



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUIMICO DE UNA MUESTRA DE PROPOLEO
RECOLECTADA DE LA DELEGACION MILPA ALTA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA

JAZMIN RICE RAMIREZ



México D. F.

2012



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:	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
Vocal:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
Secretario:	Dra. Gloria Díaz Ruiz
1er. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. suplente:	M. en C. Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Asesor Técnico

Sobeida Sánchez Nieto

Sustentante

Jazmín Rice Ramírez

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo principalmente a mis padres Jorge Jesús Rice Peña y Estela Ramírez Mendoza por ser una parte muy importante dentro de mi desarrollo profesional, personal y lo que soy yo como persona. Los amo.

A mis hermanas Georgina e Isabel Rice que siempre me han apoyando y me hacen ser una mejor persona día a día.

A todos mis amigos de la Facultad de Química por su ayuda, enseñanzas, alegrías y tantas cosas vividas dentro de esta gran Universidad.

A todas aquellas personas que han creído en mi y han estado conmigo en todo momento tanto personal como académicamente.

Todos somos genios

pero si juzgas a un pez
por su habilidad de trepar arboles
vivirá toda su vida pensando que es inútil

Albert Einstein

Agradecimientos

A la facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por la Mejor formación académica y personal, así como por hacerme parte de una excelente y maravillosa escuela.

Al Dr. José fausto Rivero cruz por el tiempo y dedicación invertido en la realización de este proyecto de tesis, por su apoyo y aprendizaje recibido asi como excelente tutor, profesor y amigo

Al personal técnico de la USAI de la facultad de Química, a Georgina A. Duarte Lisci y a la M. en C. Nuria Esturau Escofet por el registro y análisis de los espectros utilizados en este proyecto.

A los MVZ. Adriana Correa Benítez y Ángel López Ramírez por la asesoría técnica y proporcionarnos el material vegetal utilizado en este trabajo de investigación.

El trabajo experimental de esta tesis se realizo mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: PAPIIT IN205709-3 y PICSA 10-27 “Actividad antihipertensiva de plantas y propóleos utilizados en la medicina tradicional para tratamiento de enfermedades cardiovasculares”.



Lista de Abreviaturas	i
Lista de Tablas.....	ii
Lista de Diagramas	ii
Lista de Figuras	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Propóleo.....	3
2.1.1 Forma de producción del propóleo.....	3
2.1.2 Origen botánico y composición.....	4
2.2 Composición de propóleos de diversos países	8
2.3 Producción de miel y propóleo en México	11
2.4 Tecnología de la Producción de miel en México	12
2.4.1 Tiempo de trabajo y raza de abejas	12
2.4.2 Cosecha de miel y productos	12
2.4.3 Forma de recolección.....	13
2.5 Propiedades y actividad biológica.....	14
2.5.1 Actividades antiinflamatoria y analgésica.....	15
2.5.2 Actividad antimicrobiana.....	16
2.5.3 Actividad antifúngica.....	16
2.5.4 Actividad antiviral.....	16
2.5.5 Actividad antioxidante.....	16
2.5.6 Actividad inmunoestimulante.....	17
2.6 Generalidades de la caries dental.....	17
2.7 Síntesis de los glucanos extracelulares bacterianos	19
2.7.1 Función que desempeñan los glucanos extracelulares bacterianos.....	19
2.8 Tipos de glucosiltransferasas (GTFs).....	20
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	23
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
4.1 Procedimientos Generales	25
4.1.1 Análisis cromatográficos.....	25
4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	25





4.2 Material Vegetal	25
4.3 Estudio fitoquímico de propóleo	26
4.3.1 Preparación del extracto del propóleo	26
4.3.2 Fraccionamiento primario del extracto del propóleo	26
4.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto del propóleo a partir de F-1.....	26
4.3.4 Fraccionamiento terciario a partir de F1.3.....	27
4.3.5 Obtención y purificación de acacetina a partir de F1.3.5.....	28
4.3.6 Fraccionamiento terciario del extracto de propóleo a partir de F1.2.....	29
4.3.7 Obtención y purificación de 4',7-dimetilapigenina a partir de F1.2.....	29
4.3.8 Fraccionamiento terciario de F1.1	30
4.3.9 Obtención y purificación de 4',7-dimetilnaringenina a partir de F1.1b-c.....	30
4.4 Ensayo Biológico	34
4.4.1 Medición de la actividad Enzimática.....	34
4.4.2. Cuantificación de contenido de glucosa en los glucanos.	34
4.4.3 Obtención del valor de I ₅₀ de los compuestos obtenidos del extracto de propóleo sobre la actividad de las glucosiltransferasas.....	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5.1 Identificación del compuesto PAN-C001 (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona o acacetina)[1].....	37
5.2 Identificación de 4',7-dimetilnaringenina (2).....	38
5.3 Identificación de la 4',7-dimetilapigenina (3).....	40
5.4 Efecto de los compuestos acacetina (PAN-C001), 4',7-dimetilnaringenina (PAN-2B) y 4',7-dimetilapigenina (PAN-3A) sobre la actividad de formación de glucanos mediada por la glucosiltransferasa de <i>S. mutans</i>	41
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	47
7. PERSPECTIVAS	48
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49



