

10  
2º



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA ACCION ANTIMICROBIANA Y  
EFECTO ANTIOXIDANTE DEL PROPOLEOS  
PROVENIENTE DEL RANCHO CUAUTOXCA  
UBICADO EN HUEYTEMALCO, PUE.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
**CLARA CUEVAS HUESCA**



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	PROFRA. OLGA VELAZQUEZ MADRAZO
VOCAL	PROFRA. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE
SECRETARIO	PROFR. MARTIN MACOUZET GARCIA
1er. SUPLENTE	PROFRA. BEATRIZ DE GUADALUPE SERRANO LOPEZ
2do. SUPLENTE	PROFRA. RUTH VILLASENOR GUTIERREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

FACULTAD DE QUIMICA, EDIF. A, LAB. 4A Y 4B  
UNAM

ASESOR DEL TEMA

*Olga Feliza Velazquez Madrazo*  
Q. F. B. OLGA VELAZQUEZ MADRAZO

SUSTENTANTE

*Clara Cuevas Huesca*  
CLARA CUEVAS HUESCA

**DEDICO esta tesis:**

A Dios por permitirme llegar a este momento tan importante en mi vida.

A el papá, porque gracias a tu esfuerzo, sacrificio, cariño y apoyo, hoy he logrado una de mis metas.

A El mamá porque has estado a mi lado apoyandome en todo. Porque gracias a tus consejos y a tu apoyo he salido adelante.

A Miguel Angel por su amor, paciencia y comprensión. Por todos los momentos que hemos compartido en estos casi 6 años.

A mis hermanos German y Osvaldo (y familia).

A Claudia, Mary, Luli y Lillian, por su amistad.

A mis amigos y compañeros de 1er. semestre.

A mis amigos y compañeros de la carrera de Química de Alimentos, por las experiencias que juntos vivimos.

A Yola por toda su ayuda (y por soportarme estos dos últimos años).

A todos aquellos que en su momento compartieron instantes de su vida conmigo.

**AGRADEZCO A:**

*La profesora Olga Velázquez Madrazo, por su sabia asesoría en la realización de esta tesis.*

*Al Sr. José Domínguez de la Granja Luchita.*

*Al MVZ. Gustavo Fernández Bermudez.*

*Al Ing. Fidel Rodríguez Alquistra de ACUEXCOMATL.*

*Al Departamento de Alimentos y Biotecnología. En especial al profesor Agustín Reyó.*

*A los encargados del Rancho Cuautoxca, en Hueytemalco, Pue.*

*Y a todos aquellos que me apoyaron.*

*A todos, mil gracias por su valiosa ayuda y colaboración; ya que sin ésta, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.*

## I N D I C E

Capítulo	pags.
I. - INTRODUCCION Y OBJETIVOS .....	1
II. - ANTECEDENTES .....	3
III. - CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL PROPOLEOS .....	15
IV. - COMPOSICION DEL PROPOLEOS .....	16
V. - CARACTERIZACION DEL PROPOLEOS ESTUDIADO .....	24
VI. - EVALUACION DE LA ACCION ANTIMICROBIANA .....	28
VII. - EVALUACION DEL EFECTO ANTIOXIDANTE .....	58
VIII. - DISCUSION DE RESULTADOS .....	65
IX. - CONCLUSIONES .....	68
X. - RECOMENDACIONES .....	69
XI. - BIBLIOGRAFIA .....	70

## CAPITULO I.

### INTRODUCCION

En la actualidad, la utilización de los productos apícolas se ha incrementado tomando gran importancia en el campo médico y en el alimentario, por sus propiedades particulares. Todos los productos de la colmena son aprovechables y son: *la miel, el polen, la jalea real, la cera, el veneno y el propóleo.*

De este último: el propóleo, se han realizado diversos estudios para conocer sus propiedades y optimizar su empleo; en México debido a la falta de información, el propóleo en muchas ocasiones es desechado por los apicultores, ya que dificulta la recolección de los productos principales y de mayor uso comercial como lo son la miel, polen y jalea real. Pero existen reportes acerca de las propiedades del propóleo, entre las cuales destacan dos que pueden ser de importancia para la conservación de los alimentos: *la acción antimicrobiana y el efecto antioxidante.* De estas propiedades, la primera ha sido aprovechada, hasta ahora, sólo para contrarrestar los efectos de ciertos microorganismos que afectan la salud del ser humano, utilizando el propóleo como un medicamento natural; en cambio el efecto antioxidante no ha sido explotado.

Este trabajo pretende comprobar científicamente las propiedades mencionadas para establecer si es posible el uso del propóleo en el campo alimentario. Para lograrlo se trabajó con propóleo, en forma de extracto alcohólico, proveniente del Rancho Cuautoxca, de Agroindustrias Nacionales Cuautoxca, ubicado en Hueytemalco, Pue..

Se evaluó la acción antimicrobiana *in vitro* sobre cinco diferentes cepas representativas y de importancia en alimentos (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* y *Candida albicans*). Y posteriormente, tomando como base estudios previos sobre su efecto antioxidante, se evaluó su efectividad sobre

un alimento susceptible a la oxidación.

De obtener resultados satisfactorios, el propóleo será una nueva opción dentro del campo alimentario como conservador natural y permitirá mejorar el aprovechamiento de todos los productos apícolas.

#### 1.1.- OBJETIVOS

\* Profundizar los estudios hasta hoy realizados en México sobre las propiedades del propóleo.

\* Determinar la acción antimicrobiana que tiene el propóleo del Rancho Cuautoxca, sobre cinco cepas de importancia en alimentos.

\* Comprobar su efectividad como antioxidante ante un sistema alimentario.

## CAPITULO II.

### ANTECEDENTES

#### 2.1 CONOCIMIENTO DEL PROPOLEOS POR EL HOMBRE.

El conocimiento del propóleo por el hombre, se remonta a varios milenios antes de nuestra era; lo utilizaron los sacerdotes del Egipto antiguo y, un poco más tarde, los griegos que fueron los que le dieron el nombre de PROPOLEOS. Este término proviene de la palabra griega *pro* que significa delante y de *polis* que significa ciudad, ya que los griegos habían observado que esta materia se encontraba en la entrada de la colmena, es decir, delante de la ciudad. Así es como ARISTOTELES lo evoca en su *Historia de los animales* y lo considera como un remedio para los males de la piel, las llagas y las supuraciones.

Durante el siglo uno Ca. J. C.J, el famoso sabio latino VARRON lo menciona en sus trabajos y también lo hace en sus obras el poeta VIRGILIO. Al principio de nuestro primer milenio, el romano PLINIO el viejo y el médico griego DIOSCORIDES comienzan con polémicas acerca de su origen. El primero escribe por su parte *El propóleo quita los agujeros y lo que haya entrado en la carne, reduce las inflamaciones y ablanda los endurecimientos de la piel. Hace disminuir los dolores nerviosos, cura las úlceras, los abscesos que a menudo no se pueden curar.*

Luego, en el siglo dos, GALENO lo evoca a en sus tratados. Más tarde, en el siglo once, el famoso filósofo y médico iraní AVICENAS reporta que el propóleo que *tiene la cualidad de eliminar puntas de flechas y espinas, limpia y ablanda fuertemente (27).*

Conocido por los Incas que lo utilizaban en el marco de las infecciones febriles, se encuentra también mencionado el propóleo a partir del siglo doce, en los libros de medicina de Georglia, en los

que se basaba la preparación de numerosos remedios.

En Francia, se encuentran algunas referencias de uso en el tratamiento de las llagas, en los siglos dieciocho y diecinueve, pero, es sobretodo durante la guerra de los Boers en Africa del Sur, hacia el año mil novecientos, cuando el uso del propóleos llega a su auge por sus propiedades desinfectantes y cicatrizantes y por los excelentes resultados que produce (27).

Por lo tanto, no fué permanente su uso, pero se mantuvo a lo largo de los siglos para llegar hasta nuestra época, en la cuál se comienza a estudiar y a experimentar científicamente sobre las propiedades y usos empíricos del propóleos, para destacar sus verdaderas propiedades y aprovecharlo correctamente (23,27).

Entre las propiedades que se han observado son:

- \* bactericidas: en ciertos estafilococos, estreptococos y bacilos;
- \* fungicidas: en algunas especies de hongos que pueden provocar afecciones parasitarias ó micosis;
- \* anestésicas;
- \* anti-inflamatorias;
- \* cicatrizantes;
- \* antireumáticas: no muy aplicada;
- \* antioxidantes.

Siendo las dos últimas las menos estudiadas (7,15,21,30,36).

## 2.2 RECOLECCION DEL PROPOLEOS POR LAS ABEJAS.

### 2.2.1 LAS ABEJAS

Las abejas son uno de los insectos más útiles y activos; aparecen distribuidas por todo el mundo. Su nombre proviene del latín *apícuia* diminutivo de *APIS*, abeja (19).

Las abejas viven en colonias socialmente organizadas. Cada colonia está constituida por:

- \* una reina, única,
- \* varios centenares de machos o zánganos,
- \* millares de obreras.

#### LA REINA:

- \* Vive entre tres y cuatro años.
- \* Es mas larga y pesada que las obreras.
- \* La reproducción es su única función biológica y aova unos 2 000 huevos fecundados al día.

#### LOS MACHOS:

- \* Viven tres meses por término medio.
- \* Son menos largos que la reina pero más gordos y más anchos.
- \* La fecundación de la reina es su única función biológica; no participan en el trabajo de la colmena, vuelan todo el día buscando reinas jóvenes para aparearse.
- \* Incapaces de nutrirse por sí mismos, se nutren de la miel preparada por las obreras en la primavera y en verano; después son expulsados de la colmena, en otoño y mueren.

#### LAS OBRERAS:

- \* Viven de treinta a cuarenta y cinco días.
- \* Poseen glándulas particulares, llamadas glándulas faríngeas o salivares frontales que se presentan en forma de rosarios, con los cuales secretan la jalea real o leche de abejas.
- \* Dedicán todo su tiempo al trabajo: primero son nodrizas del conjunto de larvas de la colmena durante unos trece ó catorce días, posteriormente cuidan que la colmena se encuentre limpia y en buenas condiciones y elaboran cera y miel; y la última etapa de su vida se dedican a la búsqueda y recolección de: nectar, maná, polen, agua y propolis (24,28,30).

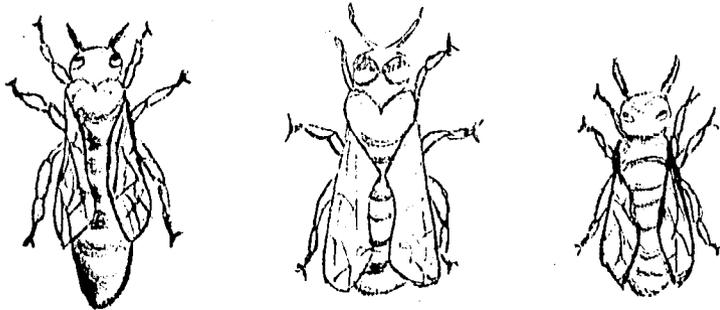


FIG. 1. - LAS TRES CLASES DE ABEJAS QUE FORMAN LA COLONIA.

\* LA REINA (IZQUIERDA) \* EL ZANGANO (CENTRO) \* LA OBRERA (DERECHA)

### 2.2.2 ACOPIO Y DESCARGA DEL PROPOLEOS.

Como ya se mencionó la palabra propóleos significa delante de la ciudad refiriéndose al uso que las abejas le dan para cerrar parcialmente las vías de acceso a su comunidad o ciudad. El propóleos representa un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas de consistencia viscosa. Las abejas lo recogen de los botones y corteza de los vegetales, principalmente árboles; entre los cuales podemos mencionar los siguientes: pino y abeto, picea, varias especies de álamos, el aliso, el sauce, el castaño de Indias, el abedul, el ciruelo, el fresno, el roble y el olmo (2,27,30).

