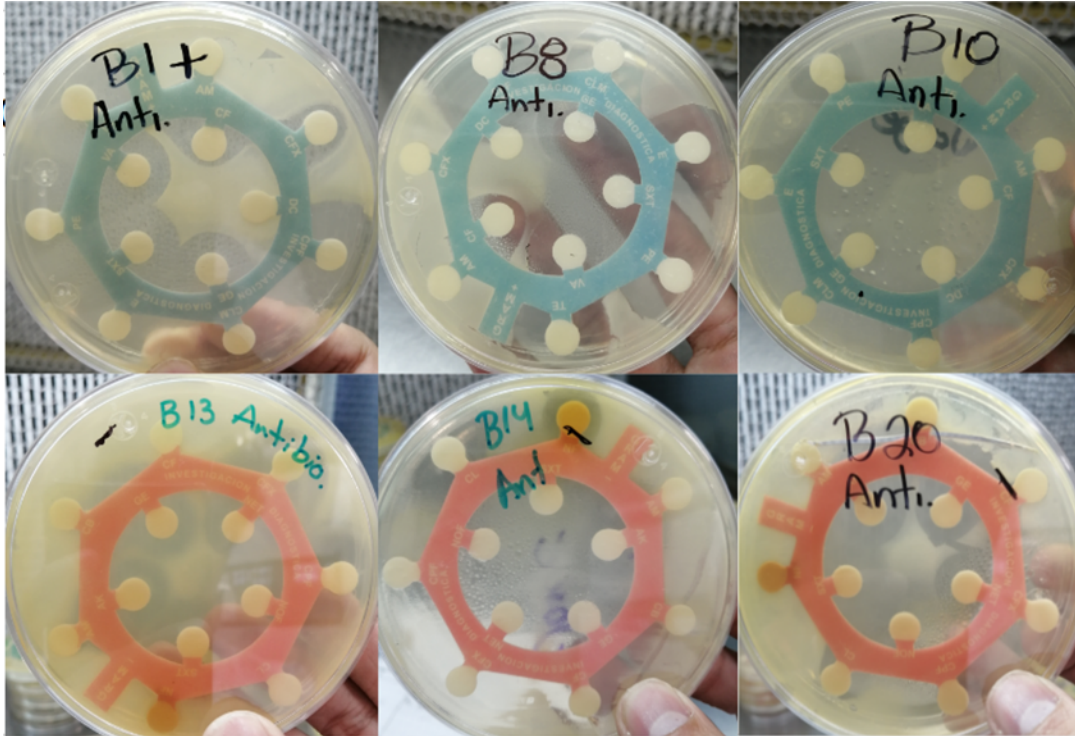


Figura 9. Halos de inhibición del control positivo sobre las cepas bacterianas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca* y *E. coli* respectivamente).

Cuadro 4. Sensibilidad de los antibiogramas sobre las cepas bacterianas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca* y *E. coli* respectivamente).

	Cepa Bacteriana	Halo de Inhibición de Cloranfenicol (mm)	Sensibilidad
1	<i>Staphylococcus aureus</i> CDBB-1044	24.0	S
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Caso Clínico	14.0	S
3	<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	16.0	S
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B-999	7.0	r
5	<i>Klebsiella oxytoca</i> CDBB-970	24.0	S
6	<i>Escherichia coli</i> Caso Clínico	10.0	r

S= sensible; r= resistente

- Evaluación Cuantitativa

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó posterior a la identificación de la actividad antibacteriana del extracto. Los resultados de esta prueba se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Cepa	(CMI) mg/mL	(CBM) mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> CDBB-1044	1.25	2.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Caso Clínico	1.25	2.5
<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	5.0	20.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B-999	10.0	40.0
<i>Klebsiella oxytoca</i> CDBB-970	1.25	2.5
<i>Escherichia coli</i> Caso Clínico	10.0	20.0

En la cepa Gram Positiva de *Staphylococcus epidermidis* Caso Clínico y *Staphylococcus aureus* CDBB-1044 se observó una CMI de 1.25 mg/mL y 2.5 mg/mL de CBM , la cepa Gram Negativa *Klebsiella oxytoca* CDBB-970 con 1.25 mg/mL de CMI y 2.5 mg/mL de CBM respectivamente. Se hace evidente que para las cepas antes mencionadas fue necesaria una concentración menor del extracto de propóleo de Cuautitlán Izcalli para la inhibición bacteriana. En la figura 10 y 11 se muestran la actividad de la CMI y CBM.

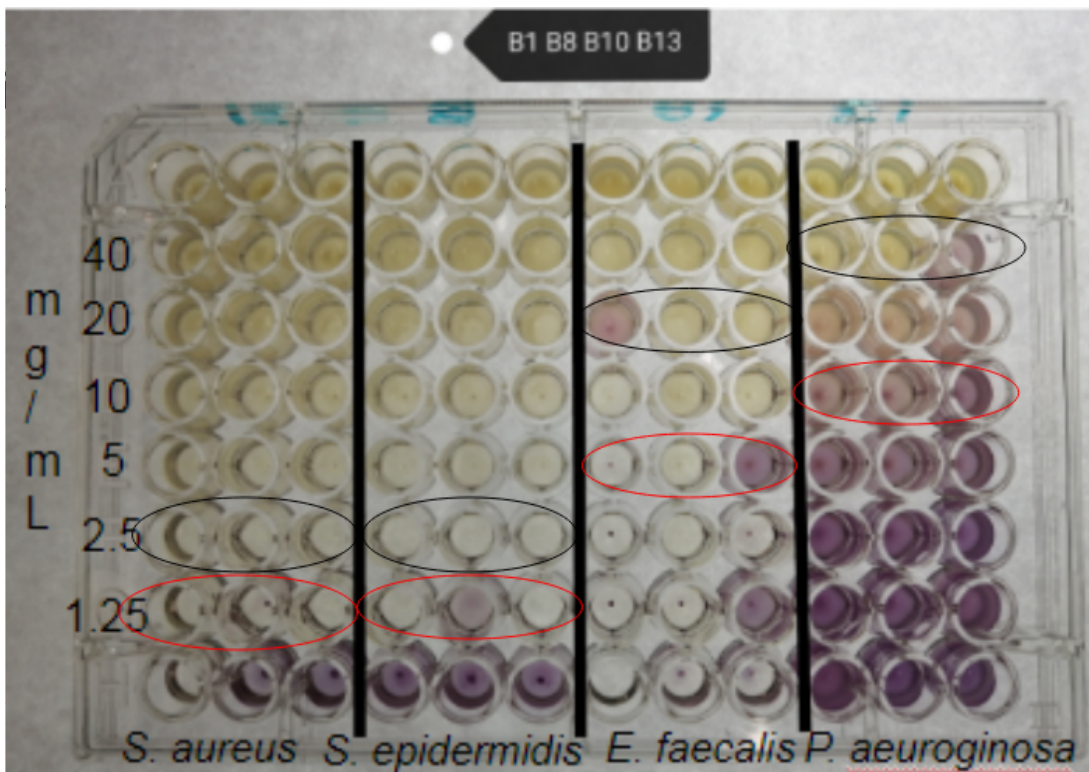


Figura 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto metanólico de propóleo sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa* respectivamente.

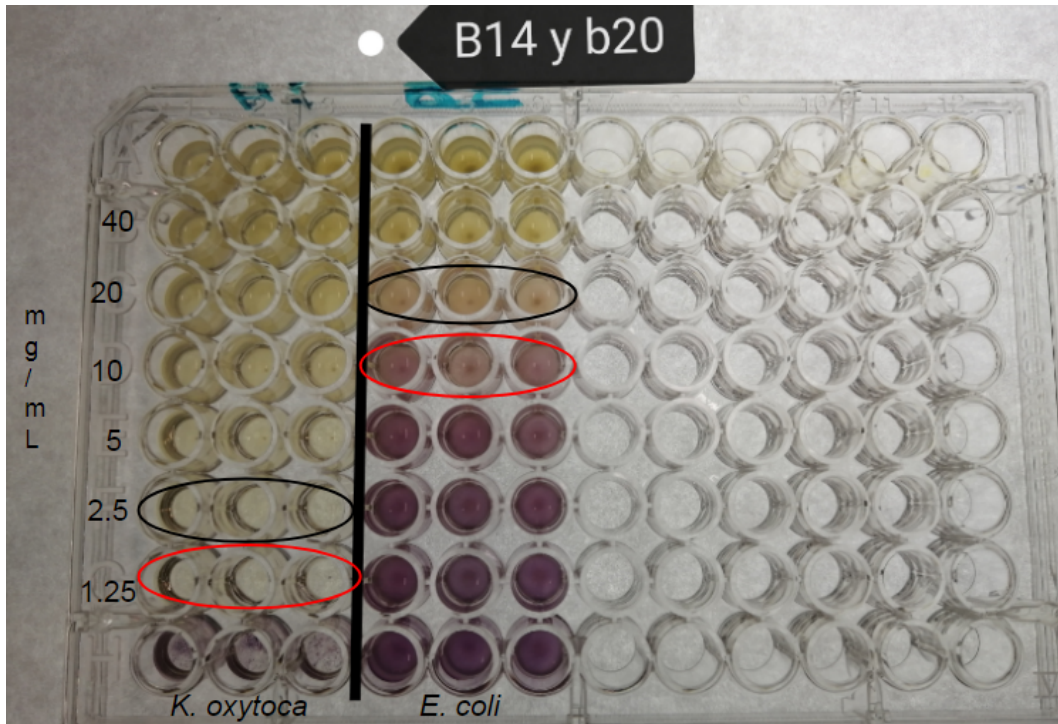


Figura 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto metanólico de propóleo sobre *K. oxytoca* y *E. coli* respectivamente.

c) Pruebas Químicas

Capacidad Antioxidante del extracto de propóleo de Cuautitlán Izcalli

Dadas las propiedades biológicas anteriormente mostradas, se tiene conocimiento de que algunas de ellas están relacionadas con los compuestos antioxidantes del propóleo (Okusa et al., 2007). El extracto metanólico del propóleo presentó una capacidad antioxidante media (CA_{50}) de 165 $\mu\text{g/mL}$ la cual se obtuvo a partir de la reducción en 50% del radical DPPH, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 el parámetro mínimo de antioxidantes es de 100 $\mu\text{g/mL}$. En la figura 12 se muestra el porcentaje de reducción del DDPH.