Lista de Abreviaturas

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CCV	Cromatografía por columna en vacío
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-¹H	Resonancia Magnética nuclear protónica
C	Carbono
H	Hidrogeno
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃OH	Metanol
OCH₃	Metoxilo
ACoET	Acetato de Etilo
HCl	Acido clorhídrico
H₂O	Agua
GTF	Glucosiltransferasas
NAD⁺	Dinucleotido de nicotinamida y adenine en su forma oxidada
NADH	Dinucleotido de nicotinamida y adenine en su forma reducida
M	Concentración Molar
°C	Grados centígrados
CMI	Concentración mínima inhibitoria
g	Gramo
mg	Miligramo
L	Litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
MHz	Megahertz
Hz	Hertz
eV	Electrovoltio
Ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia



Lista de Tablas

- Tabla 1.** Compuestos aislados del propóleo.
- Tabla 2.** Composición promedio del propóleo.
- Tabla 3.** Composición de diversos propóleos europeos química.
- Tabla 4.** Enjambrazón (forma que tiene el enjambrazón para reproducirse como grupo organizado) y cosecha de miel en los apiarios de Milpa Alta
- Tabla 5.** Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F1.
- Tabla 6.** Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F1.3.
- Tabla 7.** Purificación de PAN-C001 a partir de la fracción F1.3.5.
- Tabla 8.** Fraccionamiento terciario por CCA a partir de F1.2.
- Tabla 9.** Fraccionamiento terciario por CCA a partir de F1.1

Lista de Diagramas

- Diagrama 1.**Proceso de extracción, fraccionamiento, separación y purificación de propóleo.



Lista de Figuras

- Figura 1.** Colmena de abeja *Apis mellifera* donde se observa deposito de propóleo.
- Figura 2.** Fotografía donde se observa una abeja forrajeando (Milpa Alta).
- Figura 3.** Apiario “El Panteón”, Delegacion Milpa Alta, D. F.
- Figura 4.** Abejas *Apis mellifera* colectando y elaborando el propóleo (Daugusch et al., 2008).
- Figura 5.** *Streptococcus mutans*, una bacteria encontrada en la boca, contribuyente a la caries dental.
- Figura 6.** Imágenes confocales representando células bacterianas y glucanos dentro de las biocapas formadas por *S. mutans* en la superficie del esmalte dental en presencia de sacarosa. (Bowen & Kooh, 2011).
- Figura 7.** Reacciones que catalizan las glucosiltransferasas bacterianas (García et al., 2008)
- Figura 8.** Diagrama topológico de los miembros de la familia de las glucantransferasas GH70.(Van Hijum et al.,2006)
- Figura 9.** Mapa del D.F. donde se ubica la Delegación Milpa Alta.
- Figura 10.** Cromatografía en columna abierta utilizando silica gel como adsorbente.
- Figura 11.** Ecuación para la obtención del valor I_{50} .
- Figura 12.** Espectro de RMN-¹H de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina PAN-C001).
- Figura 13.** Espectro de RMN-¹H de la 4',7-dimetilnaringenina (PAN-B2).
- Figura 14.** Espectro de RMN-¹H de la 4',7-dimetilapigenina (PAN-3A).
- Figura 15.** Estructuras de los flavonoides (PAN-C001(1), PAN-B2(2), PAN-3A (3) y Apigenina).
- Fig. 16.** Efecto de volúmenes crecientes de diclorometano en la absorbancia del medio de ensayo para determinar la actividad de la glucosiltransferasa de *S. mutans*.
- Figura 17.** Curva dosis respuesta de la 4',7-dimetilapigenina sobre la actividad de



la glucosiltransferasa de *S. mutans*.

Figura 18. Efecto inhibitorio de la acetina sobre la actividad de las glucosiltransferasas de *S. mutans*.

Figura 19. Curva dosis respuesta de la 4',7-dimetilnaringenina sobre la actividad de la glucosiltransferasa de *S. mutans*.



1. INTRODUCCIÓN

Al igual que la miel, el propóleo se conoce desde la antigüedad y ha sido ampliamente utilizado por diferentes culturas con diversos fines, entre los que destaca la medicina (Cañas, 2002; Burdock, 1998). Esta resina es el arma química más importante que poseen las abejas para combatir a los microorganismos patógenos y por este motivo el propóleo ha sido utilizado como remedio por los seres humanos desde tiempos ancestrales (Bankova, 2005).

Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse. Recientemente, se observa un resurgir en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en biología y medicina. Entre los usos que se le da actualmente a esta resina, destaca como suplemento dietético (Burdock, 1998; Bracho, 2003; Bankova *et al.*, 2001), mientras que en estudios previos con muestras de diferentes partes del mundo se han descrito sus efectos como antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular entre otros (Bankova, 2000; Scheller *et al.*, 1999; Choy *et al.*, 1999).

Por otra parte, estudios realizados utilizando muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos han comprobado su actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) y antiviral (*Avia influenza*) (Kujumgiev *et al.*, 1999; Bankova, 2000), también se ha demostrado el sinergismo *in vitro* entre el propóleo y diferentes agentes antimicrobianos (Drago *et al.*, 2007).

En la actualidad se permiten detectar un número cada vez mayor de compuestos dentro del propóleo, comprobándose que la variabilidad en la composición es muy elevada por lo que se considera necesario proseguir con los estudios para un mejor conocimiento de sus componentes (Murat *et al.*, 2002).

Día a día se detectan nuevos componentes, los cuales pueden ser determinados por una gran variedad de métodos dentro de los que destacan: reacciones colorimétricas, cromatografía de gases, cromatografía en capa fina, cromatografía

de gases – espectrometría de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento, donde se pueden encontrar flavonoides, ácidos fenólicos y sus esteres así como nuevos componentes que ratifican sus funciones biológicas (Hsiang *et al.*, 2005).

La caries dental es una de las enfermedades más frecuentes en el ser humano. En su etiología multifactorial, desempeñan un papel importante determinadas bacterias cariogénicas, que en interacción con la superficie del diente promueven su desmineralización. Dentro de los mecanismos mediadores de la adhesión bacteriana, se encuentra la producción de polisacáridos extracelulares bacterianos. En particular los glucanos sintetizados por las glucosiltransferasas, no solo permiten la adherencia, sino que también constituyen una fuente nutricional para las bacterias, por lo tanto, la actividad de dichas enzimas se considera un factor de virulencia bacteriana en la caries dental (Bowen & Kooh, 2011).

El propóleo (figura 1) es conocido en la medicina tradicional de nuestro país como un remedio para tratar enfermedades infecciosas de la cavidad oral; tiene una actividad tanto bacteriostática como bactericida frente a microorganismos como lo es *S. mutans* inhibiendo la unión de este microorganismo a la superficie del esmalte actuando sobre la enzima glucosiltransferasa (Moreno *et al.*, 2007).

Por eso es de gran importancia estudiar más a fondo los componentes de propóleos mexicanos así como su composición y saber cuál de sus más de 300 compuestos químicos que se han descrito en los propóleos de diversos orígenes (Castaldo y Capasso, 2002), son los que proporcionan las diversas actividades farmacológicas que han sido descritas en diferentes estudios.



Figura 1. Colmena de abejas *Apis mellifera* donde se observa depósito de propóleo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Propóleo.

La palabra propóleo proviene del griego “*pro*” que significa ante y “*polis*” ciudad, es decir, defensa ante la ciudad. Esta resina cética, de composición compleja y consistencia viscosa, las abejas la elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena (Cañas, 2002; Burdock, 1998). El propóleo lo aplican las abejas como una capa fina en las paredes internas de la colmena o de otro tipo de cavidad donde habitan y se utiliza para sellar agujeros, excluir corrientes de aire y hacer que la entrada a la colmena resista a la intemperie. El propóleo también se utiliza como sustancia “embalsamante” para momificar a los invasores de la colmena que las abejas han matado pero no pueden transportar fuera de la colmena (Gómez *et al.*, 2005).

2.1.1 Forma de producción del propóleo.

Las abejas (*Apis mellifera*), recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y peciolos de las hojas de diferentes vegetales (olmos, álamos, sauces, abedules, castaños de Indias, pinos, abetos, robles y algunas herbáceas) que, una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivares para obtener el propóleo. Esta resina difiere en función de la variedad de la abeja, el clima, la flora y la forma de recolección (Lin *et al.*, 1999; Kumazawa *et al.*, 2003). Es importante mencionar que gracias a su contenido en compuestos volátiles, el propóleo suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro); posee un sabor amargo y ligeramente picante, su consistencia es pegajosa (Bacho, 2003; Cañas, 2002).