Las abejas obtienen este material a partir de las gotas de resina que se forman por exudación en la corteza de las ramas y troncos. La abeja desciende cerca de una de esas gotas y separa un trocito de ella con

sus mandíbulas. Por la consistencia propia del producto, se forma un hilo que finalmente queda separado de la gota original. La abeja toma estos hilos con las garras del segundo par de patas y los deposita dentro de los cestillos de polen de las patas traseras. Luego, la abeja moldea la resina con las caras internas de los metatarsos del segundo par de patas hasta darle la forma de una pelotita de polen.

Repite la operación hasta acumular una cantidad suficiente de resina en cada uno de los cestillos de polen. Después del tratamiento de cada hilo de resina, la abeja realiza un breve vuelo, y vuelve a posarse en el lugar original a los pocos segundos, para continuar su tarea.

Al regresar a la colmena, la abeja nunca se desembaraza sola del propóleos que cargó. Las abejas domésticas arrancan las partículas de la misma manera que lo hizo la portadora al recogerlas. Existe un gran esfuerzo tanto de parte de la portadora como de las abejas que deben aliviarle de su carga. Las abejas se sujetan con firmeza con las patas a la superficie a la que están apoyadas mientras encajan sus mandíbulas en el material (23,30).

Muy a menudo, las portadoras de propóleos no ingresan a la colmena, las abejas domésticas le alivian de su carga sobre la plancha de vuelo. Durante la descarga suelen caer trocitos de distintos tamaños que quedan ahí donde caen. Por esta razón pueden verse adheridas en distintos lugares de una colmena algunas gotitas de resina de diversos colores, las cuales no parecen estar cumpliendo ningún fin útil. Una vez provistas de su trocito de propóleo, las abejas domésticas los transportan en las mandíbulas hasta el lugar donde deben fijarlo. Para colocar los propóleos también utilizan las mandíbulas. La trompa no interviene ni para recogerlo ni para aplicarlo (19).

- 1.- OJO COMPUESTO
- 2.- OJOS SIMPLES
- 3.- TORAX
- 4.- ALA EXTERIOR
- 5.- ALA INTERIOR
- 6.- ABDOMEN
- 7.- AGUIJON
- 8.- PATA TRASERA
- 9.- PATA MEDIA
- 10.- PATA DELANTERA
- 11.- LENGUETAS
- 12.- MANDIBULA
- 13.- CABEZA
- 14.- ANTENA

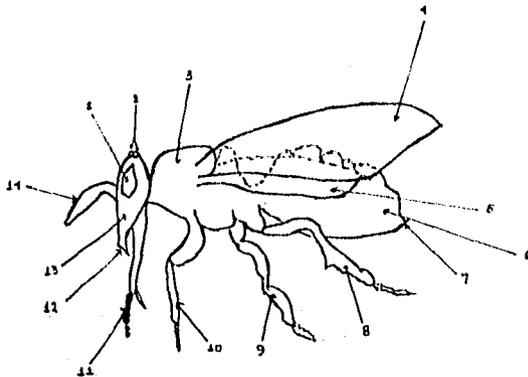


FIG. 2 CONSTITUCION FISICA DE LA ABEJA OBRERA. RESPONSABLE DE LA RECOLECTA DEL PROPOLEOS.

### 2.2.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RECOLECCION DEL PROPOLEOS.

La temperatura parece ser un factor muy importante para el acopio de propóleos. Ya que las temperaturas elevadas siempre ablandan las sustancias cerosas y resinosas, dándoles mayor plasticidad con lo cual se facilita su manejo. Es por ello que la abejas empiezan su labor alrededor de las 10 de la mañana, y con el correr de las horas y el aumento de la temperatura se multiplica su número; y al atardecer su acopio disminuye. Aparentemente el sol ablanda el propóleos facilitando su remoción (26,27,30).

Se dice que la recolección del propóleos, tanto en cantidad como en calidad depende de varios factores como son:

- \* Estación del año: en primavera y cuando se acerca el invierno es cuando se recolecta mayor cantidad.
- \* Un factor geográfico: se recoge más propóleos en regiones arboladas que en llanas.
- \* Tipo de vegetación:
- \* Clima: generalmente hacen el acopio en días calurosos.
- \* La raza de las abejas: las abejas caucásicas y algunas otras razas de Asia Menor producen más propóleos que las demás (15).

### 2.3 UTILIZACION DEL PROPOLEOS DENTRO DE LA COLMENA.

Recién recogido, el propóleos tiene una consistencia blanda, casi líquida; se puede encontrar en cualquier lugar de la colmena. Dentro de la colmena las abejas lo utilizan como material de reparación, de aislamiento y de protección. Por ejemplo para construir, en caso necesario, barreras de defensa; para tapar las ranuras y fisuras de tal modo que la colmena quede herméticamente cerrada para impedir la entrada de visitantes indeseables y tener el mejor aislamiento térmico posible; para reducir la apertura del hueco de vuelo si lo exigen las condiciones climáticas; para arreglar los panales en mal estado; para barnizar todas las superficies dentro de la colmena de modo que las asperezas desaparezcan; recubrir con una fina película los nuevos panales, así como el interior de todas las celdillas antes de que la reina llegue a aovar en ellas, logrando así una desinfección eficaz; sirve también para recubrir animalitos e insectos matados por las abejas y que no pueden ser evacuados de la colmena (2,20,35).

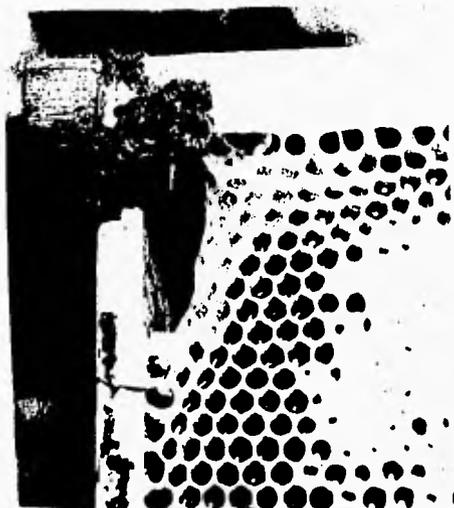
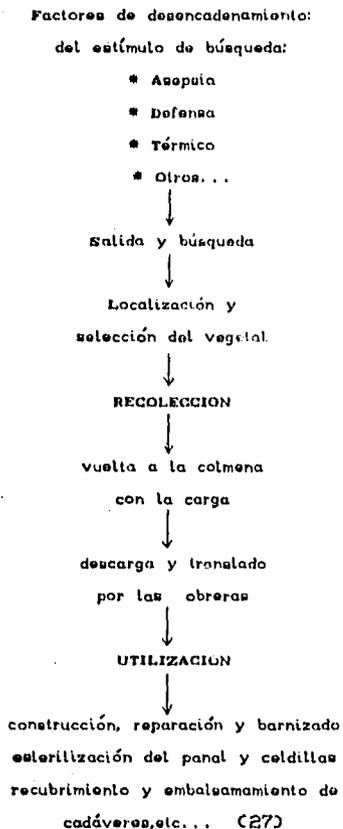


FIG. 3. - UTILIZACION DEL PROPOLEOS DENTRO DE LA COLMENA.

**\*\*\* ESQUEMA RECAPITULATIVO DE LA RECOLECCION Y DE LA UTILIZACION  
DEL PROPOLEOS (PROPOLIS) POR LA ABEJA.**



#### 2.4 RECOLECCION DEL PROPOLEOS DE LA COLMENA POR EL HOMBRE.

Existen diferentes formas de recolección de este producto apícola, las cuales han ido evolucionando y mejorando con el paso del tiempo. La primera técnica y la más antigua es la de RASPADO, que como su nombre lo indica consiste en desprender de los cuadros o paredes de la colmena preferentemente cuando la temperatura es baja de tal modo que el propóleo esté duro y pueda despegarse más fácilmente de la colmena y de la herramienta utilizada (8,12,27).

Esta técnica es la más utilizada, pero tiene un inconveniente, que es la atracción de impurezas durante el raspado entre las cuales se encuentran principalmente pedazos de madera, Castillas propias de la colmena), tierra y pequeñas basuritas.

Para mejorar la pureza del propóleo recolectado se propuso una segunda técnica de recolección mediante la utilización de rejillas; éstas se han hecho de diferentes materiales como son plástico ó fibra de vidrio, pueden ser de forma tejida y matrizada ó simplemente tejida. Las rejillas son colocadas en la parte interna superior de la colmena para que las abejas llenen todos los orificios de propóleos; así al retirar la rejilla se tiene un propóleo más limpio (19,24).

#### 2.5 PURIFICACION DEL PROPOLEOS.

Dadas las propiedades físicas, la solubilidad que más adelante se mencionará en detalle, el procedimiento más sencillo y confiable de purificación del propóleo para consumo humano, es el siguiente:

- \* Obtención del propóleo bruto.
- \* Limpieza con agua.
- \* Secado.
- \* Limpieza con pinzas.

- \* Congelación para endurecerlo.
- \* Fragmentación del propóleo en pequeños pedazos.
- \* Adición de alcohol etílico de 96° (y cerrado del recipiente).
- \* Agitación y reposo durante un tiempo determinado.
- \* Filtración.
- \* Sedimentación del filtrado para separar los pocos sólidos restantes.
- \* Envasado del extracto alcohólico (2).

Las condiciones de concentración de etanol, tiempo de agitación y reposo, dependen básicamente de las personas que lo purifiquen, sin afectar significativamente los principios activos que le dan las propiedades tan importantes como son las antimicrobianas. Esto se ha comprobado con estudios realizados en Cuba con distintos tipos de extracción, variando la concentración del etanol así como la forma de extracción, ya sea con agitación ó sin ella y corroborando que no existe diferencia significativa en el comportamiento del extracto alcohólico ante las pruebas realizadas (1,10,12).

Una vez purificado el propóleo, éste puede ser utilizado en diferentes presentaciones como son:

- \* En forma sólida ó pomada
- \* En emulsión
- \* En soluciones acuosas
- \* En soluciones alcohólicas
- \* En soluciones inyectables
- \* En forma de aceite de propóleo

También puede ser mezclado con otros productos apícolas como lo es la miel, el polen ó la jalea real (2,3,20,35).

## 2.6 UTILIZACION DEL PROPOLEOS POR EL HOMBRE.

El uso del propóleos por el hombre es muy antiguo; ha sido un medicamento natural principalmente utilizado en tratamientos de quemaduras, úlceras y como anestésico natural; algunos autores reportan que tiene efectos superiores a los de cocaína y novocaina (2,27).

Comercialmente se vende en tiendas naturistas, con diversas presentaciones como: jarabe, gotas, mezclado con miel, otros con polen e incluso con jalea real (3,27).

En otros países en donde se ha estudiado un poco más acerca del propóleos, se ha llegado a utilizar en productos más comunes como son: pasta de dientes, cremas faciales, lápices labiales, chicles, entre otros. En Moscú, es utilizado como anestésico, por los dentistas, principalmente (2,3).

Dadas sus propiedades bactericidas actualmente en México es utilizado por médicos naturistas como medicamento contra enfermedades e infecciones de la garganta e igualmente es utilizado como un buen cicatrizante. Su principal presentación es mezclado con miel.