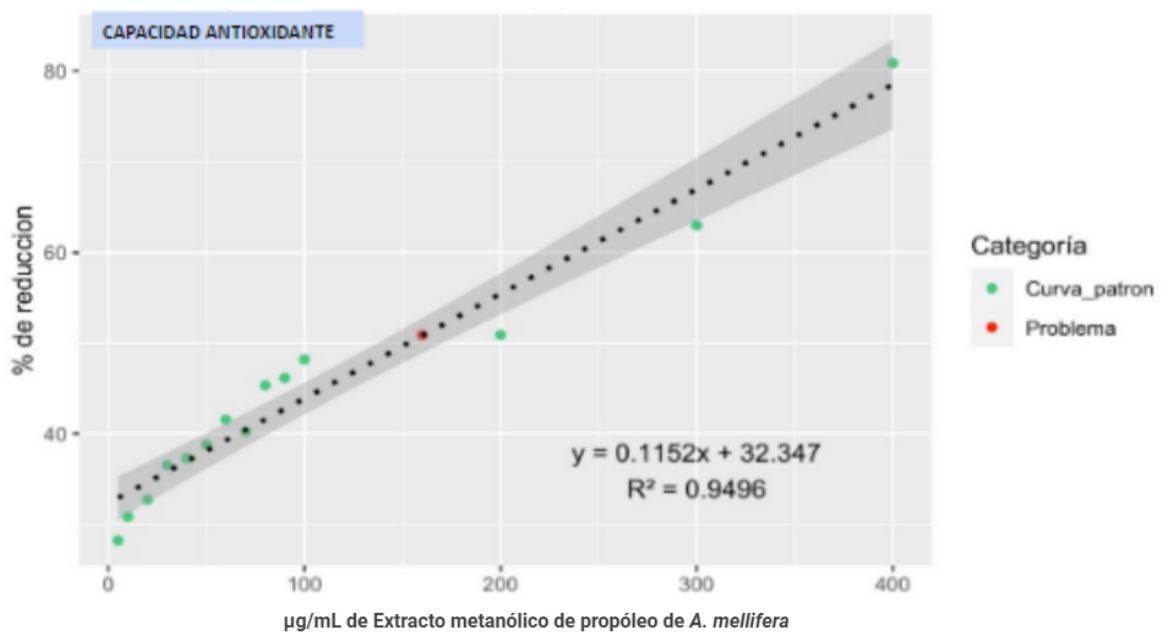


Figura 12. Capacidad Antioxidante del extracto metanólico del propóleo por método DPPH.

Composición Química del extracto

a) Pruebas Cualitativas

Para la identificación de los compuestos presentes en el extracto de propóleo de *A. mellifera* de Cuautitlán Izcalli se procedió a realizar las pruebas cualitativas para la identificación de la presencia de fenoles y flavonoides, los cuales se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados de Pruebas Colorimétricas aplicadas al extracto.

Prueba	Resultado*
Fenoles	++
Flavonoides	+

++:Alta presencia; +:Mediana presencia; -:Ausencia.*

b) Cuantificación de fenoles

Después de haberse identificado la presencia de fenoles y flavonoides, se procedió a la cuantificación de estos compuestos. Por una parte los compuestos fenólicos están correlacionados a la actividad antioxidante anteriormente mostrada, se realizó la prueba de fenoles totales y se empleó un estándar de ácido gálico, se obtuvo 62.8 mg e AG/g (miligramos equivalentes de Ácido Gálico/gramo) para el extracto metanólico de propóleo, los resultados se muestran en la siguiente gráfica correspondiente a las figuras 13 y 14.

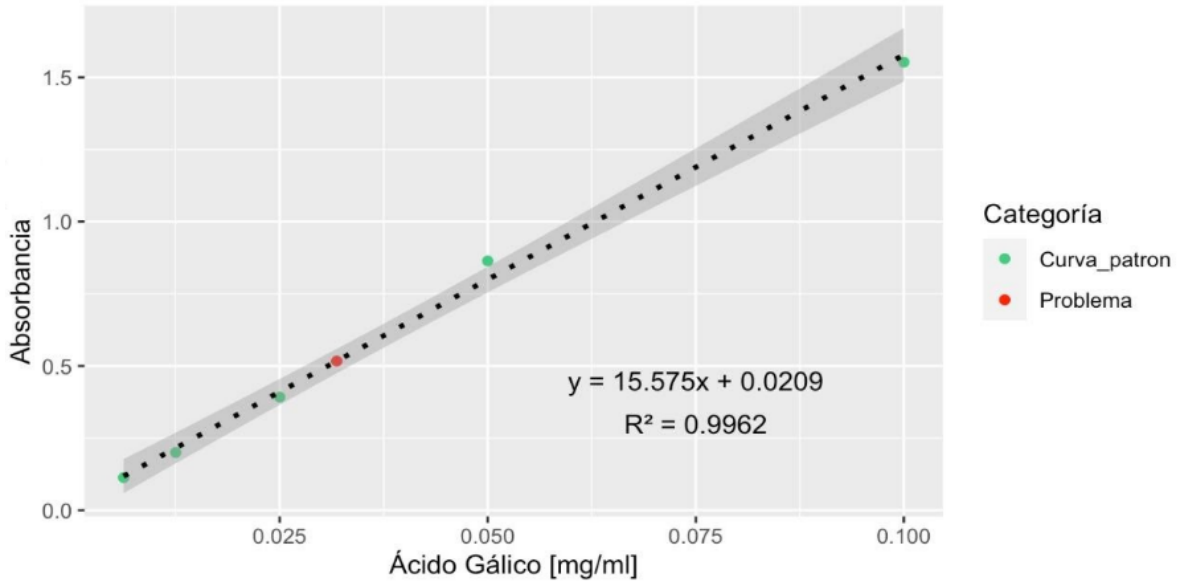


Figura 13. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales con estándar de ácido gálico. Absorbancia medida a 760 nm.

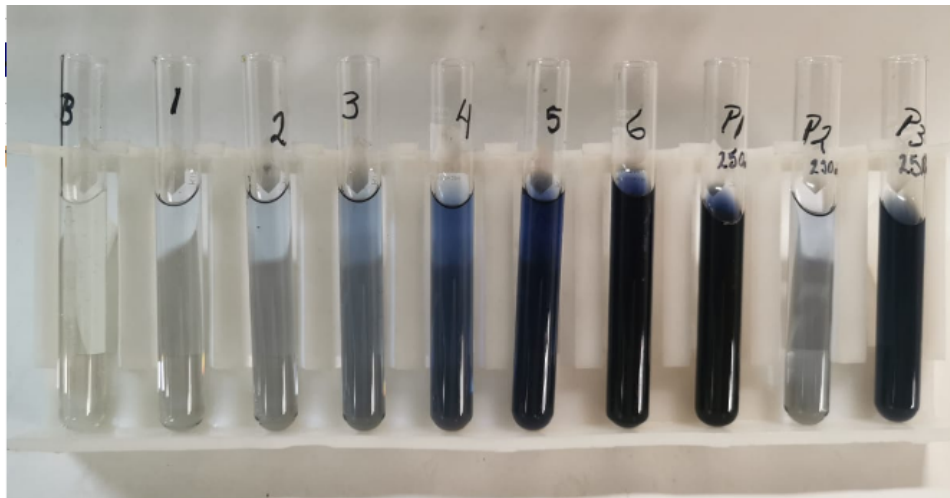


Figura 14. Tubos con las concentraciones seriadas de la curva patrón de ácido gálico (tubos 1 a 6). Los tres últimos tubos son con los problemas, donde P1 corresponde al propóleo de Cuautitlán.

c) Cuantificación de flavonoides totales

Los flavonoides presentan una estructura que les confiere un poder antioxidante, por lo cual, se realizó la prueba por el método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007) utilizando un estándar de Quercetina para la cuantificación total de este grupo, el extracto metanólico de propóleo presentó una concentración de 8.42 mg(e Q)/g (miligramos equivalentes de Quercetina/gramo), los resultados se pueden apreciar en la siguiente gráfica perteneciente a la figuras 15 a 17.

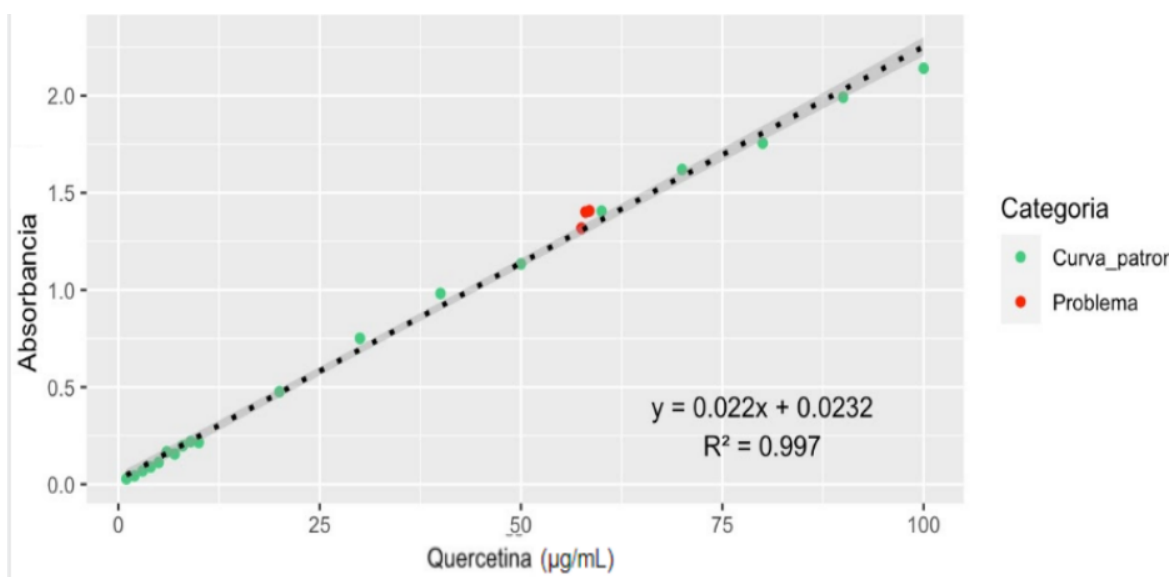


Figura 15. Curva patrón para el cálculo de flavonoides totales con estándar de Quercetina