2.1.2 Origen botánico y composición.

En las zonas templadas la mayor parte del propóleo procede del exudado de brotes de chopos o álamos de la especie *Populus nigra* (Bankova, 2005); en la zona septentrional de Rusia, de los brotes de abedul (*Betula verrucosa*) y de *Populus tremula* (Wollenweber & Buchmann, 1997; Bankova *et al.*, 2002) en las regiones mediterráneas, de las choperas y de las hojas de *Cistus spp.* (Martos *et al.*, 1997); en Brasil de las hojas de especies de *Baccharis dracunculifolia* (Bankova, 2000; Kumazawa *et al.*, 2003); en Venezuela y Cuba de la resina floral del género *Clusia rosea* (Cuesta, 2002) y en zonas más tropicales se obtiene de otros vegetales como de *Clusia minor*, *C. major*, *Baccharis spp.*, *Asteraceae*, *Anacardiaceae*, *Rosaceae tropicales* (Wollenweber & Buchmann, 1997). En la Figura 2 se ilustra una abeja forrajera.



Figura 2. Fotografía donde se observa una abeja forrajear una flor (Milpa Alta).

Tabla 1. Compuestos aislados del propóleo (Koru *et al.*, 2007).

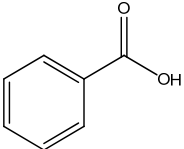
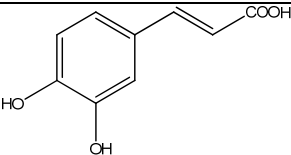
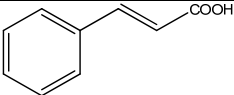
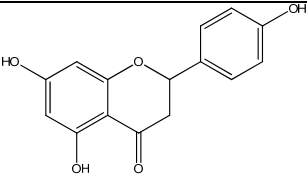
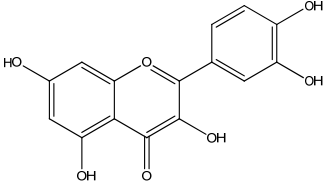
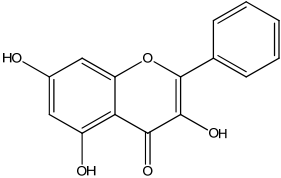
COMPUESTO	ESTRUCTURA
ACIDOS AROMÁTICOS	
ácido benzoico	
ácido cafeico	
ácido cinámico	
FLAVONOIDES	
Flavononas:	
naringenina	
Flavononas:	
quercetina	
galangina	

Tabla 1. Compuestos aislados del propóleo (continuación).

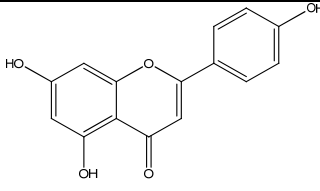
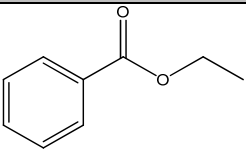
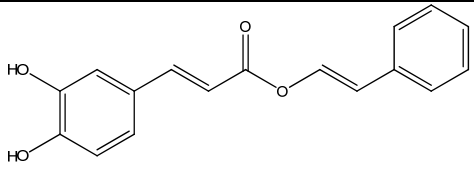
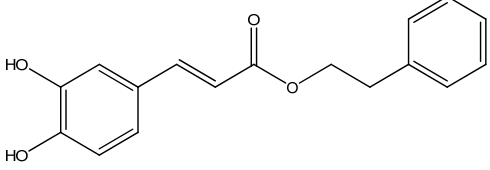
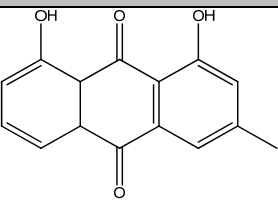
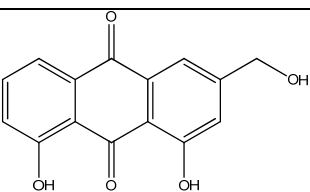
COMPUESTO	ESTRUCTURA
apigenina	
ÉSTERES	
6enzoate de etilo	
cinamil cafeato	
fenil cafeato	
ANTRAQUINONAS	
crisofanol	
emodina	

Tabla 1. Compuestos aislados del propóleo (continuación).

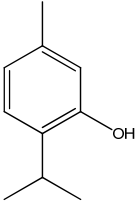
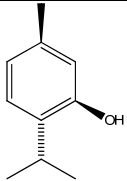
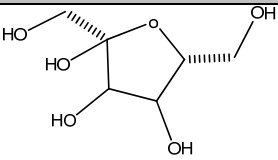
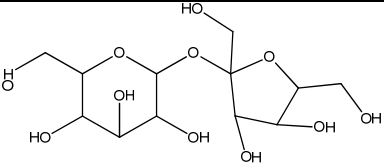
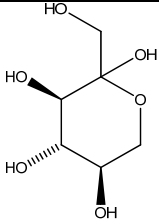
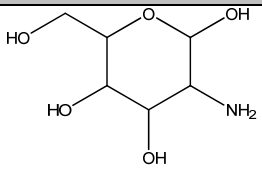
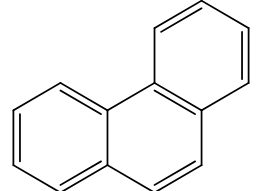
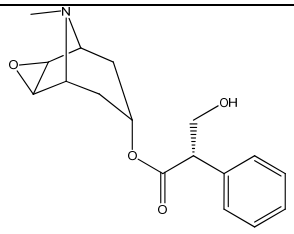
COMPUESTO	ESTRUCTURA
TERPENOS	
timol	
mentol	
AZÚCARES	
D-fructosa	
sacarosa	
sorbosa	

Tabla 1. Compuestos aislados del propóleo (continuación).