### CAPITULO III.

#### CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL PROPOLEOS.

Las características fisicoquímicas del propóleo se presentan a continuación:

- \* El color varía de amarillo a castaño rojizo, dependiendo de la procedencia.
- \* Su aroma se asemeja al de los brotes del bálsamo de Judea.
- \* El sabor es algunas veces ácido.
- \* Su consistencia varía con la temperatura: dura y cristalina a los 15°C, blanda y maleable a los 30°C y pegajosa y viscosa a mayores temperaturas.
- \* Es insoluble en agua, parcialmente soluble en alcohol 96° y soluble en acetona, benceno, amoníaco, cloroformo y en solución al 2% de sosa cáustica (27,30).

Es por ello que la purificación se realiza utilizando alcohol del 96°, ya que de todos los disolventes es el único que no es tóxico para el hombre, y así puede ser utilizado sin riesgos.

## CAPÍTULO IV.

### COMPOSICION DEL PROPOLEOS.

La composición del propóleo varia según la especie de vegetal visitada por las abejas; presenta numerosas sustancias que se encuentran de manera constante y relativamente estable, lo cual se ha comprobado por trabajos de análisis instrumental realizados en numerosas muestras (4,5,11,12,34).

Generalmente, el propóleo recogido de la colmena está constituido por:

- \* un 50 a 55% de resinas y bálsamos;
- \* un 25 a 35% de cera;
- \* un 10% de aceites volátiles o esenciales;
- \* un 5% de polen (sólo accidentalmente se llega a encontrar polen en el propóleo);
- \* un 5% de diversas materias orgánicas y minerales (2, 8).

Con estudios realizados mediante técnicas analíticas modernas, se ha descubierto la composición química del propóleo; consta básicamente de flavonoides, que son pigmentos vegetales con esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> entre las cuales se encuentran las flavonas, flavononas y flavonoles; contiene además compuestos fenólicos como son los derivados del ácido cinámico conocidos como fenilpropanoides, y trazas de diversos minerales y entre los cuales podemos distinguir el aluminio, bario, calcio, hierro, cobre, magnesio, níquel, titanio y vanadio (6,27). Estos compuestos provienen de diversas especies de plantas y cada uno de ellos presenta un espectro amplio de actividades biológicas entre las que se encuentran:

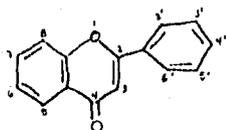
- \* antiinflamatorias
- \* antioxidantes
- \* antibacterianas
- \* antivirales
- \* antifúngicas

(16)

A continuación se presentan los compuestos químicos hasta ahora encontrados en el propóleo.

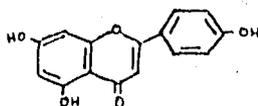
I. - FLAVONOIDES.

a) FLAVONAS.



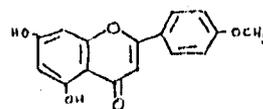
Estructura base de las flavonas.

\* Apigenina



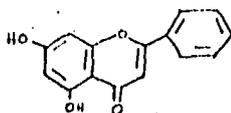
(5,7,4'-trihidroxi flavona)

\* Acacetina



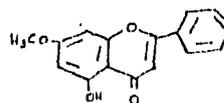
(5,7-dihidroxi,4'-metoxi flavona)

\* Chrysin



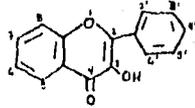
(5,7-dihidroxi flavona)

\* Tectochrysin



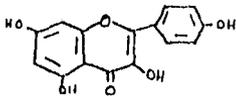
(5-hidroxi,7-metoxi flavona)

b) FLAVONOLES.



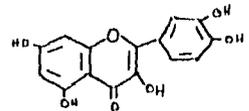
Estructura base de los flavonoles.

\* Kaempferol



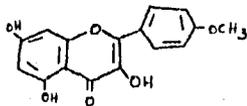
(3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona)

\* Quercetina



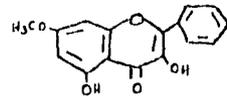
(3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona)

\* Kaempferide



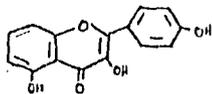
(3,5,7,-trihidroxil,4'-metoxiflavona)

\* Rhamnetina



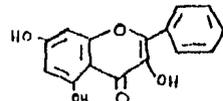
(3,5,3',4'-tetrahidroxil,7-metoxiflavona)

\* Rhamnocitrina

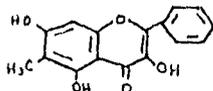


(3,5,4'-trihidroxil,7-metoxi-.....(3,5,7-trihidroxiflavona) flavona)

\* Galangina

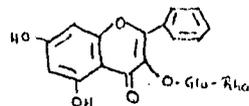


\* Pinoquercitina



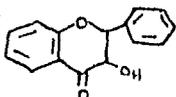
(3,5,7,3',4'-pentahidroxi,6-metil flavona)

\* Rutina



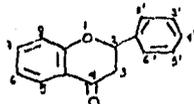
(5,7,3',4'-tetrahidroxi 3-O-rutinosil flavona)

\* Pinobanksina (flavonol)



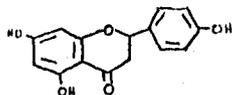
(3,5,7, trihidroxiflavonona)  
(dihidrogalangin)

c) FLAVONONAS.



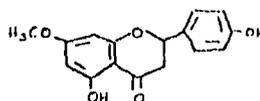
Estructura base de las flavononas.

\* Naringina



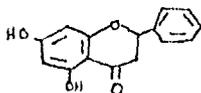
(5,7,4'-trihidroxiflavonona)

\* Sakuranetina



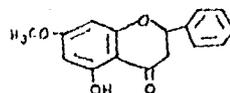
(5,4'-dihidroxi,7-metoxi flavonona)

\* Pinocembrina



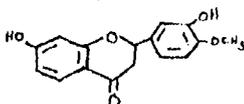
(5,7-dihidroxi flavonona)

\* Pinostróbina



(5-hidroxi, 7-metoxi flavonona)

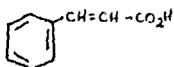
\* Hesperitina



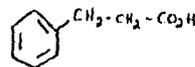
(7,3'-dihidroxi, 4'-metoxi flavonona)

II. FENILPROPANOIDES.

\* Ácido cinámico

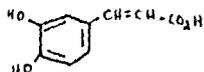


\* Ácido coumárico



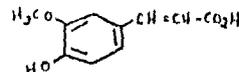
(4-hidroxicinámico)

\* Ácido caféico



(3,4-dihidroxi cinámico)

\* Ácido ferúlico



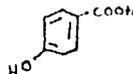
(4-hidroxi 3-metoxi cinámico)

III. COMPUESTOS AROMATICOS.

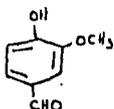
\* Ácido benzoico



\* 4-hidroxi benzoico



\* Vainillina



(5,6,8,13,16,17,18)

Estudios realizados (8,11,12,34) demuestran que de todos los compuestos antes mencionados, los que se encuentran en el propóleo en cantidad significativa son principalmente: apigenina, acacetina, chrysin, kaemferol, quercetina, galangina, pinocembrina, rutina, naringenina, ácido coumárico, ácido benzoico, ácido caféico, ácido ferúlico y vainillina.

Las actividades biológicas atribuidas a estos compuestos, se resumen en la tabla I.

TABLA I.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS  
ENCONTRADOS EN EL PROPOLEOS.

ACTIVIDAD	COMPUESTOS
Bactericida	Ácido benzoico, ácido ferúlico, galangina, pinocembrina, apigenina, naringinina, chrysin, acaetina.
Fungicidas	ácido caféico, ácido ferúlico, rutina, chrysin.
Antioxidantes	Quercetina, Kaemferol.

Entre otras propiedades atribuidas a los flavonoides que se encuentran en el propóleo, están las anestésicas, anti-inflamatorias, cicatrizantes, antireumáticas y fitoinhedoras (10, 13, 27).

La actividad farmacológica de los flavonoides está basada en el metabolismo de estos compuestos. La actividad antimicrobiana que tienen los flavonoides se debe básicamente a que actúan a nivel de síntesis y secreción de proteínas en la formación de células bacterianas, inhibiendo así, la división celular y evitando por lo tanto la separación de las células hijas. Además causan alteraciones en la membrana citoplasmática (16,18,32).

En la composición del propóleo, abundan los flavonoides y por eso es una sustancia muy utilizada, como ya se mencionó anteriormente, en la medicina naturista.

El efecto antioxidante de los flavonoides es atribuido a la quelación de los iones metálicos y la aceptación de radicales libres, un ejemplo es la quercetina, que es un antioxidante efectivo, pero que no ha sido a la fecha utilizado. Los compuestos flavonoides con un mínimo de dos grupos hidroxilo en la posición orto ó en la posición para son buenos antioxidantes (6,17,22,31,29).

Esta habilidad de atrapar radicales libres que tienen los flavonoides ha sido comprobada en el propóleo, mediante el seguimiento de la reacción de oxidación del peróxido de hidrógeno sobre luminol por medio de técnicas avanzadas de quimiluminiscencia. De los flavonoides encontrados en el propóleo los que presentan mayor habilidad para atrapar radicales libres son la quercetina y el kaemferol (22,29,31).

## CAPITULO V.

### CARACTERIZACION DEL PROPOLEOS ESTUDIADO.

#### 5.1.- ORIGEN DE LA MUESTRA.

La muestra de propóleos estudiada proviene del Rancho Cuautoxca, de Agroindustrias Nacionales Cuautoxca, ubicado en Hueylemalco, Pue.

El tipo de floración encontrada en la zona y alrededores del Rancho es mixta; existe gran diversidad de flora silvestre y en su mayoría se cuenta con vegetación de cítricos como los naranjos.

El método de recolección utilizado es por raspado principalmente de la superficie de la tapa y de los bastidores. No quitan por completo todo el propóleos de los bastidores, debido a que interfiere directamente con el rendimiento de miel, ya que las abejas dejan de producir la miel para volver a recubrir la colmena de propóleos y así protegerla.

#### 5.2.- ANALISIS DEL PROPOLEOS CRUDO DEL RANCHO CUAUTOXCA.

El propóleos recolectado de las colmenas contiene:

- \* 8.79% de cenizas (Método oficial AOAC 920.181).
- \* 55.61% de grasa (Método oficial AOAC 920.85).
- \* 0.04% de humedad (Método oficial AOAC 984.20).

#### 5.3.- PURIFICACION DEL PROPOLEOS EMPLEADO EN EL RANCHO CUAUTOXCA.

El método de purificación utilizado fué el siguiente:

- \* Por cada kilogramo de propóleos se agregan dos litros de etanol potable llevado al 60% con agua destilada (v/v).
- \* Se deja reposar por tres meses.

\* Posteriormente se filtra. El residuo se somete a una segunda extracción y el filtrado, por otro lado se mezcla con miel en una proporción de dos litros de extracto alcohólico en 18 litros de miel.

\* Por último se envasa y se utiliza como antiséptico local para la garganta y para cicatrizar heridas.

\*\* Para este trabajo se utilizó el extracto alcohólico del propóleo sin miel.

#### 5.4.- DETERMINACION DE FLAVONOIDES EN EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS.

##### METODOLOGIA.

Al extracto alcohólico de propóleos se le determinó el porcentaje total de flavonoides expresado como quercetina, mediante un método colorimétrico contra una curva patrón del estándar de quercetina (37).

El procedimiento utilizado fué el siguiente:

A 10 ml de etilenglicol al 90% en agua (v/v) se le adicionan 0.2 ml del extracto etanólico de propóleos (diluido 1:5) y se agita vigorosamente. Enseguida se añaden 0.2 ml de una solución de NaOH 4N y se agita nuevamente. Se deja en reposo a temperatura ambiente durante 10 min. y se lee la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20, Baush and Lomb.

La cantidad de flavonoides totales se calculó a partir de una curva patrón de 100µg a 1000µg de quercetina utilizando un blanco con 0.2 ml de etanol.