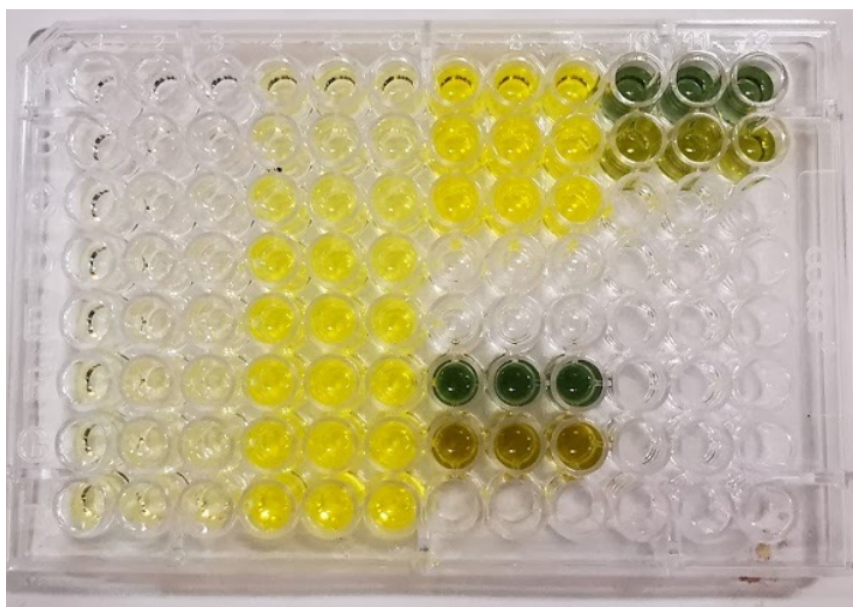


Figura 16. Quercetina en placa ELISA para cuantificación de flavonoides totales

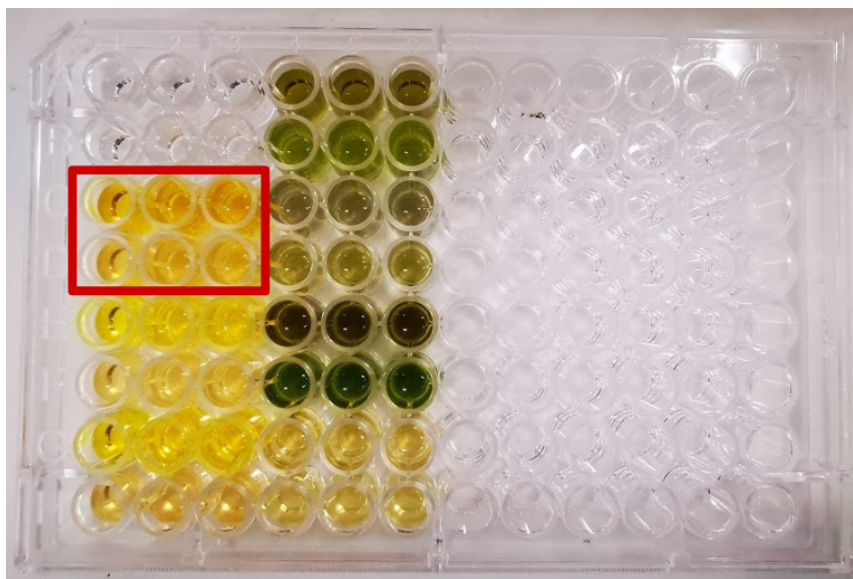


Figura 17. Muestras problema (resaltadas en el cuadro rojo) en placa ELISA para cuantificación de flavonoides totales

d) Caracterización Química del extracto de propóleo de *A. mellifera*

Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)

De acuerdo con los resultados obtenidos del cromatograma (Figura 18), con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, el extracto presentó los siguientes compuestos que se pueden observar en el cuadro 7.

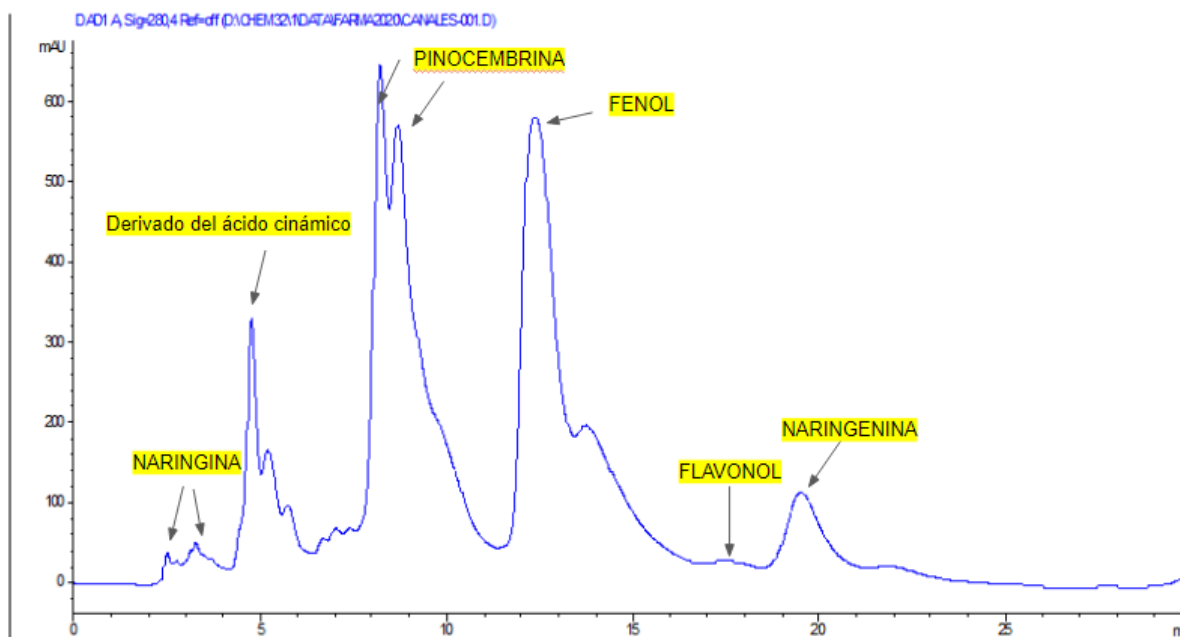
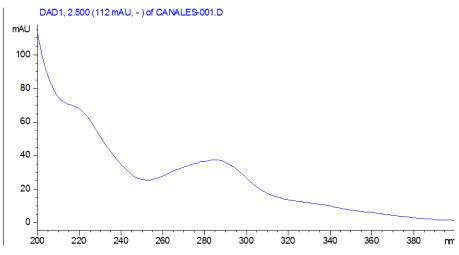
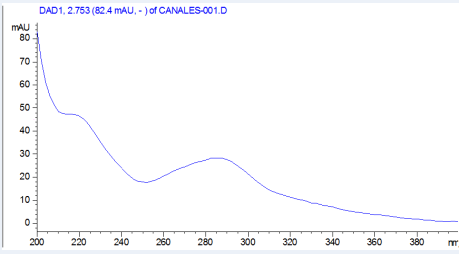
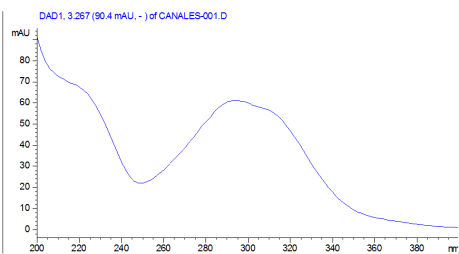
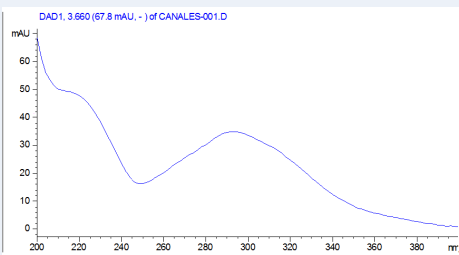
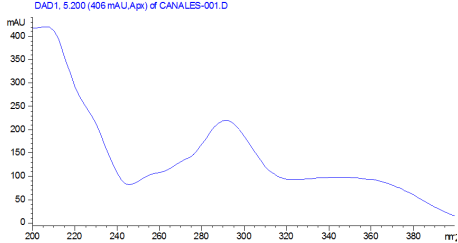
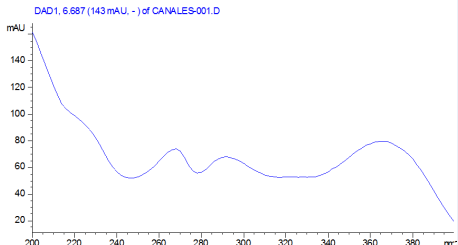
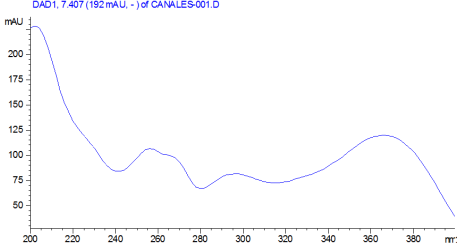
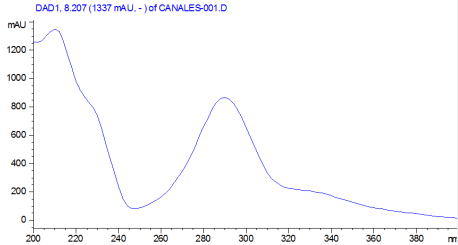
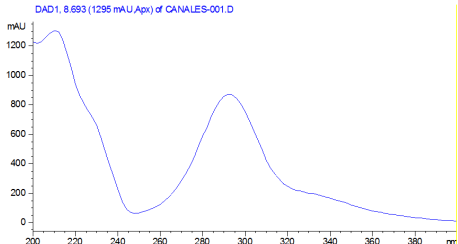
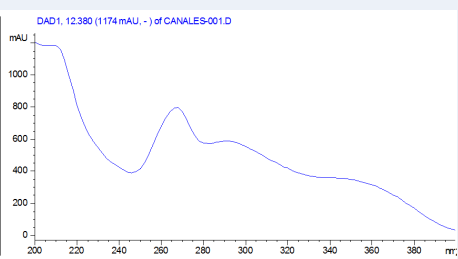
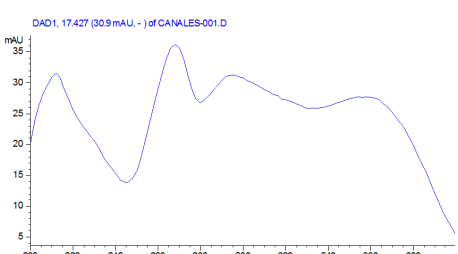
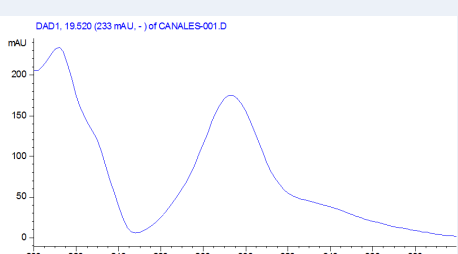


Figura 18. Cromatograma HPLC-DAD del extracto metanólico de propóleo de Cuautitlán

Cuadro 7. Espectro de UV con los picos máximos de absorción del extracto metanólico de propóleo.