COMPUESTO	ESTRUCTURA
OTROS	
glucosamina	
fenantreno	
escopolamina	

2.2 Composición de propóleos de diversos países

En el propóleo se han aislado más de 300 compuestos (Tabla 2). Sus principales componentes son resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (50%); contenidos muy variables de ceras (7.5-35%) que afectarán a los restantes componentes; aceites volátiles (10%); polen (5%) e impurezas (4.4-19.5%). Además, contienen pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivales de las abejas y posibles contaminantes. Los compuestos activos son los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles, flavononas y flavononoles (Durk, 1997).

TABLA 2. Composición promedio del propóleo (Durk, 1997).

Composición	(%)	Compuestos, características y observaciones
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55 - 35	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5 a 10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas de polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina.
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos; Fe y Zn son los más abundantes. otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb Cetonas Lactonas Quinonas Esteroides Acido Benzoico y ésteres
Composición	(%)	Compuestos, características y observaciones
Otros compuestos orgánicos y minerales.	5	Vitaminas: B1, B2, B3, B6. Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen. Azúcares

En el propóleo europeo, el contenido total en fenoles es el principal responsable de la mayoría de sus propiedades farmacológicas descritas y representan más de la mitad de los 160 compuestos diferentes identificados en él (Bankova, 2000;

Menghinello, 1999). Sin embargo, algunas muestras suizas e italianas muestran composiciones inusuales (Tabla 3), con contenidos de bencil *p*-cumarato y de bencil ferulato bastante altos (>5%), relativa escasez de compuestos fenólicos y ausencia de algunos compuestos típicos (pinobanksina y prenilcafeatos) del propóleo procedente del *P. nigra* (Bankova *et al.*, 2002). Los propóleos turcos (Sorkun *et al.*, 2001), egipcios (Hegazi & Abd, 2001; Hegazi & Abd, 2002), brasileños (Cuesta *et al.*, 2002; Murat *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002), de Chile (Muñoz *et al.*, 2001) y de Cuba (Cuesta *et al.*, 2002) cuyas fuentes botánicas son diferentes, muestran composiciones variadas, y en algunos casos compuestos característicos que podrían ser de utilidad para la identificación de su origen.

TABLA 3: Composición de diversos propóleos europeos (Bankova *et al.*, 2002).

COMPONENTE	Propóleo <i>P. Nigra</i> (media) %	Propóleo Suizo (%)	Propóleo Italiano (%)
Pinocembrina	7.2	0.3	0.2
Pinobanksina	3.7	---	---
O-acetato de pinobanksina	8.0	0.5	0.4
Crisina	8.4	---	0.5
Galangina	7.8	0.3	0.2
COMPONENTE	Propóleo <i>P. Nigra</i> (media) %	Propóleo Suizo (%)	Propóleo Italiano (%)
pentenilcafeato	3.3	0.2	---
Bencilcafeato	3.0	---	0.9
fenilenetilcafeato	2.8	---	0.2
gliceridos fenólicos	1.1	23.1	---
ácidos diterpénicos	---	---	53.2

2.3 Producción de miel y propóleo en México

La miel producida por abejas ha sido uno de los productos que el hombre ha buscado como alimento, medicina, magia, moneda y tributo, los antecedentes de la miel en México, se remontan a la época prehispánica en que las culturas establecidas en la zona, utilizaron miel y cera de las abejas sin aguijón, conocidas como meliponas. (Labouble y Zozaya, 1986). Con la llegada de los españoles a América, la apicultura de meliponas fue reemplazada por las especies europeas (*Apis mellifera*) que en un principio fue considerada monopolio real y exclusivo de la colonia y posteriormente, durante la independencia, se amplió el acceso del sistema a todo el pueblo (SAGARPA, 2001).