RESULTADOS.

A continuación se presenta la curva patrón utilizada.

CURVA PATRON DE QUERCETINA	
$\mu\text{g}$ quercetina/ml	Abs (420 nm)
0	0
100	0.02
200	0.087
400	0.139
600	0.265
800	0.303
1000	0.473

Dando una regresión lineal de:

Ord. =  $-0.0168720$

pend. =  $0.00045326$

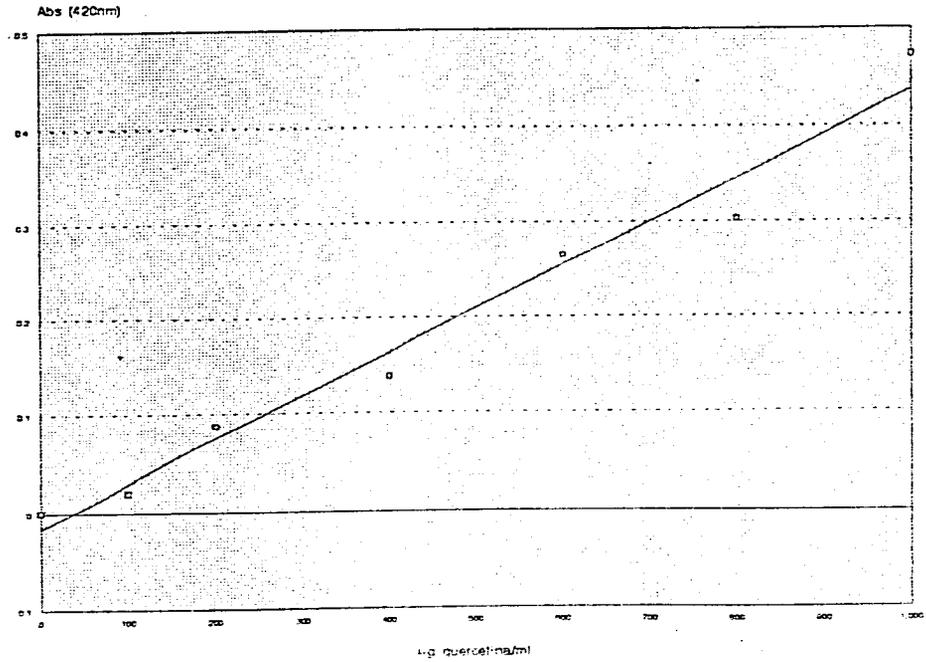
r =  $0.98730101$

La muestra dió una absorbancia de  $0.196$  nm lo cual equivale a  $496.6 \mu\text{g}$  de flavonoides totales expresados como quercetina/ml de extracto etanólico de propóleos.

Tomando en cuenta la dilución realizada a la muestra nos da un total de:  $2483.2 \mu\text{g}$  de flavonoides totales expresados como quercetina/ml de extracto etanólico.

Considerando que un mililitro de extracto etanólico de propóleos contiene aproximadamente  $0.047$  g de propóleos seco, se tendría en la muestra un total de  $5.3$  g de flavonoides por cada  $100$  g de propóleos, con lo que se corrobora lo reportado en estudios realizados a propóleos de diferentes regiones dando un rango de  $3.00$  g a  $6.67$  g de flavonoides por cada  $100$  g de propóleos seco (8).

# CURVA PATRON DE QUERCETINA



## CAPITULO VI.

### EVALUACION DE LA ACCION ANTIMICROBIANA.

#### 6.1.- MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Para evaluar la efectividad inhibitoria *in vitro* del extracto alcohólico de propóleos se trabajó con 5 cepas provenientes del cepario de la Facultad de Química.

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Bacillus subtilis*
- *Streptococcus sp.*
- *Candida albicans*

Se utilizaron cultivos de 24 h. para las bacterias y de 48 h. para *C. albicans*. Las cepas se resembraron dos veces en los medios respectivos indicados en la tabla II con inóculo fuerte y se sometieron a las condiciones mencionadas en la misma, para obtener un inóculo abundante.

TABLA II.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACION DE LAS CEPAS UTILIZADAS.

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO	INCUBACION	
		TEMP. (°C)	TIEMPO (h)
<i>S. aureus</i>	caldo nutritivo	35	24
<i>E. coli</i>	caldo nutritivo	35	24
<i>B. subtilis</i>	caldo nutritivo	35	24
<i>Streptococcus</i>	caldo infusión		
	cerebro corazón	35	24
<i>C. albicans</i>	caldo Sabouraud	28	48

\* Para los ensayos de actividad antimicrobiana se usaron los respectivos medios sólidos.

## 6.2. - CUANTIFICACION DE LOS CULTIVOS MICROBIANOS UTILIZADOS.

Una vez que se obtuvo el inóculo, la población microbiana fué cuantificada turbidimétricamente con un espectrofotómetro Spectronic 20 Bausch and Lomb a una longitud de onda de 600 nm e interpolando los resultados contra la Escala de Mc Farland (establecida en el Manual de Microbiología General de la Facultad de Química).

### ESCALA DE Mc FARLAND

TUBO NUM.	BaCl 1% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (ml)	NUM. APROX. DE MICRO- ORGANISMOS * 10 <sup>6</sup> /ml.	ABS (600nm)
B	Blanco		0	0.0
1	0.1	9.9	300	0.14
2	0.2	9.8	600	0.32
3	0.3	9.7	900	0.44
4	0.4	9.6	1200	0.66
5	0.5	9.5	1500	0.70
6	0.6	9.4	1800	0.82
7	0.7	9.3	2100	0.90
8	0.8	9.2	2400	1.10
9	0.9	9.1	2700	1.15
10	1.0	9.0	3000	1.25

Dando una regresión lineal de:

$$\text{ord.} = 0.0568181$$

$$\text{pend.} = 4.15454 \times 10^{-4}$$

$$r = 0.99321231$$

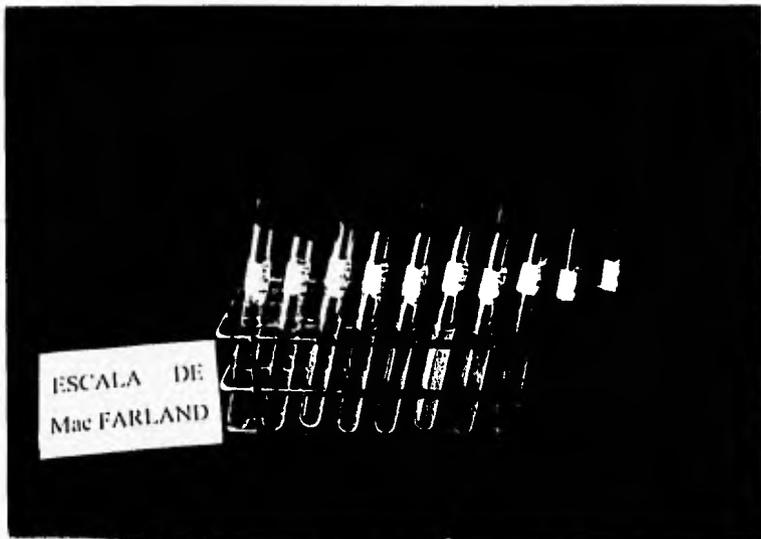
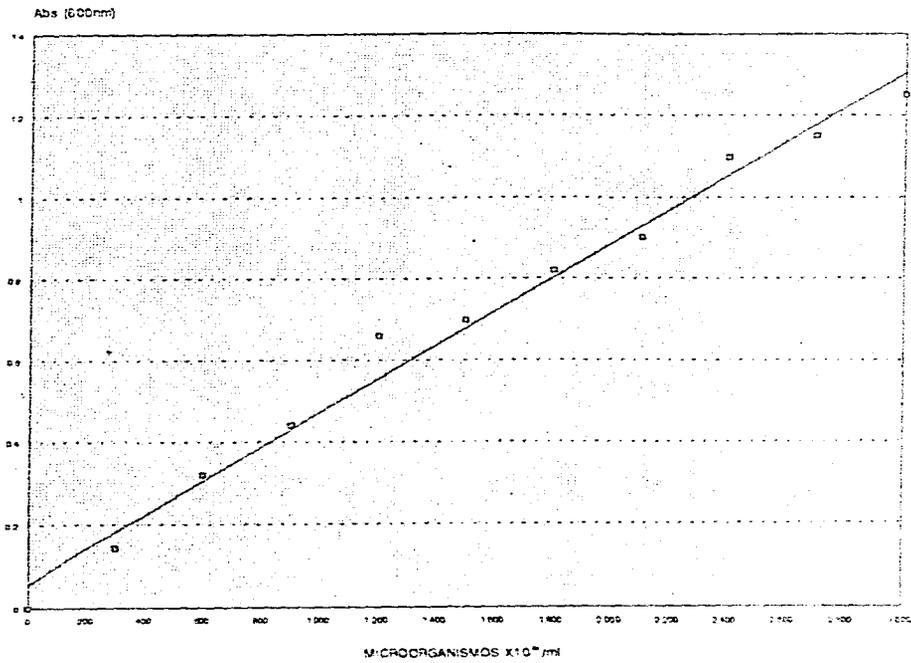


FIG. 4. - ESCALA DE MC. FARLAND

## ESCALA DE MC FARLAND



### 6.3.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS.

#### METODOLOGIA.

Una vez cuantificada la suspensión microbiana se prosiguió a determinar la acción antimicrobiana del extracto alcohólico de propóleos empleando el método de difusión radial (figura 5).

Se utilizaron los medios solidificados con agar y las condiciones de incubación ya citadas en la tabla II. En los cuales se inoculó 0.1ml de suspensión microbiana sobre la superficie del medio sólido y se extendió con una varilla estéril; posteriormente se colocaron los discos de papel filtro esteriles con 6 mm de diámetro impregnados con las respectivas sustancias. Por último, después de incubar los cultivos se midió el diámetro de los halos de inhibición (9,10,25,26).

Se realizaron diez pruebas para cada microorganismo; utilizando suspensiones microbianas con diferentes densidades de población determinadas mediante la escala de Mc Farland; cinco pruebas se realizaron con poblaciones por arriba de 70 millones de microorganismos por mililitro y cinco pruebas con poblaciones de 2 a 10 millones de microorganismos por mililitro.

A continuación se presenta el diagrama de trabajo:

## DIAGRAMA DE TRABAJO METODO: DIFUSION RADIAL

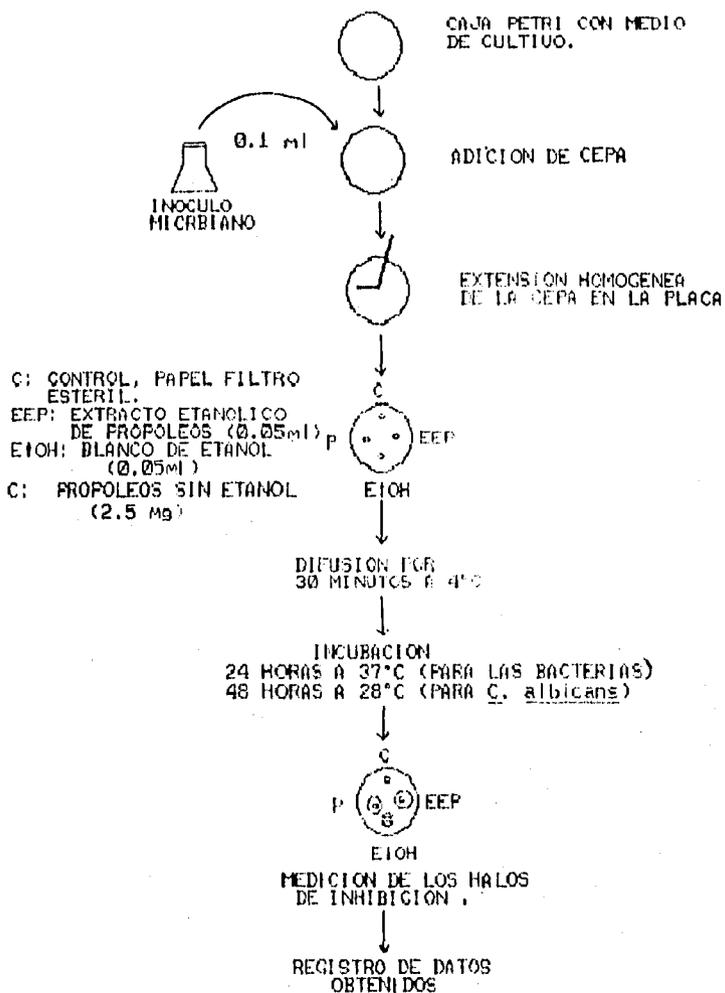


Fig. 5.- Diagrama de trabajo del método de difusión radial utilizado para determinar la acción antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos.