No. Compuesto	Espectro de UV	Tiempo de Retención (min)	λ max (nm)	Compuesto
1	 <p>DAD1, 2.500 (112.4 mAU, -) of CANALES-001.D</p>	2.494	220, 284	Naringina
2	 <p>DAD1, 2.753 (82.4 mAU, -) of CANALES-001.D</p>	2.753	220, 284	Naringina
3	 <p>DAD1, 3.267 (90.4 mAU, -) of CANALES-001.D</p>	3.267	220, 300	Derivado del ácido cinámico
4	 <p>DAD1, 3.660 (67.8 mAU, -) of CANALES-001.D</p>	3.66	220, 294	Derivado del ácido fenólico

5		5.20	208, 290	Flavanona
6		7.02	268, 296, 350	Flavonol
7		7.407	256, 296, 366	Flavonol
8		8.207	210, 290	Pinocembrina
9		8.693	210, 292	Pinocembrina

10		12.38	210, 266	Fenol
11		17.427	212, 268, 296, 362	Flavonol
12		19.52	212, 292	Pinocembrina

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

Siguiendo con los estudios de caracterización química, el propóleo se sometió a un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el siguiente cromatograma (figura 19) y el cuadro 8 muestran los diferentes componentes volátiles del extracto metanólico.

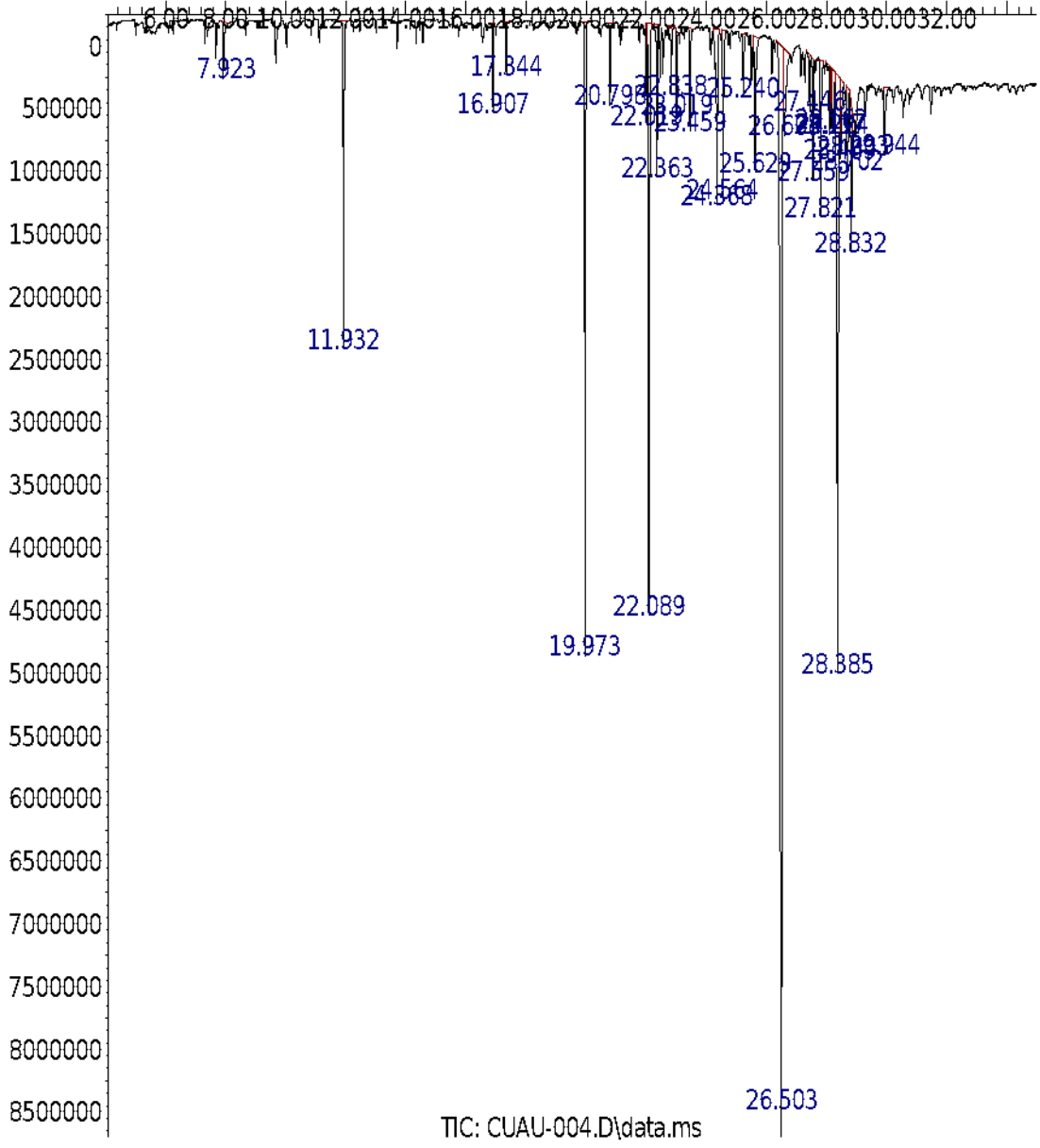
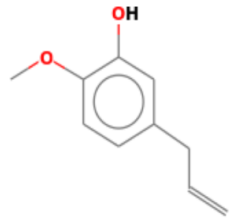
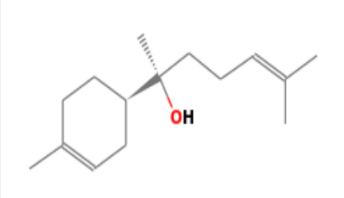
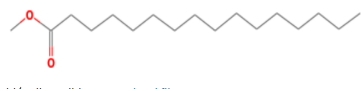
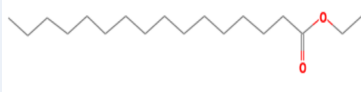

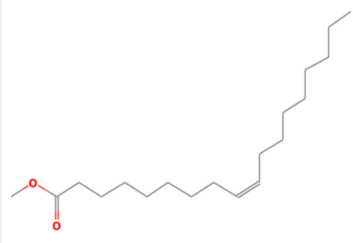

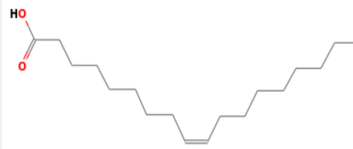

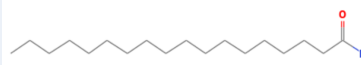
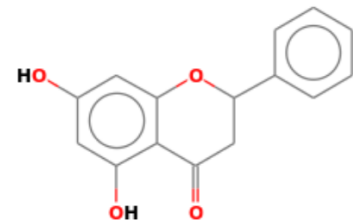
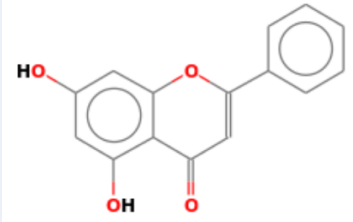
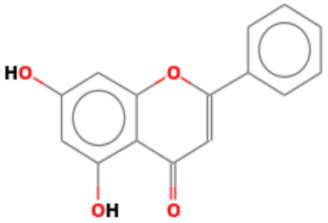


Figura 19. Cromatograma de la GC-MS del extracto metanólico de *A. mellifera*

Cuadro 8. Compuestos volátiles presentes detectados en el extracto metanólico.

No. del Compuesto	Tiempo de Retención	Nombre	% de Abundancia	Estructura Orgánica
1	11.9315	3-Allyl-6-methoxyphenol	3.9703	
2	16.9072	Bisabolol	1.057	
3	19.9731	Ácido Palmítico, metil éster	7.7549	
4	20.7952	Ácido Palmítico, etil éster	0.9109	
5	22.0198	Ácido Linoleico, metil éster	1.1721	

6	22.0883	Ácido Oleico, metil éster	9.327	
7	22.3624	Ácido Octadecanoico, methyl éster	1.9438	
8	22.8377	Ácido Oléico	0.9392	
9	24.5633	Ácido Nonadecanoico	2.2875	
10	25.2356	Octadecanamida	0.9683	
11	26.5073	Galangina	30.2863	
12	28.3871	Crisina	15.7732	

13	28.8282	Pinocembrina	5.665	
----	---------	--------------	-------	---

Discusión

Durante los últimos años el estudio del propóleo ha cobrado una mayor relevancia dentro de la comunidad científica, destacando un gran número de propiedades, entre ellas se encuentran las biológicas-farmacéuticas como por ejemplo (Al-Ani et al., 2018): antibacterianas (Pobiega et al., 2019; Velazquez et al., 2007; Genaro, 2018), relacionadas al sistema inmunitario (Gheisari et al., 2017), antifúngicas (Boisard et al., 2015) y antioxidantes (Palomino-García, 2009; Mavri et al., 2012; Zhang et al., 2017). Algunas de estas propiedades mencionadas han sido relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides. Existen muchos estudios sobre éstos en propóleos de distintas partes del mundo, pero en comparación con los propóleos de *A. mellifera* de México se tiene poco conocimiento de las concentraciones de dichos compuestos y por ende sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas (Quintero-Mora et al., 2008).

En los estudios de últimos años sobre los propóleos, se han encontrado moléculas con actividad antimicrobiana como metabolitos secundarios de plantas como flavonoides, cumarinas, ácidos cafeicos, ácidos cinámicos, quercetina, pinocembrina, terpenos (Pobiega et al., 2019) los cuales son utilizados como mecanismos de defensa contra diversos microorganismos patógenos (Velikova et al., 2000).

Mencionadas las cualidades anteriores se realizó la extracción de los compuestos biológicamente activos del propóleo de *A. mellifera* de Cuautitlán Izcalli, se seleccionó el metanol como solvente para la elaboración del extracto crudo, el cual obtuvo un rendimiento de 25.21%.