No obstante la importante tradición que la producción de miel tiene en el país, en las zonas urbanas o vecinas a la ciudad de México es una actividad que tiende a desaparecer posiblemente afectada por los efectos que la contaminación atmosférica, insecticidas y disminución de la flora ejercen sobre las abejas. En la zona peri urbana, sin embargo, la presencia de abejas tiende a mejorar porque tales tierras aun preservan el uso agrícola para la producción de maíz, nopal y verdura, en los cuales existe un menor uso de agroquímicos (Rivera, 2002). En esta área, los sistemas de producción de miel se mantienen fuera de la población con el propósito ex profeso de promover la polinización en lo que hemos llamado el espacio de la agricultura de transición entre la zona nopalera y la contigua productora de maíz la cual incluye árboles frutales en los linderos; tales como: durazno (*Prunus persica*), ciruela (*Prunus domestica*), capulín (*Prunus serotina* var *capulí*), tejocote (*Crataegus pubescens Steud*), membrillo (*Cydonia vulgaris*) e higo (*Ficus carica*). Esta forma de localización física permite que los cajones se mantengan a distancia de los pueblos y se facilite la polinización en cultivos (Rivera *et al.*, 2011). En la figura 3 se ilustra el apiario “El Panteon”.



Figura 3. Apiario “El Panteón” Delegación Milpa Alta, D. F.

2.4 Tecnología de la Producción de miel en México

2.4.1 Tiempo de trabajo y raza de abejas

La apicultura en la zona establecida bajo la forma de cajones es una actividad reciente ya que la mayor parte de ellos iniciaron su colmena en el rango de 4 a 6 años por iniciativa propia o por propuesta institucional. El tipo de abejas reportado es italiana criolla en un 50% o pura, *Apis mellifera ligústica* para el otro 50%. Figura 4. A pesar de que en los últimos años ambos tipos han sido africanizados con la especie nueva *Apis mellifera scutelata*. La presencia de la abeja africana ha generado un efecto diferencial ya que mientras la mayoría de los productores identifica a la *Apis mellifera scutelata* como de mayor agresividad, se reconoce una mayor actividad de pecoreo y producción de miel (Rivera *et al.* 2011).

2.4.2 Cosecha de miel y productos

La cosecha de miel en la zona se lleva a cabo en dos temporadas bien definidas. La primera se localiza en el mes de mayo a finales de la temporada de sequía, esta época coincide con la elevada productividad del cultivo de nopal,verdura,

cuya caída del precio ocasiona que los productores de nopal no corten los cladodios (hojas) y permitan la floración del cultivo utilizado por las abejas para producir miel exclusivamente, En oposición, la segunda cosecha de octubre /noviembre incluye la temporada de lluvias en su totalidad y es considerada por los productores la de mayor producción de miel y ampliada a cera y propóleo. Tabla 4. (Rivera *et al.* 2011).

Tabla 4. Enjambrazón (forma que tiene el enjambre para reproducirse como grupo organizado) y cosecha de miel en los apiarios de Milpa Alta.

Mes del año	Actividad	Porcentaje (%)
Enero	-	-
Febrero	-	-
Marzo	Enjambrazón	10
Abril	Enjambrazón	10
Mayo	Cosecha de miel	17
Junio	Enjambrazón	10
Julio	Enjambrazón	30
Agosto	Enjambrazón	30
Septiembre	-	-
Octubre	Cosecha de miel, cera y propóleo	30
Noviembre	Cosecha de miel, cera y propóleo	37
Diciembre	-	-

2.4.3 Forma de recolección.

El propóleo se recolecta en las colmenas por medio de trampas o raspado, siendo el entrampado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación (Gómez *et al.* 2005), la recolección se hace antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales al inicio de la estación lluviosa, cuando la

propolización parece más activa. Tanto en la recolección como en el procesado deben aplicarse rigurosas normas de higiene para evitar la contaminación y la subsiguiente pérdida del valor comercial del producto (Gómez *et al.* 2005).



Figura 4. Abeja *Apis mellifera* colectando y elaborando el propóleo (Daugšch *et al.*, 2008)

2.5 Propiedades y actividad biológica

A continuación se mencionan las distintas actividades del propóleo para las que se dispone de estudios que las apoyan.

2.5.1 Actividades antiinflamatoria y analgésica.

Algunos de los componentes fenólicos del propóleo, como el ácido cafeico y el éster del ácido feniletil cafeico, la quercetina y la naringenina, ejercen efectos antiinflamatorios y actúan sobre la producción de eicosanoides, tanto *in vitro*, suprimiendo la generación de prostaglandinas y de leucotrienos en macrófagos peritoneales, como *in vivo*, en la inflamación peritoneal aguda inducida por la zimosina (Mirzoeva & Calder, 1996).

El propóleo por vía oral suprime de forma significativa la vía de la lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico y, el éster del ácido feniletil cafeico es, entre los componentes conocidos del propóleo, el modulador más potente de la cascada del ácido araquidónico. Esta vía es relevante desde el punto de vista farmacológico ya que su inhibición es la diana establecida de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (Mirzoeva & Calder, 1996).