RESULTADOS.

A continuación se presentan las tablas de resultados obtenidos con las poblaciones microbianas más altas y posteriormente con las concentraciones más bajas de microorganismos.

TABLA III.- HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Candida albicans* ANTE EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS EN ETANOL.

NUM. DE MICROORGANISMOS $\times 10^6$ /ml	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION <i>Como</i>		
	Extracto etanólico de propóleos (E.E.P.)	Etanol (E.E.O.)	Propóleos en Etanol (P.E.)
79	7.0	6.7	6.9
72	8.5	6.5	7.0
70	10.0	6.5	7.0
70	10.5	6.3	7.2
67	9.0	6.3	7.2
MEDIA	9.0	6.5	7.06
DESVIACION (MUESTRA)	1.3993	0.1414	0.134
(POBLACION)	1.2247	0.1224	0.12

TABLA IV. - HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Candida albicans* ANTE EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUMERO DE MICROORGANISMOS :  $9 \times 10^6 \mu\text{os/ml}$

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)			
	Extracto etanólico de propóleos (EEP)	Etanol (ELOH)	Propóleos sin Etanol (P)
	12	8	7
	16	11	8
	15	10	8
	16	8	10
	14	9	10
MEDIA	14.4	9.2	8.6
DESVIACION (MUESTRA)	1.5165	1.3038	1.3416
(POBLACIONAL)	1.3566	1.1661	1.2

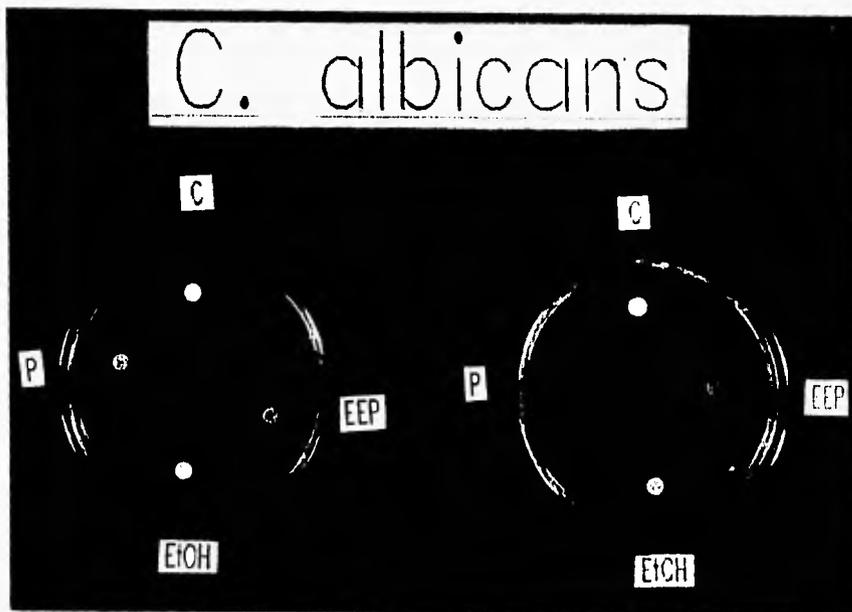


FIG. 6. - ZONAS DE INHIBICION QUE PRESENTA *C. albicans* FRENTE AL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS (EEP), AL ETANOL (EtOH) Y AL PROPOLEOS SIN ETANOL (P).

TABLA V. - HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Bacillus subtilis* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUM. DE MICROORGANISMOS * 10 <sup>6</sup> /ml	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)		
	Extracto etanólico de propóleos. (CEEP)	Etanol (CEOH)	Propóleos sin Etanol. (CP)
103	8.5	7.6	7.0
91	9.0	6.8	7.0
79	10.0	7.0	8.0
79	12.0	9.0	9.0
67	9.0	8.0	6.5
MEDIA	9.7	7.62	7.5
DESVIACION (MUESTRA)	1.3964	0.9802	1.0
POBLACION	1.2489	0.8588	0.8944

TABLA VI.- HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Bacillus subtilis* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUMERO DE MICROORGANISMOS:  $4 \times 10^6 \mu\text{os/ml}$

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)			
	Extracto etanólico de propóleos (EEP)	Etanol (EtOH)	Propóleos sin Etanol (P)
	30	17	15
	24	18	14
	36	16	13
	28	15	18
	30	18	10
MEDIA	29.6	16.8	14.0
DESVIACION (MUESTRA)	4.3358	1.3039	2.9154
(POBLACIONAL)	3.8781	1.1661	2.6076

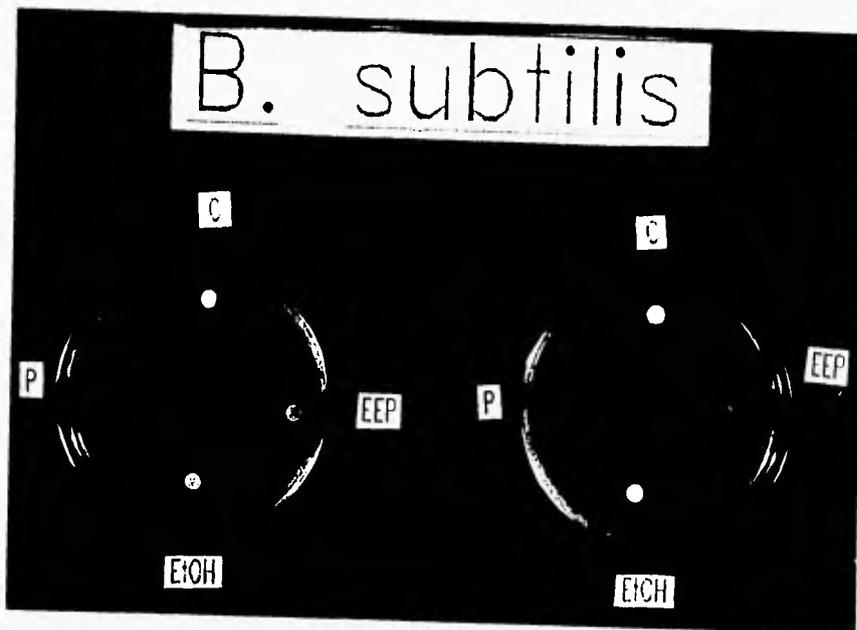


FIG. 7.- ZONAS DE INHIBICION QUE PRESENTA *B. subtilis* FRENTE AL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS (EEP), AL ETANOL (EtOH) Y AL PROPOLEOS SIN ETANOL (P).

TABLA VII. - HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Streptococcus sp.* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUM. DE MICROORGANISMOS * 10 <sup>6</sup> /ml	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)		
	Extracto etanólico de propóleos. (CEEP)	Etanol (E10H)	Propóleos sin Etanol. (CP)
874	8.0	7.0	7.5
874	10.5	7.0	9.0
850	10.0	7.0	8.0
777	8.5	8.0	7.0
728	9.0	10.0	neg.
MEDIA	9.2	7.8	7.875
DESVIACION (MUESTRA)	1.0368	1.3038	0.8539
(POBLACION)	0.9273	1.1662	0.7395

TABLA VIII.- HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Streptococcus sp.* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUMERO DE MICROORGANISMOS :  $7 \times 10^6 \mu\text{os/ml}$

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)			
	Extracto etanólico de propóleos (EEP)	Etanol (ELOH)	Propóleos sin Etanol (P)
	11	8	10
	11	13	8
	10	9	9
	10	11	9
	14	12	10
MEDIA	11.2	10.6	9.2
DESVIACION (MUESTRA)	1.6431	2.0736	0.8366
(POBLACIONAL)	1.4696	1.8547	0.7483



FIG. B.- ZONAS DE INHIBICION QUE PRESENTA *Streptococcus sp.* FRENTE AL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS (EEP), AL ETANOL (EtOH) Y AL PROPOLEOS SIN ETANOL (P).

TABLA IX. - HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Staphylococcus aureus* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL, Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUM. DE MICROORGANISMOS * 10 <sup>6</sup> /ml	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)		
	Extracto etanólico de propóleos. (EEP)	Etanol (EtOH)	Propóleos sin Etanol. (P)
994	11.0	9.0	8.0
922	13.0	10.0	8.0
922	8.0	7.0	6.8
898	7.5	7.0	7.0
874	8.5	7.0	7.0
MEDIA	9.6	8.0	7.36
DESVIACION (MUESTRA)	2.3291	1.4142	0.5899
(POBLACION)	2.0832	1.2649	0.5276

TABLA X.- HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Staphylococcus aureus* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUMERO DE MICROORGANISMOS :  $2 \times 10^6 \mu\text{os/ml}$

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)			
	Extracto etanólico de propóleos (EEP)	Etanol (EtOH)	Propóleos sin Etanol (P)
	20	15	13
	22	15	20
	20	12	18
	21	12	14
	24	16	13
MEDIA	21.4	14.0	15.6
DESVIACION (MUESTRA)	1.6733	1.8708	3.2093
(POBLACIONAL)	1.4966	1.6733	2.8705

TABLA X. - HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Staphylococcus aureus* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUMERO DE MICROORGANISMOS :  $2 * 10^6$  uos/ml

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION Cmm			
	Extracto etanólico de propóleos (EEP)	Etanol (EtOH)	Propóleos sin Etanol (P)
	20	15	13
	22	15	20
	20	12	18
	21	12	14
	24	16	13
MEDIA	21.4	14.0	15.6
DESVIACION (MUESTRA)	1.8733	1.8708	3.2093
(POBLACIONAL)	1.4866	1.6733	2.8705

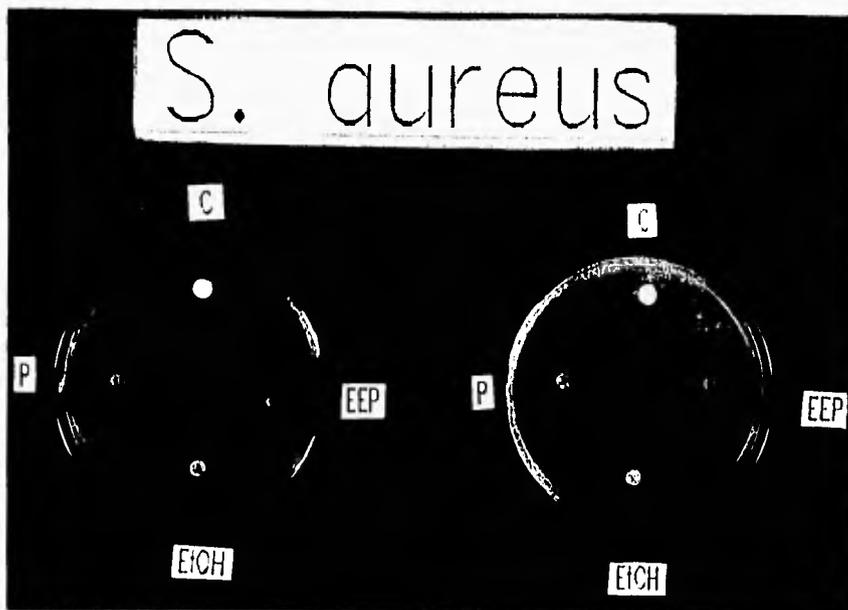


FIG. 9. - ZONAS DE INHIBICION QUE PRESENTA *S. aureus* FRENTE AL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS (EEP), AL ETANOL (EICH) Y AL PROPOLEOS SIN ETANOL (P).