La cantidad de ceras presente en el extracto metanólico de propóleo resultó baja, ya que del residuo del propóleo que quedó (una vez obtenido el extracto metanólico) se le realizó una extracción con hexano para determinar la proporción de compuestos no polares, de este extracto hexánico se obtuvieron 16.51 g y corresponde a un rendimiento de 11.41%, esto puede ser posiblemente influenciado por diversos factores, destacando: la época del año en que se recolectó correspondiente a otoño (Silva-Carvalho et al., 2015; García et al., 2011; Londoño et al., 2010), que el propóleo crudo tenga un contenido bajo en ceras en el extracto metanólico es favorable, debido a que en esta fracción no están presentes compuestos fenólicos, éstos son asociados a la actividad inhibitoria en bacterias (Rodríguez et al., 2020; Ruiz, 2020; Nam et al., 2016).

Durante las extracciones que se realizaron al propóleo en greña, se observó una coloración que en las primeras extracciones fue de dorado-café intenso a amarillo claro en las últimas, esto se debe al solvente metanol, dado que otros solventes tienen distintas polaridades y en éstos se disuelven diferentes compuestos cuya polaridad es afin al solvente (Figura 1 y 2).

Se ha encontrado que varios de los compuestos antes mencionados presentes en los propóleos, actúan incrementando la permeabilidad de la membrana celular, incrementando la fluidez y la permeabilidad de la misma, como también la perturbación de las proteínas presentes en la membrana (Boisard et al., 2015), la inhibición de la respiración, la alteración del proceso de transporte de iones en cepas bacterianas Gram Positivas y Gram negativas e inhibiendo la motilidad bacteriana, siendo entonces los responsables de la actividad antibacteriana por medio de lisis bacteriana (Carson et al., 2002).

Al evaluarse las propiedades antimicrobianas del propóleo de Cuautitlán, en cuanto al análisis de varianza se pudo determinar que existen diferencias significativas ($p= 0.04$, $f= 32.71$) en la actividad antibacteriana del extracto de propóleo, mostrando inhibición sobre las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* CDBB-1044, *Staphylococcus epidermidis* Caso Clínico y *Klebsiella oxytoca* CDBB-970 (Figura 4) además de mostrar los mayores halos de inhibición para los 2 primeros respectivamente (Cuadro 3), estos resultados concuerdan con lo reportado por Velázquez et al. 2007, y Ruiz 2020, quienes relacionaron las propiedades antibacterianas del propóleo a la presencia de compuestos bioactivos como los polifenoles, principalmente los flavonoides por lo tanto tienen un efecto moderado a significativo inhibiendo a cepas Gram positivas como *S. aureus*, *E. faecalis* y *L. monocytogenes* y en cepas Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* por lo que concuerda con los resultados de este estudio.

Por otro lado, cabe mencionar que las cepas *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli* presentaron un halo de inhibición sólo de 5.00 mm, que corresponde al diámetro del sensidisco impregnado por el extracto de propóleo, al presentar esta actividad inhibitoria sin tener diferencias significativas en el análisis de varianza, puede lo antes mencionado estar relacionado a las características organolépticas del propóleo listadas en la NOM-003-SAG/GAN-2017 y cuentan con cohesión en el extracto, impidiendo la correcta difusión de este en el agar (Kumazawa, 2003).

Para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) se reporta 2.5 y 1.5 mg/mL respectivamente para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Klebsiella oxytoca*, esto probablemente debido al mecanismo de acción referente al debilitamiento de la pared celular, de la síntesis proteica e inhibición en el proceso de replicación y expresión genética (Palomino-García, 2009), relacionando también a los mecanismos antimicrobianos de los flavonoides propuestos como inhibición de la motilidad, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de las funciones de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, inhibición

de la unión y formación de biopelículas, inhibición de las porinas y atenuación de la patogenicidad (Akca et al., 2016; Xie et al., 2015), por lo cual el propóleo presentó actividad antibacteriana en dichas cepas, estos resultados concuerdan con lo reportado por Genaro (2018) y Rodríguez et. al. (2020).

Comparando los resultados obtenidos en este estudio con las referencias, se observó que el extracto metanólico de propóleo obtuvo inhibición similar a lo reportado por Genaro (2018) y por Rodríguez et. al. (2020) en cuanto a la sensibilidad señalada para la cepa *Staphylococcus aureus* como también una baja sensibilidad para las cepas Gram negativas utilizadas en este estudio.

Tanto los seres humanos como la gran parte de los seres vivos necesitan del oxígeno para llevar a cabo procesos metabólicos de producción de energía suficiente para sobrevivir, sin embargo, los radicales libres que son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo (último orbital), los hace altamente reactivos con moléculas vecinas (Gutiérrez et al., 2014). Los radicales libres reaccionan con las principales macromoléculas de la célula como son proteínas, ácidos grasos, carbohidratos y ácidos nucleicos como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), generando un daño en su estructura y a sus funciones metabólicas/biológicas (Devasagayam et al., 2004), por estos motivos es importante evaluar la capacidad antioxidante del propóleo usado en este estudio, ya que los seres humanos y demás seres vivos se encuentran en exposición a estos radicales libres. Por lo que cabe destacar que el propóleo mostró una Capacidad Antioxidante Media (CA_{50}) de 165 $\mu\text{g/mL}$ (figura 15), la capacidad antioxidante media que mostró el propóleo es baja en comparación con el valor mínimo en la NOM-003-SAG/GAN-2017 que es de 100 $\mu\text{g/mL}$ (figura 12), y este resultado está relacionado a la cantidad de compuestos fenólicos de 62.8 mg (e AG/g) y 8.62 mg/mL (e Q/g) de flavonoides (figura 13, 15), el contenido rico de estos compuestos están presentes en el propóleo, y juegan un papel determinante en la capacidad antioxidante (Ruiz, 2020), está relacionada a la posición de(los) grupo(s) hidroxilo en los anillos A y B, la estructura de polifenoles está formada de dos centros aromáticos y un heterociclo central

oxigenado, estos anillos con doble ligadura confieren a flavonoides e isoflavonoides su capacidad antioxidante (Drago et al., 2006), los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides son; presencia de estructura *o*-dihidroxi en el anillo B que da una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones, doble ligadura en conjunción con la función 4-oxo del anillo C (Martinez et al., 2002).

Una de las propiedades fundamentales de los propóleos es su actividad antimicrobiana, su acción bacteriostática y bactericida está basada en la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática, y principalmente se le atribuye a flavonoides como pinocembrina, quercetina, naringenina, acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol y pinobanskina (Vargas et al., 2014).

En los análisis de HPLC-DAD y GC-MS realizado al extracto de propóleo se encontraron diversos tipos de fenoles y flavonoides, los principales compuestos identificados corresponden a Naringina, Pinocembrina (flavanona), Crisina, Galangina, Ácido Oléico, Ácido Palítico y Ácido Linoléico. Xie et. al. (2015) encontró que las flavononas requieren la presencia de sustituyentes hidroxilo en la posición 2',4' o 2',6' en el anillo B, en la posición 5,7 del anillo A para presentar actividad antioxidante, para la Crisina (flavona) Dayong et. al. (2009) reportó que tiene una cierta actividad antioxidante e inhibidora del citocromo P450, en cuanto a la Galangina (flavonol) Cushnie y Lamb (2006) encontraron que este flavonoide tiene actividad antibacterial sobre *Staphylococcus aureus*, por lo cual estos compuestos mencionados influyen en la actividad antibacterial del extracto metanólico propóleo estudiado.

Conclusiones

El extracto metanólico de propóleo de Cuautitlán Izcalli presenta actividad antibacteriana mayor en bacterias Gram Positivas y una menor inhibición en Gram Negativas.

El extracto presenta una cantidad importante de compuestos bioactivos totales como fenoles y flavonoides.

El compuesto de mayor abundancia fue la galangina.

El extracto tiene una capacidad antioxidante, ligada a la concentración de sus compuestos bioactivos.

Apéndices.

Apéndice 1. Zona de Colecta

El propóleo se obtuvo en greña (propóleo en bruto) por personal del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en noviembre de 2019, conservándose en oscuridad y temperatura ambiente previo a su procesamiento.

El apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Cuautitlán se encuentra ubicado en la calle San Sebastian Xhala, código postal 54714, municipio Cuautitlán Izcalli (Figura 20). Se localiza en el centro del Estado de México, en las coordenadas 19° 41' 33.17'' de latitud Norte, 99° 11' 23.64'' de longitud Oeste, a una altura de 2,270 metros sobre el nivel del mar.

Cuenta con clima tipificado como templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media y templado subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad. Tiene una precipitación pluvial anual de 653 milímetros y temperatura promedio de 18.1° C anual. En los alrededores del apiario se encuentran las especies vegetales dominantes como *Eucalyptus globulus* Labill., *Ricinus communis* L. y *Callistemon citrinus*. Existe por introducción pirul, aile, jacaranda, álamo plateado, fresno y colorín (Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, 2010).

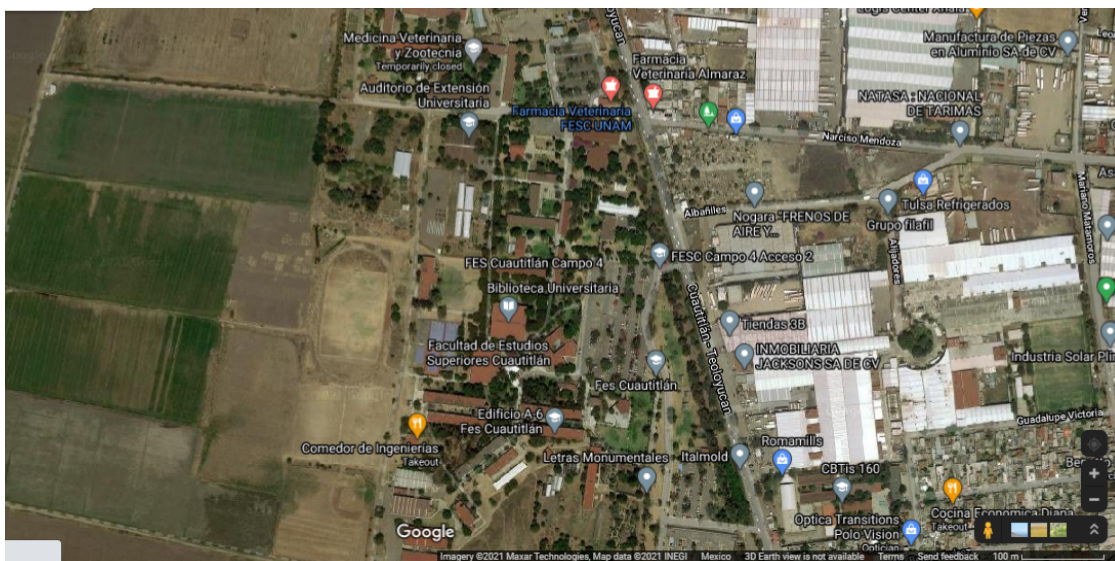


Figura 20. Mapa del municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Recolección y Elaboración del propóleo por *Apis mellifera*

Las abejas *A. mellifera* recolectan el material a través de exudados de diferentes especies de plantas vasculares, tales como: álamo, sauce, olmo, abedul, castaño de indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas (Genaro, 2018). El polen es también un componente habitual en muestras de propóleo; éste proviene de las anteras de las flores visitadas por las abejas y es un indicador del origen botánico (Salamanca y Osorio, 2019). El proceso de transformación de estas resinas en propóleo lo realizan dentro de las mandíbulas a través de un conducto conectado a las glándulas mandibulares que secretan ácido 10-hidroxidecenoico para ablandar y compactar las resinas con ayuda de su tercer par de patas traseras (Farré et al., 2004) y cuya producción anual (10-300 g/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida (Lin et al., 1999).