Otros estudios realizados describen que el éster del ácido feniletil cafeico disminuye la actividad de la ciclooxigenasa en macrófagos, medida en función de la producción de prostaglandina E₂, y protegen al tejido cartilaginoso y a los condrocitos humanos, de los daños producidos por la interleucina-1 β .

La actividad antiinflamatoria por barrido de radicales libres se atribuye principalmente al ácido cafeico, a su prenil éster y a los flavonoides como galangina, kaempferol y kaempferida 11 y aunque no se conoce el mecanismo de acción, los efectos antiinflamatorios del propóleo y la inhibición que ejerce sobre la actividad de la mieloperoxidasa de la lipooxigenasa y de la oxidasa-NADPH leucocitarias pueden deberse, en parte, a su excelente capacidad para eliminar radicales libres.

El propóleo parece poseer una potente actividad antiinflamatoria y analgésica ya que su administración oral inhibe significativamente el edema de la oreja inducido en ratas y ratones por diversos agentes (carragenina, formalina, radiación gamma), al igual que la formación de granulomas, exudados, angiogénesis y la respuesta neurógena al dolor (Peña, 2008).

2.5.2 Actividad antimicrobiana.

Diversos autores han estudiado la actividad antimicrobiana del propóleo en combinación con antibióticos y sus resultados demuestran que esta sustancia sinergiza la acción de estos, haciéndolos más eficaces y posibilitando una reducción de dosis evitando que los microorganismos se hagan resistentes. (Fernández *et al.*, 2005).

2.5.3 Actividad antifúngica.

El propóleo presenta distintos efectos fungicidas frente a numerosas especies de hongos y levaduras como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascosphaera apis*, *Plasmopara viticola*, *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum*. El propóleo tiene un efecto similar a la nistatina frente a *Candida albicans*, en mucosa oral y superior a otros antifúngicos que presentan resistencias, entre los que podemos destacar al clotrimazol, econazol y fluconazol (Martins *et al.*, 2002).

2.5.4 Actividad antiviral.

Otra actividad importante del propóleo es su acción antiviral. Esta resina ejerce efectos inhibidores frente al virus de la viruela, la influenza, la enfermedad de Newcastle, el herpes, la fiebre del Valle del Rift, la influenza aviar, la infección vírica bursal, el reovirus y el virus de la gripe Hong Kong (Hegazi y Abd el Hady, 2002). Esta actividad como los otros biocidas que tiene el propóleo se atribuye a su contenido en principios fenólicos. Otros estudios relacionados donde se compara la acción del propóleo contra el aciclovir en herpes genital demostraron que el aplicado tópicamente redujo la inflamación y los síntomas locales de una manera más eficiente (Vynograd *et al.*, 2000).

2.5.5 Actividad antioxidante.

El propóleo, debido a su riqueza en polifenoles, ha demostrado una gran capacidad antioxidante basada en su propiedad para neutralizar los radicales libres. Estudios previos han demostrado que posee antioxidantes que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación (Shatiavelu *et al.*, 2009).

En estudios realizados sobre la composición del propóleo se demostró que el flavonoide crisina es capaz de incrementar la actividad de la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión-peroxidasa, la glutatión reductasa, la glutatión-S-transferasa, los niveles de glutatión reducido, la vitamina C y la vitamina E, en modelos experimentales en ratas. Estas enzimas y sustancias antioxidantes protegen contra los radicales libres mediadores del estrés oxidativo (Sathiavelu *et al.*, 2009).

2.5.6 Actividad inmunoestimulante.

Se ha comprobado la eficacia inmunoestimulante del propóleo determinando los niveles de citocinas antes y después de administrar propóleo por vía oral, observándose un incremento significativo de la capacidad de secreción de las citocinas (Farre *et al.*, 2004).

Otras investigaciones realizadas con ratones han mostrado que tras la administración de propóleo a un ratón inoculado con células de carcinoma mamario, estos producían cambios en su sistema inmunológico, como un aumento de la producción del factor de activación de linfocitos, por macrófagos peritoneales y se observó que la eficacia de dichos macrófagos frente a las células cancerígenas era mayor, quedando aumentados también los mediadores inmunológicos (Orsolid y Basid, 2003).

2.6 Generalidades de la caries dental

Para que la caries dental se produzca, es necesaria la conjunción de varios factores, dentro de los más comunes se encuentran las características propias del huésped afectado (los dientes y la saliva), la dieta o nutrición (en particular, por la relación de la caries con el frecuente consumo de azúcares refinados como la sacarosa), el tiempo transcurrido desde la erupción del diente (ya que en la medida que este madura, su tejido duro se vuelve más resistente al daño) y las bacterias que se encuentran como habitantes normales de la boca (García *et al.*, 2008).