TABLA XI. - HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Escherichia coli* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPOLEOS SIN ETANOL.

NUM. DE MICROORGANISMOS * 10 <sup>6</sup> /ml	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)		
	Extracto etanólico de propóleos. (EEP)	Etanol (EtOH)	Propóleos sin Etanol. (P)
874	neg.	6.1	neg.
777	neg.	6.2	6.2
705	neg.	neg.	neg.
609	6.1	neg.	neg.
609	6.02	6.4	neg.
MEDIA	6.15	6.233	neg.
DESVIACION (MUESTRA)	0.0707	0.1527	neg.
(POBLACION)	0.05	0.1247	neg.

TABLA XII.- HALOS DE INHIBICION PRESENTADOS POR *Escherichia coli* CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS, EL ETANOL Y EL PROPÓLEOS SIN ETANOL.

NUMERO DE MICROORGANISMOS :  $10 \times 10^6 \mu\text{os/ml}$

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)			
	Extracto etanólico de propóleos (EEP)	Etanol (EtOH)	Propóleos sin Etanol (P)
	12	11	8
	12	10	neg.
	13	13	neg.
	11	10	neg.
	11	10	8
MEDIA	11.8	10.8	neg.
DESVIACION (MUESTRA)	0.8366	1.3038	neg.
(POBLACIONAL)	0.7483	1.1861	neg.



FIG. 10. - ZONAS DE INHIBICION QUE PRESENTA *E. coli*.

#### 6.4.- DETERMINACION DE LA ACCION ANTIMICROBIANA DEL PROPOLEOS SIN ETANOL.

##### METODOLOGIA.

Mediante el método de difusión radial se demostró el efecto inhibitor del propóleo sobre algunas de las cepas en estudio, pero también se hizo evidente un efecto sinérgico con el etanol utilizado para purificar el propóleo y formar el extracto.

Por ello se realizó una prueba semicuantitativa, la cual consistió en evaporar a sequedad el extracto etanólico de propóleo. El propóleo seco se resuspendió en agua destilada estéril llevada a un pH de 8.9 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  para ayudar a la disolución del propóleo y posteriormente se adicionó el medio de cultivo ajustando el pH a 7.1. Una vez solidificado el medio, los microorganismos se sembraron por estria y se comparó el crecimiento obtenido en el medio libre de inhibidores contra medios con diferentes concentraciones de propóleo.

Todo se realizó con material estéril, bajo campana de flujo laminar y en zona aséptica.

El diagrama de trabajo se muestra a continuación:

# DIAGRAMA DE TRABAJO

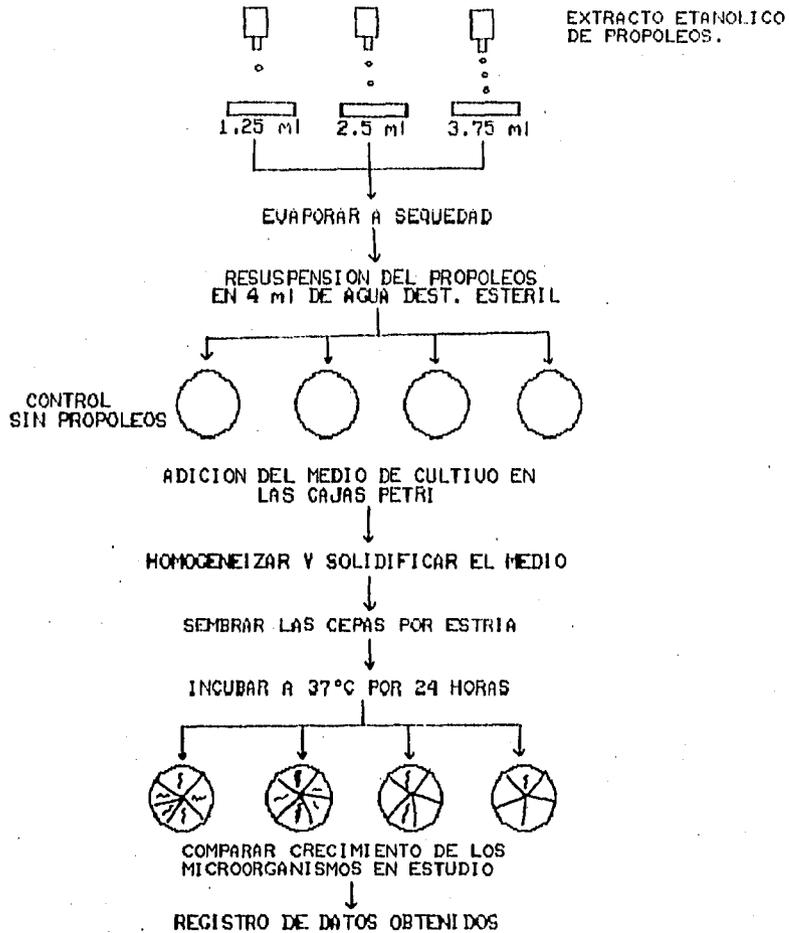


Fig. 11.- Diagrama de trabajo para determinar la acción antimicrobiana del propóleo sin etanol.

RESULTADOS.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

TABLA XIII.- EFECTO DEL PROPOLEOS SIN ETANOL  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEOS (ml)	0.0	1.25	2.50	3.75
PESO DEL PROPOLEOS SECO (g)	0.0	0.0587	0.1184	0.2197
CONC. DEL PROPOLEOS EN EL MEDIO (%)	0.0	0.3	0.6	1.1
CRECIMIENTO DE:				
<i>C. albicans</i>	+++	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	+++	+	-	-
<i>Streptococcus sp.</i>	+++	+	-	-
<i>S. aureus</i>	+++	+++	+	-
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++

+++ : crecimiento masivo.

+ : poco crecimiento.

- : no hubo crecimiento.



FIG. 12. - MUESTRA EL CRECIMIENTO MASIVO DE TODAS LAS CEPAS EN ESTUDIO EN UN MEDIO LIBRE DE PROPOLEOS.

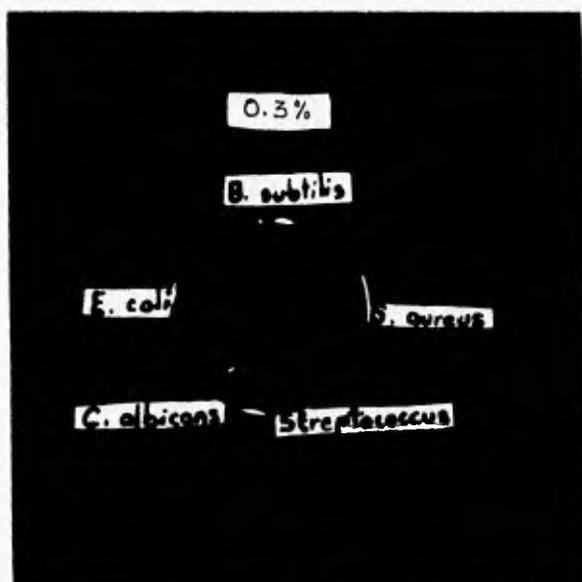
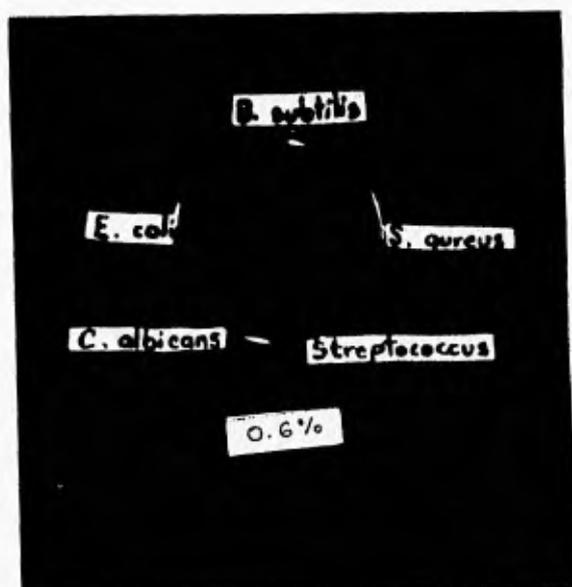


FIG. 13. - MUESTRA EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN UN MEDIO CON 0.3% DE PROPOLEOS SIN ETANOL, DANDO UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN EL CRECIMIENTO DE *B. subtilis*, *Streptococcus sp.* y *C. albicans*. *E. coli* y *S. aureus* MANTIENEN UN CRECIMIENTO MASIVO.



10. 14.- MUESTRA EL COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO EN UN MEDIO CON 0.6% DE PROPOLEOS, DONDE YA SOLO *S. aureus* Y *E. coli* PRESENTAN RESISTENCIA AL INHIBIDOR.



FIG. 15.- MUESTRA QUE *E. coli* ES LA BACTERIA MAS RESISTENTE, MANTENIENDO UN CRECIMIENTO MASIVO A UNA CONCENTRACION DE 1.1% DE PROPOLEOS.

## CAPITULO VII.

### EVALUACION DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL PROPOLEOS.

#### METODOLOGIA.

Para evaluar el efecto antioxidante del propóleos, se utilizó aceite de soya recién obtenido, al cual se le agregó el propóleos en concentraciones de 0.03% y 0.1% y se evaluó bajo cuatro diferentes condiciones.

Se trabajó también con aceite de soya sin antioxidante como testigo, y con aceite de soya comercial, del mismo productor.

Las condiciones a las que se sometieron los aceites fueron las siguientes:

- I.- Temperatura ambiente y oscuridad.
- II.- Expuesto a la luz, a temperatura ambiente.
- III.- En refrigeración.
- IV.- Sometido a oxigenación utilizando una bomba de oxígeno y expuesto a la luz.

Se dió seguimiento a los diferentes aceites durante 20 días, durante los cuales se observaron los cambios que presentaban y se determinó el grado de oxidación, determinando su índice de acidez mediante el método 41.1.21 del AOAC; el cual define el índice de acidez como el número de miligramos de KOH necesarios para neutralizar 1g de aceite. Para su determinación se utilizó una solución de KOH 0.02N y se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ ácido oleico} = \frac{\text{ml gastados} \times N \times 0.0282 \times 100}{\text{g de muestra}}$$

$$\text{Índice de acidez} = \% \text{ ácido oleico} \times 1.99$$

## RESULTADOS.

A continuación se presentan los cuadros de resultados con sus respectivas gráficas; mostrando la variación del índice de acidez con respecto al tiempo de cada uno de los aceites sometidos a diferentes condiciones.

TABLA XIV .- CONDICIONES: A TEMPERATURA AMBIENTE Y OSCURIDAD.