Este propóleo es recolectado en la colmena por el apicultor colocando rejillas con mallas de nylon o de plástico (malla flexible con orificio romboide de 3 x 3 mm) sobre los paneles de la colmena por los métodos de raspado hasta obtener una muestra representativa, este procedimiento se puede repetir cada uno a seis meses dependiendo de la capacidad de la colmena en cubrir los huecos (Martínez et al., 2012). Posterior a esto el propóleo recolectado debe introducirse en un congelador a una temperatura de -10 a -20 °C y en ausencia de luz con la finalidad de que se congele por trozos y sea rígido y frágil para que con una espátula de acero inoxidable sin mucho filo sea fácilmente desprendible (Genaro, 2018), para su transporte debe ser colocado en frascos ámbar para protegerlos de luz solar y almacenarse en lugares frescos y cerrados (Farré et al., 2004).

Apéndice 2. Técnica de maceración

(Domínguez, 1973)

El propóleo en greña (figura 21) se limpió, pesó y colocó en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se agregó una cantidad de solvente metanólico necesario donde el propóleo quedó cubierto en su totalidad por este mismo. El recipiente se tapó con papel aluminio para evitar la evaporación del solvente (figura 22).



Figura 21. Propóleo de Cuautitlán en greña



Figura 22. Matraz Erlenmeyer con propóleo y metanol.

El propóleo se dejó reposar en metanol mínimo 1 día y un máximo de 3 días, teniendo en cuenta la extracción de los compuestos se ve reflejada en la coloración del líquido, entre tonalidades más oscuras mayor el rendimiento. Por último, se realizó una destilación a presión reducida en un rotavapor, para obtener el extracto libre de solvente (figura 23).



Figura 23. Destilación del extracto metanólico por medio de un rotavapor

Apéndice 3. Método de difusión en agar Kirby-Baüer

(Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; CLSI 2012)

Esta técnica es utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de un extracto puro o de los compuestos de un extracto, en este estudio en particular el extracto metanólico, el cual es difundido a través del agar desde el disco de papel. Es el medio ideal para promover el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos de interés clínico.

- **Medio:** Para los ensayos con cepas bacterianas se preparó el medio de cultivo agar y caldo Müller-Hinton. Es importante que el medio de cultivo (agar) alcance 4 mm de espesor uniforme, si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición, un agar con más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.
- **Preparación del inóculo bacteriano:** Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müller-Hinton. Hay que enjuagar muy bien el asa para que el material bacteriano quede perfectamente disuelto en el caldo. Una vez hecho esto, se retira el asa y el tubo con el cultivo se incuba a 37°C durante un periodo de 18 a 24 horas o hasta que alcance una turbidez equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland, el cual equivale a una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL.
- **Inóculo:** Se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión de la cepa con la que se vaya a trabajar; antes de retirarlo del tubo, se elimina el exceso de líquido rotando el hisopo contra las paredes internas del tubo. Posteriormente, se inocula la superficie de la placa con el medio adecuado (Müller-Hinton en el caso de bacterias), sembrando por medio de estría por lo menos en tres direcciones, girando 60° al momento de cambiar de dirección.

- **Preparación de sensidiscos:** Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos con papel Whatman del No. 5, en los cuales se aplica la sustancia a evaluar.
- **Extracto o fracción activa:** Se preparan las diluciones necesarias utilizando como vehículo metanol, la cantidad de extracto o fracción debe ser de 2 mg sobre 10 μ L para cada sensidisco.
- **Control negativo:** Se colocan en los sensidiscos destinados a tal fin 10 μ L del solvente utilizado para las muestras problema.
- **Control positivo:** Para cepas bacterianas, se utilizan sensidiscos impregnados con 25 μ g de cloranfenicol. Los discos se deben realizar 24 horas antes del ensayo con la finalidad de que se evapore el solvente.
- **Prueba de susceptibilidad:** Los discos son colocados manualmente en la superficie del agar utilizando pinzas estériles. Se deben dejar a una distancia adecuada unos de otros y abarcando la totalidad de la placa. Una vez preparadas todas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en incubadora a 36°C sin mayor tensión de CO₂, esto último, para evitar la acidificación del medio y la obtención de falsos positivos o negativos en la prueba.
- **Interpretación de resultados:** En el caso de existir inhibición, se reporta el extracto o fracción como activa. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración y en milímetros; la prueba debe hacerse mínimamente por triplicado y se reportan los promedios de los resultados por cepa utilizada.

Apéndice 4. Microtécnica de dilución en caldo

(Koneman, 1996; CLSI, 2012)

Esta microtécnica se utiliza para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

- **Medio:** Esta técnica sigue el mismo principio que el método de macrodilución en agar, con la excepción de que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en fase líquida, en una serie de microtubos moldeados en una caja plástica con 96 cavidades, denominada placa de ELISA. La placa se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto a probar en las concavidades apropiadas: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.312 mg/mL.
- **Inóculo:** Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260). El tubo se incubó por 24 horas a una temperatura de 36°C, obteniendo una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL. Posterior a esto, se realiza una nueva dilución para obtener una concentración de 1×10^5 UFC/mL. Una vez realizado lo anterior, se colocan 50 µL de las suspensiones diluidas de los cultivos bacterianos en cada uno de los pozos de la placa de ELISA.
- **Control negativo:** Se colocan 50 µL de caldo Müller-Hinton con el solvente empleado para disolver el extracto a analizar.
- **Testigo:** Se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton en las concavidades y se agregan 50 µL de cultivo bacteriano.
- **Incubación:** Una vez que se tiene la placa con la carga bacteriana, se cubre con una tapa, se sella con parafilm para evitar el desecamiento y se incuba a 36°C durante 24 horas.
- **Interpretación de los resultados:** Después del tiempo de incubación, se añade a cada concavidad 50 µL de una solución al 0.08% de sal de

tetrazolio oxidada (TTC), para después incubarla durante 30 minutos. En las concavidades donde haya habido desarrollo de organismos, el colorante será reducido a formazán, el cual produce una coloración rojiza-violácea en el fondo de la concavidad. De no haber desarrollo, la concavidad se mantendrá clara.

Nota: Es importante tener la placa protegida de la luz para evitar alteraciones en los resultados.

La concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es aquella en la que se presenta una disminución drástica del crecimiento bacteriano, en tanto que la Concentración Bactericida Mínima será en la que hay una inhibición completa del desarrollo de la cepa.

Esta prueba debe hacerse por triplicado a fin de que tenga resultados estadísticamente significativos.

Apéndice 5. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

(Okusa et al., 2007)

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

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

- **Solución DPPH:** Se prepara en un matraz aforado, colocando 0.00197g (0.002g) y 50 mL de MeOH grado HPLC.
- **Stock del extracto:** Se prepara una solución con 5 mg del extracto o fracción a evaluar y se disuelven en 5 mL de MeOH grado HPLC.

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

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

Del stock (5 mg en 5 mL de MeOH) se toman 20 μ L (que llevarán 20 μ g) y se adicionan 180 μ L de MeOH para tener un volumen final de 200 μ L. De este nuevo stock se tomarán los siguientes volúmenes:

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

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

[] ppm	μL stock	μL de MeOH
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900
150	150	850
200	200	800

250	250	750
300	300	700
400	400	600
500	500	500
600	600	400
700	700	300
800	800	200
900	900	100
1000	1000	0

- **Aplicación de sustancias:** En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-1000 ppm) por triplicado, para agregar posteriormente 150 µL de la solución metanólica de DPPH. Inmediatamente se protege de la luz envolviéndola con papel aluminio y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Luego de incubar, se determina la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA.
- **Blanco:** Se llenan pozos con 200 µL de metanol.
- **Interpretación de resultados:** Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción, que se calcula con la siguiente fórmula:

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

En donde:

C=Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH

E= Absorbancia experimental (Mezcla de DPPH (150 µL) + solución problema (50µL).

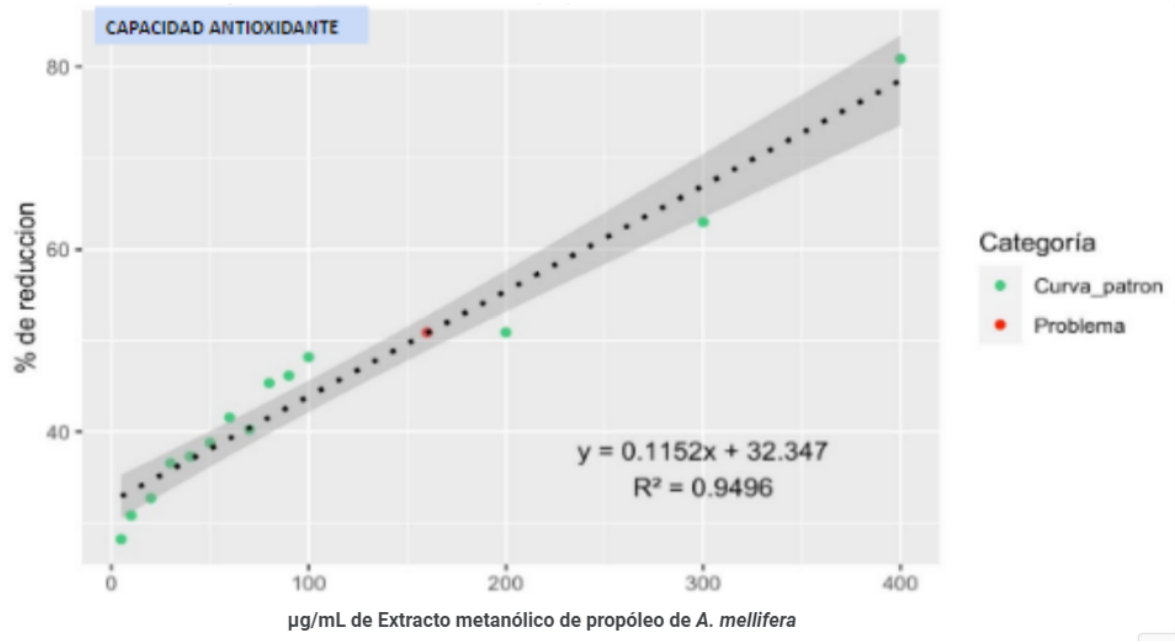


Figura 24. Capacidad Antioxidante del extracto metanólico por reducción de DDPH.