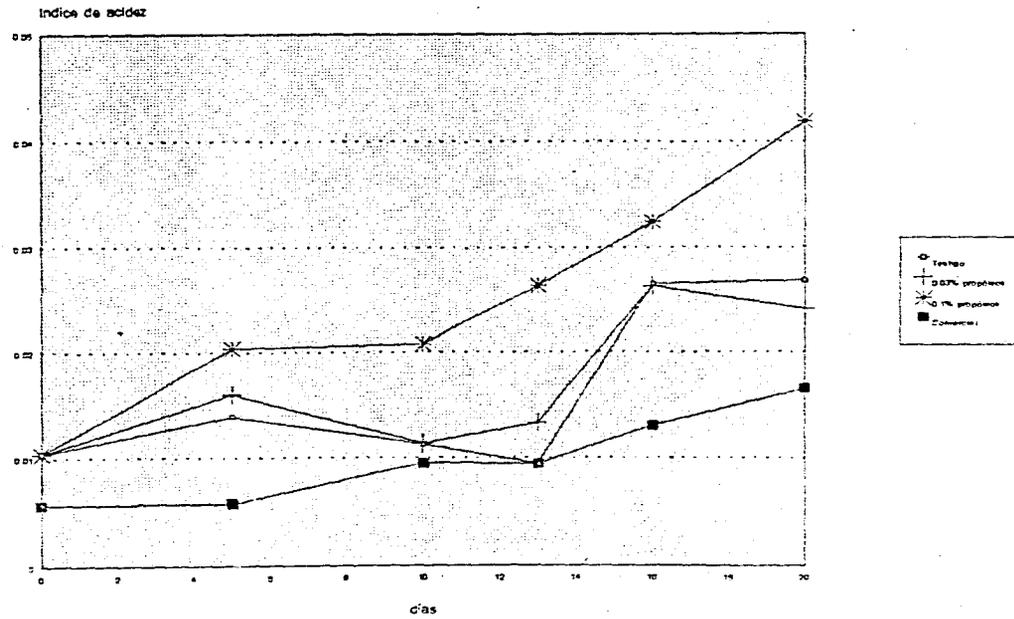
### I N D I C E   D E   A C I D E Z

DIA	TESTIGO	0.03% PROPOLEOS	0.1% PROPOLEOS	COMERCIAL
0	0.0104	0.0104	0.0104	0.0057
5	0.0140	0.0161	0.0204	0.0058
10	0.0113	0.0114	0.0208	0.0095
13	0.0094	0.0134	0.0264	0.0094
16	0.0265	0.0263	0.0324	0.0131
20	0.0268	0.0241	0.0419	0.0165

\* TESTIGO: Aceite sin antioxidante.

\* COMERCIAL: Aceite con antioxidantes BHA y BHT

## VARIACION DEL INDICE DE ACIDEZ DEL ACEITE DE SOYA CON RESPECTO AL TIEMPO



CONDICION 1: TEMPERATURA AMBIENTE Y OSCURIDAD

TABLA XV. - CONDICIONES: EXPUESTO A LA LUZ Y A TEMPERATURA AMBIENTE.

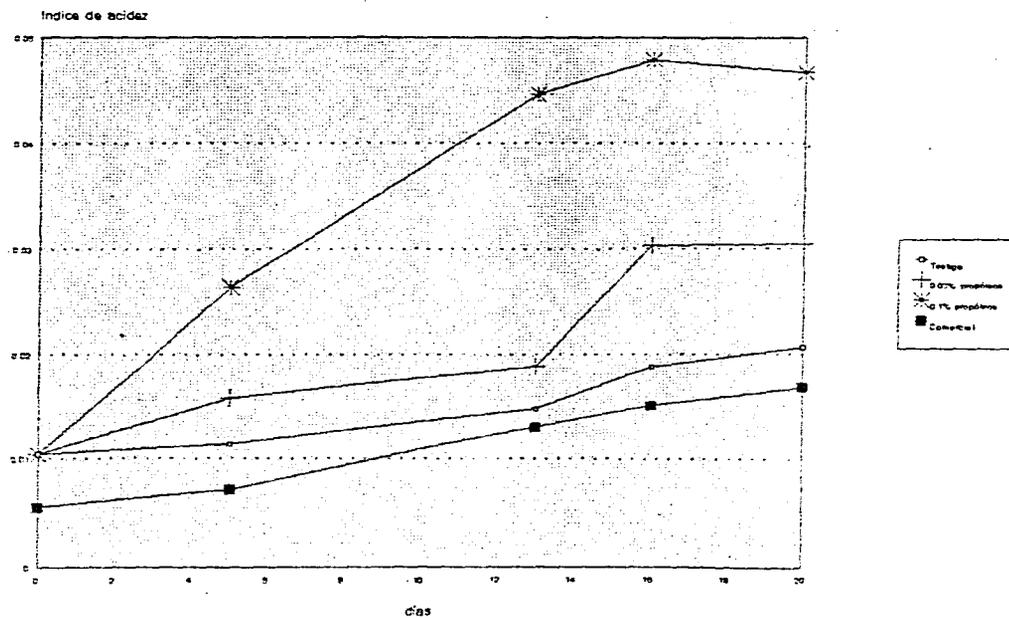
I N D I C E D E A C I D E Z

DIA	TESTIGO	0.03% PROPOLEOS	0.1% PROPOLEOS	COMERCIAL
0	0.0104	0.0104	0.0104	0.0057
5	0.0113	0.0158	0.0263	0.0073
13	0.0147	0.0188	0.0447	0.0129
16	0.0187	0.0303	0.0479	0.0150
20	0.0207	0.0305	0.0467	0.0168

\* TESTIGO: Aceite sin antioxidante.

\* COMERCIAL: Aceite con antioxidantes BHA y BHT

## VARIACION DEL INDICE DE ACIDEZ DEL ACEITE DE SOYA CON RESPECTO AL TIEMPO



CONDICION 2: PRESENCIA DE LUZ

TABLA XVI. - CONDICION: EN REFRIGERACION

I N D I C E D E A C I D E Z

DIA	TESTIGO	0.03% PROPOLEOS	0.1% PROPOLEOS	COMERCIAL
0	0.0104	0.0104	0.0104	0.0057
5	0.0133	0.0130	0.0176	0.0057
10	0.0111	0.0132	0.0308	0.0092
13	0.0185	0.0169	0.0381	0.0151
16	0.0170	0.0208	0.0283	0.0169
20	0.0187	0.0217	0.0304	0.0178

\* TESTIGO: Aceite sin antioxidante.

\* COMERCIAL: Aceite con antioxidantes BHA y BHT

## VARIACION DEL INDICE DE ACIDEZ DEL ACEITE DE SOYA CON RESPECTO AL TIEMPO

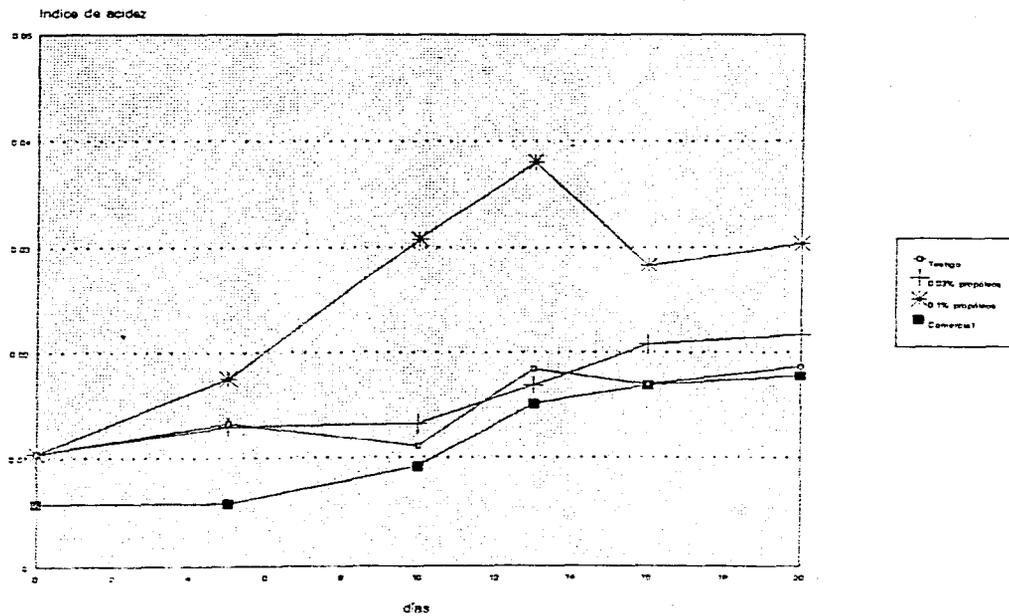


TABLA XVII. - CONDICIONES: SOMETIDO A OXIGENACION Y EXPUESTO A LUZ.

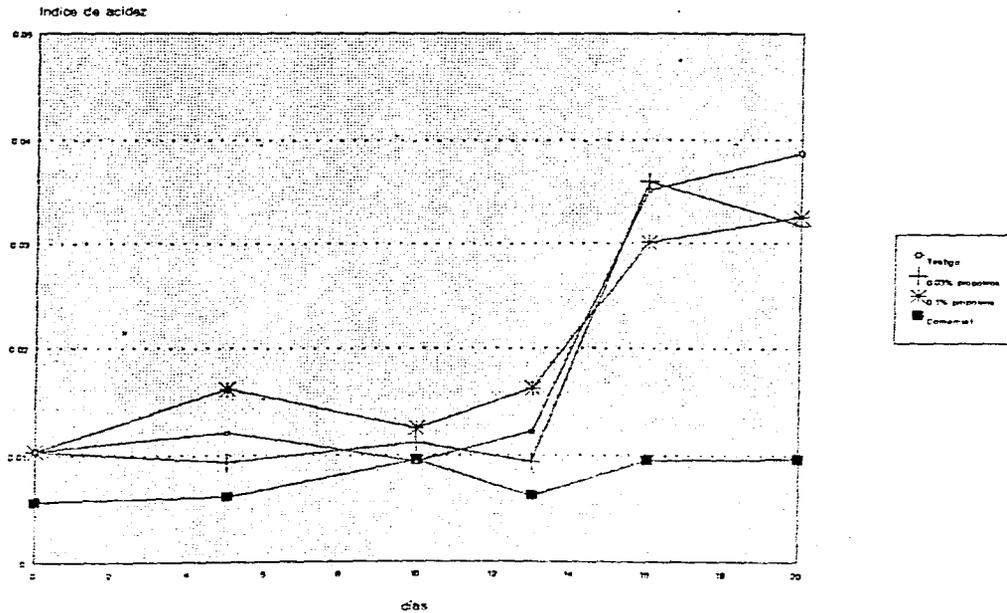
I N D I C E D E A C I D E Z

DIA	TESTIGO	0.03% PROPOLEOS	0.1% PROPOLEOS	COMERCIAL
0	0.0104	0.0104	0.0104	0.0057
5	0.0122	0.0094	0.0163	0.0062
10	0.0094	0.0112	0.0126	0.0096
13	0.0122	0.0094	0.0163	0.0062
16	0.0352	0.0361	0.0301	0.0096
20	0.0387	0.0317	0.0325	0.0097

\* TESTIGO: Aceite sin antioxidante.

\* COMERCIAL: Aceite con antioxidantes BHA y BHT

## VARIACION DEL INDICE DE ACIDEZ DEL ACEITE DE SOYA CON RESPECTO AL TIEMPO



CONDICION 4: OXIGENACION

## CAPITULO VIII.

### DISCUSION DE RESULTADOS.

#### a) ACCION ANTIMICROBIANA.

Con los diámetros de los halos de inhibición se determinaron las medias aritméticas y sus respectivas desviaciones, para el extracto alcohólico de propóleos, el EtOH y el propóleos sin etanol. Como se puede apreciar, se presenta inhibición en las bacterias Gram positivas: *B. subtilis*, *S. aureus* y *Streptococcus sp.* y en la levadura: *C. albicans*; en todos los casos la acción antimicrobiana del extracto alcohólico de propóleos es mayor que la acción del etanol y del propóleos por separado. El extracto alcohólico de propóleos tiene efecto inhibitor similar sobre las cuatro cepas antes mencionadas, como se observa en los resultados.

Como era de esperarse el efecto inhibitor del propóleos sobre estos microorganismos es menos evidente en mayores concentraciones de microorganismos, aunque no se presenta una relación proporcional entre la densidad de población y el diámetro del halo de inhibición como se observa en las repeticiones para cada microorganismo.

De cualquier manera, las concentraciones de microorganismos estudiadas son muy altas en comparación con las que pueden esperarse en alimentos.

En cuanto al efecto del etanol y el propóleos por separado, se observa que ambos producen una inhibición semejante. En comparación con ésta el extracto etanólico de propóleos, tiene un efecto inhibitor 30% mayor al etanol y propóleos sin etanol cuando se utilizan poblaciones microbianas elevadas y del 80% al 90% más cuando se aplica sobre poblaciones menores de microorganismos.

La bacteria Gram negativa, *E. coli* es resistente al propóleos, como se puede observar en la tabla de resultados correspondiente; sólo el etanol produce una ligera inhibición ya que el propóleos sin etanol no produce ningún efecto. En los experimentos con menor población, el extracto etanólico de propóleos presenta una zona de inhibición que se debe básicamente al efecto del etanol, ya que como se puede apreciar la inhibición causada por el etanol es muy similar a la producida por el extracto etanólico de propóleos. El propóleos presenta sólo en dos casos una zona muy pequeña de inhibición que no es representativa.

Todo ello nos indica que el propóleos por sí sólo si tiene acción antimicrobiana notable, pero se presenta un efecto sinérgico con el etanol, por lo que el extracto etanólico del propóleos es más eficaz.

Esto se corrobora con los resultados del experimento con diferentes concentraciones de propóleos libre de etanol.

Se puede observar la resistencia que presentó *E. coli* a una concentración de propóleos de 1.1 % y la eficacia del propóleos a concentraciones tan bajas como 0.3 %, 0.6 % y 1.1 %, contra las bacterias gram positivas y *C. albicans*. (ver figuras 10, 11, 12 y 13)

Como se puede observar, *S. aureus* es un poco más resistente ya que se inhibió sólo con una concentración de 1.1 % de propóleos a diferencia de *B. subtilis*, *Streptococcus sp.* y *C. albicans* que presentaron poco crecimiento con 0.3% de propóleos y se inhibieron por completo a una concentración de 0.6% de propóleos..

Dado que el propóleos estudiado tiene un contenido significativo de flavonoides, 5.3 g de flavonoides expresado como quercetina por 100 g de propóleos, parte del efecto antimicrobiano mostrado por el propóleos puede provenir éstos; ya que existen reportes de la acción bactericida que tienen los flavonoides sobre diversos microorganismos (8,16,18,32).

#### b) EFECTO ANTIOXIDANTE.

De acuerdo con a los resultados obtenidos, se observa que el aceite con 0.03% de propóleos presenta un comportamiento similar al testigo: aceite de soya sin antioxidante; aunque con un índice de acidez ligeramente mayor en el que contiene propóleos que en el testigo. En cambio este efecto está mucho más marcado en el aceite que contiene 0.1% de propóleos, cuyo índice de acidez es bastante mayor que el del testigo, lo que nos indica que no está evitando la hidrólisis de los ácidos grasos del aceite, sino que tal vez la está favoreciendo. En especial en las condiciones de: temperatura ambiente y oscuridad, expuesto a la luz y refrigeración se observa un efecto adverso, incrementándose el índice de acidez; probablemente el propóleos esta actuando como un catalizador, o al menos iniciador de la rancidez hidrolítica del aceite. Caso contrario es el presentado por el aceite comercial que contiene BHT Y BHA y que en todas las condiciones presenta menores índices de acidez.

Cabe mencionar que las características sensoriales que presentaron las muestras de aceite con propóleos no eran muy agradables, ya que presentaron un color más oscuro que el del aceite comercial. El olor rancio se percibió en un tiempo mas corto en el aceite expuesto a la luz y a temperatura ambiente, siguiendo el aceite sometido a oxigenación. Los aceites en refrigeración y a temperatura ambiente en oscuridad no presentaron olor rancio sino después de 16 días.

Por todo lo anterior podemos decir que el propóleos en el aceite vegetal no muestra el efecto antioxidante, a pesar de los flavonoides presentes en el propóleos bajo estudio.

Aunque el efecto antioxidante del propóleos ha sido demostrado en las reacciones de oxidación del permanganato de potasio y en la reacción del agua oxigenada con el luminol (8,22), no es aplicable a aceites comestibles.

## CAPITULO IX.

### CONCLUSIONES.

- \* El propóleo producido en el Rancho Cuautoxca en Hueytemalco, Pue. tiene 5.3 g de flavonoides por cada 100 g de propóleos, cantidad altamente significativa como principio activo.
  
- \* El propóleo por si sólo tiene acción antimicrobiana eficiente contra bacterias gram positivas importantes en alimentos como son: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sp.* y contra la levadura *Candida albicans*, presentando un efecto sinérgico con el etanol, lo que hace aún más efectivo el extracto etanólico de propóleos.
  
- \* Es un inhibidor efectivo contra dichas bacterias aún en poblaciones muy grandes.
  
- \* La bacteria gram negativa, *Escherichia coli*, es resistente: no es sensible al efecto inhibidor del propóleos.
  
- \* El propóleos no presenta efecto antioxidante en el aceite de soya; por el contrario tiene efecto pro - oxidante, a una concentración de 0.03% y mayor aún a una concentración de 0.1%.

## CAPITULO X.

### RECOMENDACIONES.

Para completar el estudio sobre el propóleos se recomienda:

- \* Probar el propóleos como un antimicrobiano en un sistema alimenticio.
- \* Hacer un estudio profundo sobre la composición del propóleos, cuantificando cada componente, para poder predecir y aprovechar mejor sus propiedades.
- \* Optimizar el proceso de recolección y purificación del propóleos hasta ahora empleado para mejorar los rendimientos.
- \* Verificar si en la composición del propóleos determinada experimentalmente, contiene los flavonoides o compuestos fenólicos que contribuyen al efecto antioxidante.
- \* En el caso de contener cantidades significativas de compuestos que puedan darle el efecto antioxidante, experimentar con concentraciones menores de propóleos a las utilizadas en el presente estudio y probar en diferentes sistemas alimentarios susceptibles a la oxidación.
- \* Profundizar el estudio sobre la acción antimicrobiana que presenta el propóleos sobre las bacterias Gram positivas, mediante estudios de microcalorimetría y microscopía electrónica.

## CAPITULO XI.

### BIBLIOGRAFIA

1. - Aldama Jaime R.E. 1986. Evaluación del efecto cicatrizante de los Propóleos mediante tensión de heridas. Tesis. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México
2. - Anónimo. 1994. Propóleos. Depto. de Apicultura. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). México D.F.
3. - Anónimo. 1995. Report of the best from the beehive...Naturally. Beehive Botanicals International.
4. - Bankova V.S., Christov R., Sloev G. and Popov S.. Determination of phenolics from propolis by capillary Gas Chromatography. Journal of Chromatography 1992, 607, 150-153.
5. - Bankova V.S., Popov S. and Marekov N.L.. High Performance Liquid Chromatographic analysis of flavonoids from propolis. Journal of Chromatography 1982, 242, 135-143.
6. - Barberan F.A.T.. The flavonoid compounds from the Labiales. Fitoterapia. 1986, 57, 67.
7. - Benedetti L., Piaralli L. Apicultura. 1982. Editorial Omega, Barcelona. p 112.
8. - Bonvehi Joseph S., Ventura F.Coll. and Escola R.J.. The composition, active components and bacteriostatic activity of Propolis in Dietetics. Journal American Oil Chemistry Society 1994, 71 (5), 529-532.
9. - Brock T.D.. Microbiología. 1991. Hispanoamericana S.A. p. 260-262.

- 10.- Brumfitt W., Hamilton M., Franklin I.. Antibiotic activity of natural products: Propolis. Microbios. 1990, 62, 19-22.
- 11.- Chritov R. and Bankova V.S.. Chromatographic analysis of underivatized phenolics constituents from propolis using an electron-capture detector. Journal Of Chromatography 1992, 623, 182-185.
- 12.- Cuellar C. A.. Componentes químicos del propóleos. Revista Cubana de Farmacia. 1987, 21 (3), 365-372.
- 13.- Daniel Santos de los Santos. 1990. Flavonoides adicionales de dodonaeu viscosa. Tesis. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
- 14.- Davison P.M., Parish M.E.. Methods for testing the Efficacy of food antimicrobials. Food Technology. 1989, 61, 148-155.
- 15.- Gil S.J.M.. Apicultura. 1980. Editorial AEDOS Barcelona. p. 9.
- 16.- Harbone J.B.. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. 1967. Academic Press London-New York. p. 39, 54, 60, 75-87.
- 17.- Harbone J.B. The Flavonoids. 1975. Academic Press London-New York. p. 28- 30, 325-328.
- 18.- Harbone J.B.. The Flavonoids. Advances in Research. 1980. Chapman and Hall. London- New York. p. 310, 349, 355-360.
- 19.- Hooper T. Las abejas y la miel. Guia del apicultor. 1982. Editorial El Ateneo. p. 292.
- 20.- Iannuzzi John. High Profits from lowly Propolis. American Bee Journal, 1990, 137 (4), 237-238.

- 21.- Iorish N., Las abejas farmaceuticas aladas, 1985. Editorial Mir Moscú. p.25.
- 22.- Krol W., Czuba Z., Scheller S. and Gabrys J., Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol, Biochemistry International. 1990, 21 (4), 593-597.
- 23.- Lacerca M. A., Las abejas, 1991. Editorial Albatros. p. 90.
- 24.- Lampeitt F., Apicultura rentable, 1991. Editorial Acribia España. p. 150-151.
- 25.- Larry R., Beuchat and Golden A.D., Antimicrobials Occurring Naturally in Foods, Food Technology, 1989, 61, 134-140.
- 26.- Layens G.R., Bonnier G.A., Curso completo de Apicultura y un cuidado de un colmenar aislado, 1993. Edit. Omega. p. 26.
- 27.- Maloine., Propolis: Terapeuta Natural, 1978. APIMONDIA. p. 8-29.
- 28.- Obregon Fuentes A.M., Antimicrobial action of alcoholic extracts of propolis, Revista Cubana de Farmacia, 1990, 24 (1), 34-44.
- 29.- Pascual C., Gonzalez R., Torricella R.G., Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals, Journal Ethnopharmacology, 1994, 41 (1/2), 9-13.
- 30.- Root A.I., ABC y XYZ de la apicultura, 1988. Editorial Zaragoza España. p. 598-599.

31.- Scheller S., Wilczok T., Imielski S., Krol W. and Gabrys J. Free radicals scavenging by ethanol extract of propolis. Poland International Journal of Radiation Biology. 1990, 57 (3), 481-485.

32.- Takaisi-Kikuni N. B., Schilcher H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Plantas Medicinales. 1994, 60 (3), 222-227.

33.- Tortora J.G. Introducción a la Microbiología. 1993. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. p. 162-166, 479-483.

34.- Vanhaelen Maurice. High-Performance Liquid, Gas-Liquid and Thin Layer Chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. Journal of Chromatography 1980, 187, 255-260.

35.- Warren Ogren. What in the world is propolis used for? American Bee Journal 1990, 137 (4). 239-240.

36.- Zierau D., Lille. Apicultura. 1977. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. p. 9-13.

37.- Zwer Davis, W.B. Determination of flavonones in Citrus fruits. Analytical Chemistry 1947, 19 (7). 476-478.