Apéndice 6. Conteo de fenoles totales (CFT) (Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, donde es empleado el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo de coloración amarillo y pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que tienen la capacidad de reaccionar con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos, cromógenos de color azul intenso de tungsteno (W_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de las moléculas (Gutiérrez et al., 2008).

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que es una pequeña molécula que, debido a su estabilidad y estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a tres grupos hidroxilo (García, 2007).

- **Curva de calibración:** Se utiliza una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se forman alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL); a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas en un volumen final de 1 mL.
- **Preparación del extracto** Se prepara una solución estándar (200 μ g/mL) de la cual se toma una alícuota de 250 μ L y se agregan 750 μ L de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Se toma 1mL de cada concentración y se transfiere a un tubo de ensayo con 7 mL de agua destilada; a continuación, se adicionan 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL. La mezcla resultante se deja reposar durante dos horas, tiempo en el cual todos sus componentes reaccionan a temperatura ambiente, y se lee la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se lee por triplicado.

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón (ácido gálico μ L)	Agua destilada (μ L)	Agua destilada (mL)	Folin-Ciocalteu (μ L)	Na_2CO_3 (mL)
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25	968.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.0250	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
Problema	-----	250	750	7	500	1.5
Problema	-----	500	500	7	500	1.5

- **Interpretación de resultados:** Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener una curva patrón de ácido gálico. Para conocer la concentración de fenoles del extracto problema, se utiliza un análisis de regresión lineal, interpolando la absorbancia de las muestras evaluadas. Los resultados se reportan como equivalentes de ácido gálico o en porcentaje.

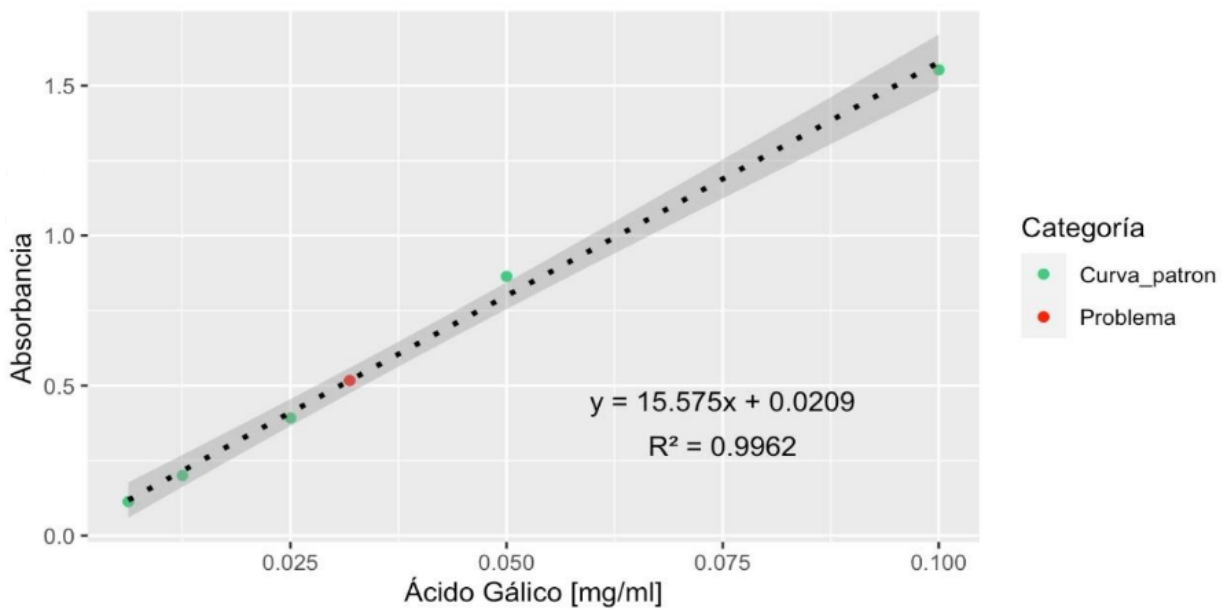


Figura 25. Cuantificación de Fenoles Totales

Apéndice 7. Contenido de flavonoides totales Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)

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

- **Stock de quercetina:** Se pesan 3 mg de quercetina, los cuales se disuelven en 3 mL de MeOH grado HPLC.
- **Curva patrón:** Se toman alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm y se les agrega 1mL de AlCl_3 al 2%.

Nota: Para las primeras concentraciones (de 1 a 5 ppm), hacer lo siguiente:

Del stock de quercetina tomar 20 μL y agregar 180 μL de MeOH, teniendo un volumen final de 200 μL . De este nuevo stock, se toma:

[] ppm	μL stock de quercetina	μL de MeOH	AlCl_3 al 2%
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

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

[] ppm	μL stock de quercetina	μL de MeOH	AlCl_3 al 2%
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

- **Stock del extracto:** Se pesan 3mg del extracto metanólico y se disuelven en 3 mL de MeOH grado HPLC
- **Blanco:** Se toma 1 mL del stock del extracto y 1 mL de MeOH grado HPLC.
- **Problema:** Se toma 1 mL del stock del extracto y se le agrega 1 mL de AlCl_3 al 2%. Se vierten 200 μL de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA, por triplicado. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 450 nm.
- **Interpretación de resultados:** Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina. Para el problema, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola el promedio de la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto.

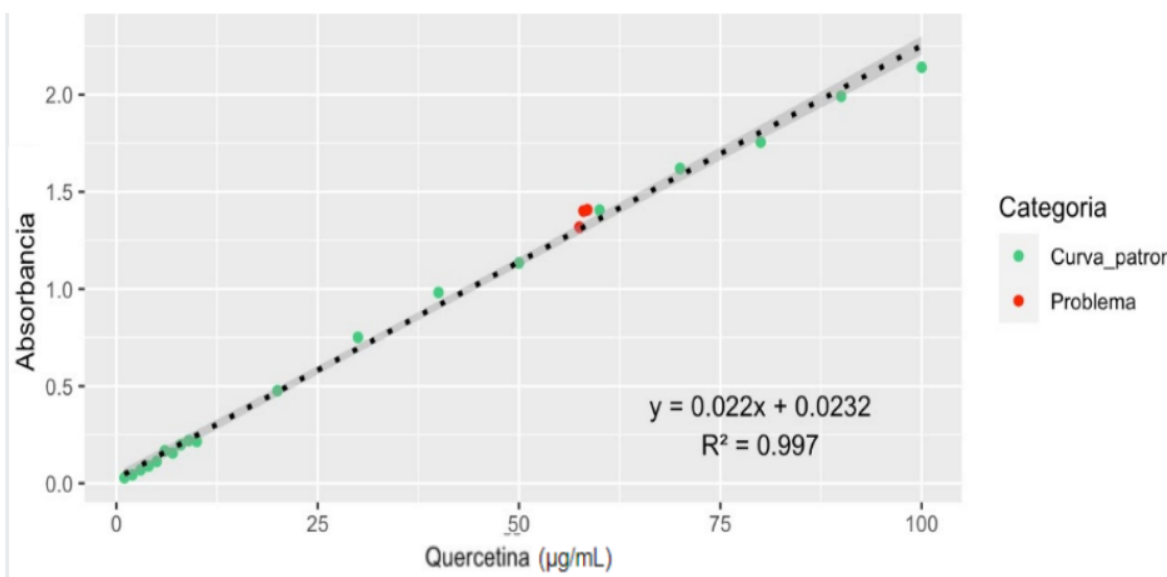


Figura 26. Cuantificación de flavonoides totales.

Apéndice 8. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

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

El equipo utilizado es:

- a) Cromatógrafo de Gases modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C, marca Agilent Technologies.
- b) Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno y 25 micras de película.

Condiciones de corrida para las fracciones (método hexánico)

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

Horno

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 minutos.
- Tiempo de corrida total: 26.67 minutos
- Línea de transferencia: 290°C

Detector del Espectrómetro de Masas:

Método de adquisición de datos: Full Scan

Rango de masas: 35-600 m/z

Temperatura de la fuente del cuádruplo: 150°C

Temperatura de la fuente de ionización: 230°C

Impacto electrónico: energía de 70 eV

Apéndice 9. Cromatografía líquida acoplada a arreglo de diodos (HPLC-DAD)

La cromatografía líquida de alta resolución con sistema multicanal para solventes y acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) es una técnica analítica de mucha utilidad para el desarrollo de métodos de análisis de fármacos, especialmente de preparaciones de composición compleja. En general, la modalidad en fase reversa de la HPLC, que utiliza una fase estacionaria de características no polares y una fase móvil polar, es la forma más versátil y utilizada en este tipo de situaciones ya que logra separar una gran diversidad de compuestos polares y no polares variando adecuadamente la composición de la fase móvil.

La utilización de sistemas de gradiente, generados mediante una variación temporal de la proporción de los componentes de la fase móvil a temperatura controlada, permite lograr una gran selectividad, separando compuestos de polaridades muy diferentes en un tiempo razonable de análisis. La aplicación de gradientes es, habitualmente, estrictamente necesaria para el desarrollo de métodos indicativos de estabilidad, los cuales deben ser capaces de detectar simultáneamente muchos compuestos que tienen diversas afinidades por la fase estacionaria.

Existen dos tipos; Cromatografía de fase normal que se caracteriza por separar compuestos con base en su polaridad, donde se utiliza una fase estacionaria polar y la fase móvil apolar; mientras que la cromatografía de fase reversa se utiliza como fase estacionaria una columna con características apolares y una fase móvil polar. Las columnas más utilizadas para este fin son las C8 o C18 que se refiere a la cantidad de carbonos que cubren la superficie de la molécula de sílice.

El extracto metanólico que se analizó en el HPLC DAD, presentan las siguientes condiciones:

- Columna Allsphere ODS-1 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de película de 5 μm .

- Extracto metanólico: Se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25.25:50)
- Flujo: 1 mL/min
- Detector de arreglo de diodos (DAD)
- Longitud de onda de 260nm, realizando un barrido completo de 200-400nm.

Referencias

- Ahangari, Z., Naseri, M., Vatandoost, F. 2018. Propolis: chemical composition and its applications in Endodontics. Iranian Endodontic Journal Summer. 13(3):285–292.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S. A., Usui, Y. A., Nakamura, J., Matsuka, M. B., Zhu, F. C., Tsutomu, N. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry 101(4):1383-1392.
- Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. 2018. Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. Medicines. 5(1):2-19.
- Akca, A. E., Akca, G., Toksoy Topçu, F., Macit, E., Pıkdöken, L., & Özgen, I. 2016. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with Chlorhexidine against oral pathogens: An In Vitro Study. BioMed Research International. 2016, 1-8.
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., Narain N. 2017. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. Food Research International. 101:129–38.
- Barrera, A. 2014. Manual de cría de abeja reina (cuarta ed.). (IICA, Ed.) México D.F., México: SAGARPA. 45 p.
- Bermello, C. A. 2010. Recursos genéticos y conocimiento etnofarmacológico cubanos. Su protección mediante patentes. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 9(3): 153-165.
- Boisard, S., Le Ray, A. M., Landreau, A., Kempf, M., Cassisa, V., Flurin, C., Richomme, P. 2015. Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015:1-10. ID:319240.
- Bonamigo, T., Campos, J. F., Alfredo, T. M., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A.L., Paredes-Gamero, E. J. 2017. Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities

of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciat anthidioides*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017:1–12.

- Bonvehí, J. S., Gutiérrez, A. L. 2012. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4):1351–1358.
- Boudourova-Krasteva, G., Bankova, V., Sforcin, J. M., Nikolova, N., Popov, S. 1997. Phenolics from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung* 52c:676–679.
- Carrillo, M.L., Castillo, L.N. R. Mauricio. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Revista de Información Tecnológica*. 22:21-28.
- Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. 2002. Mechanism of action of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by timekill, lysis, leakage, and salt tolerant assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:1914-1920.
- de Castro, S.L. 2001. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 3:49–83.
- Chen, J., Long, Y., Han, M., Wang, T., Chen, Q., Wang, R. 2008. Water-soluble derivatives of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90(3):441-6.
- CLSI., 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for microbial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep. M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA, 184 p.
- Cole, M. 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. *Biochemical Systematic and Ecology*. 22(8):837-856.

- Corbellini, L., dos Santos, D., Marinho, F., Pêgas, J. A., Roesch, M., Moura, S. 2017. Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(7):591-598.
- Da Silva, G. J., Domingues, S. 2016. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 4(3):E29.
- Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J. 2006. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 13(3), 187–191
- Dayong S., Ying W., Yi-Han Z., Yingjie G., Wang J., Hui Z., Ze-Sheng L., Fawcett J. P. 2009. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metabolism And Disposition*. 37(3):629-634.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., Lele, R. D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current Status and Future Prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*. 52:794-804.
- Drago S. M., López L. M., Sainz, E. T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37(4):58-68.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Primera Edición. Editorial Limusa. México. 3-17 pp.
- Duttmann, C., Castillo, G., Demedio, J., Verde, M. 2013. La apicultura y factores que influyen en producción, calidad, inocuidad y comercio de la miel. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua. León, Nicaragua: UNAN-León.
- Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. 2010. Estado de México. Consultado el 8 de enero de 2021. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/index.html>
- Farré, R., Frasset, I., Sánchez, A. 2004. El Propolis y la Salud. *Ars Pharmaceutica*. 45:23-43.

- Fernández, C. M. 2008. Estudio químico de propóleos rojos cubanos. Tesis Doctoral. Universidad de la Habana, Cuba.
- Frye, J. G., Jackson, C. R. 2013. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Frontiers in Microbiology*. 4:135.
- García, M. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos naturales. En http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQ_GarciaNava.pdf. Consultada el 14 de noviembre de 2020.
- García, Y., Rangel, J.O., Fernández, D. 2011. Palynological flora of the wetland from the aquatic, swamp and floodplain vegetation of the Córdoba and Cesar departments (Colombian Caribbean). *Caldasia*. 33(2):573-618.
- Gao, W., Pu, L., Wei, J., Yao, Z., Wang, Y., Shi, T. 2018. Serum antioxidant parameters are significantly increased in patients with type 2 diabetes mellitus after consumption of Chinese propolis: a randomized controlled trial based on fasting serum glucose level. *Diabetes Therapy Journal*. 9(1):101–114.
- Genaro, J. E. 2018. Evaluación de la actividad antibacteriana de una muestra de propóleo de Michoacán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Gheisari, A., Shahrvand, S., Landy, N. 2017. Effect of ethanolic extract of propolis as an alternative to antibiotics as a growth promoter on broiler performance, serum biochemistry and immune responses. *Veterinary World*. 10(2): 249-254.
- Gómez, R. M., Arraéz, 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*. 4:595-603.

- Gutiérrez, A., Ortiz, G., y Mendoza, C. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. 1-5.
- Gutiérrez, S. J., Mondragón, T. P., García, O. L., Hernández, R. S., Ramírez, G. S., Núñez, R. N. R. 2014. Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas. 2014(19):446-454.
- Heon, K. P., Sang, K., Chang S. 2008. Antimicrobial activity of water soluble propolis. Korean Journal of Food and Nutrition. 21:15-21
- Kalita, P., Barman, T., Pal, T. and Kalita, R. 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. Journal of Drug Delivery & Therapeutics 3(4): 33-37.
- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., Musik, I. 2018. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018:1–29.
- Koneman, W. E. 1996. Diagnóstico microbiológico. Onceava Edición. Médica Panamericana. México. 339 p.
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T. 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 51(6):740-742.
- Lin, S. C., Chung C. Y., Chiang C. L., Hsu, S.H. 1999. The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. American Journal of Chinese Medicine. 27(1):83-94.
- Londoño, O. A., Ávila J.G., Canales, M. M., Hernández C. T., Serrano P. R., Flores C. M., Durán, A., Penieres, J.G., García, C.G., Cruz, T. A. 2010. Antibacterial comparative study between extracts of Mexican propolis and of

three plants which use *Apis mellifera* for its production. Journal of Animal and Veterinary Advances. 9:1250-1254.

- Lotti, C., Campo, F. M., Piccinelli, A. L., Cuesta, R. O., Márquez, H. I., Rastrelli, L. 2010. Chemical constituents of red mexican propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58(4):2209-2213.
- Martínez, J. G., Garcia, C., Durango, D., Gil G. J. 2012. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. Revista MVZ Córdoba. 17(1):2861-2869.
- Martínez F. S., González, G.J., Culebras, J. M., Tuñón M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria. 17(6):271-278.
- Mavri, A., H. Abramovic, T. Polak, J. Bertoncelej, P. Jamnik, S. Smole, and B. Jersek. 2012. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. Chemistry and Biodiversity. 9:1545-1558.
- Meneses, H. 2005. Propolis uma revisao dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. Arquivos do Instituto Biológico. 72:405-411.
- Molyneaux, P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 26(2):211-219.
- Nam, S. H., Choi, Y. R., Jang, S. O., Shim, Y. S., Han, G. S. 2016. Antimicrobial activity of propolis on different oral bacteria. Indian Journal of Science Technologic. 9,89174/89171-89174/89174.
- Náñez, J. 1988. Algunos datos sobre las abejas y la miel en la época prehispánica. Revista Mexicana de Estudios Antropológicos. 34:123-140.
- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.
- Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P. 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). Journal of Ethnopharmacology. 112:476-481.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Resistencia a los antibióticos. Génova, Organización Mundial de la Salud. Disponible en: [http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/)
- Palomino-García, L., R. 2009. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias-Escuela Química de Medellín. 143 p.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 5 e47:1-15.
- Peña, R.C. 2008. Propolis standardization: a chemical and biological review. *Ciencia e Investigación Agraria*. 35(1):17-26.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D., Gniewosz, M. 2019. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*. 56:5386–5395.
- Quintero-Mora, M. L., Londoño, O., Hernández, A. F., Manzano, G. P., Lopez, M. R., Soto, Z. C. I., Carrillo, M. L., Penieres, C. G., García, T. C. G., Cruz, S. T. A. 2008. Efectos de extractos de propóleo mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25:22-26.
- Ramamoorthy, P. and Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2(1), 70-80.
- Rodríguez, B., Canales, M. M., Penieres, J. G., Cruz, T. A. 2020. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria* 30:1-29.
- Ruiz, I. L. 2020. Estudio de la actividad antimicrobiana, de una muestra de propóleo de Santiago La Galera, Candelaria Loxicha, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México, México. 55 p.

- Russo, A., Cardile, V., Sanchez F, Troncoso, N., Vanella, A., Garbarino, J. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences Journal*. 76:545-558.
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán). 32-39 pp.
- Salamanca, G. G., Osorio, T. M. 2019. Análisis polínico del propóleo rojo de la zona insular de San Andrés, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 43(169):689-698.
- Seal, T. 2016. Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6(02):157-166.
- Sforcin, J. M. 2016. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*. 30(6):894–905.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., Almeida-Aguiar, C. 2015. Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. ID 206439.
- Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela-Reventós, R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152-178.
- Urushisaki, T., Takemura, T., Tazawa, S., Fukuoka, M., Hosokawa-Muto, J., Araki, Y., Kuwata, K. 2011. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in Brazilian green propolis water extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. ID 252914.
- Valenzuela, B. G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de las Heras, B., Hortelano, S., Delporte, C. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology* 168(2015):37-44.

- Vanden Berghe, D. A. and Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Hostettmann, K. Series editor Dey, P. M. Academic Press. New York, USA. p 47-71.
- Vargas, S. R. D., Torrescano, U. G. R., Mendoza, W. A. M., Vallejo, G., B., Acedo, F. E., Sánchez, E. J. J., Peñalba, G. M. C., Sánchez, E. A. 2014. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana de propóleos. *Biocencia*. 16(1):32-37.
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F. M., Velazquez, E. F., Astiazaran, H., Hernandez, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 103(5):1747–1756.
- Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A. 2000. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 55:790–793.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. 22(1):132-49.
- Zhang, C., Shen, X., Chen, J., Jiang, X., Hu, F. 2017. Identification of free radical-scavengers from Brazilian green propolis using off-line HPLC-DPPH assay and LC-MS. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 82(7):1602–1607.