El paso más importante para la aparición de la caries es la adhesión inicial del *S. mutans* a la superficie del diente, esta adhesión esta mediada por: la interacción entre una proteína del microorganismo (PAc) y algunas de la saliva que son adsorbidas por el esmalte dental, la capacidad de acumulación en la placa; proceso que ocurre cuando el *S. mutans* produce glucanos solubles e insolubles(Figura 6), utilizando las enzimas glucosiltransferasas (GTFs), a partir de los azúcares de la dieta. Una vez que la unión se hace más fuerte, las bacterias degradan la sacarosa a ácidos, como el láctico, que desmineralizan el diente formando la cavidad que se encuentra en la caries dental.

Streptococcus mutans

S. mutans (figura 5) fue aislado inicialmente a partir de lesiones cariosas en humanos por Clarke en 1924. Es una bacteria Gram positiva, acidogénica y acidurica; de la cual se han identificado 3 serotipos en humanos el c, e y f (Akiko *et al.*, 1998). Este estafilococo es considerado como el principal microorganismo implicado en el desarrollo de la caries en el esmalte (Hamada *et al.*, 1980).



Figura 5. *Streptococcus mutans*, una bacteria encontrada en la boca, contribuyente de la caries dental.

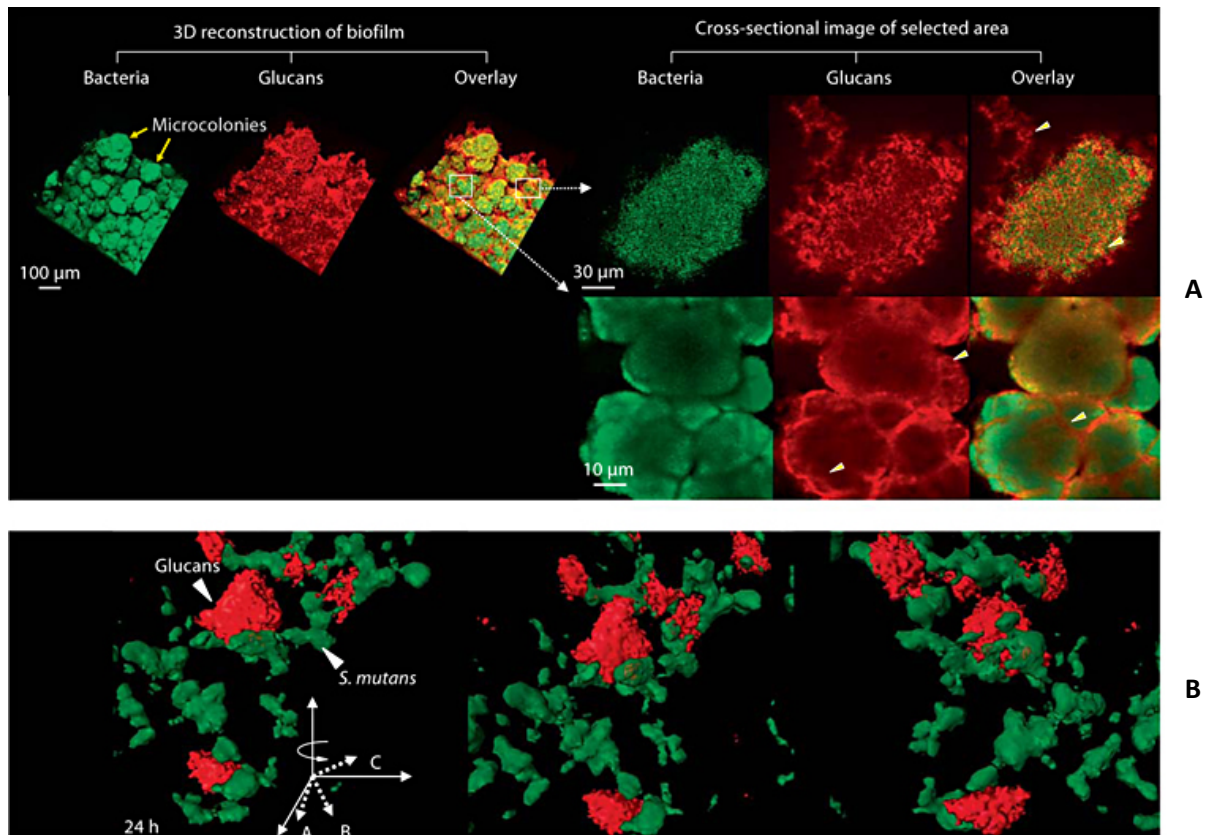


Fig. 6. **A** Las imágenes confocales representan células bacterianas (en verde) y glucanos (en rojo) dentro de las biocapas formadas por *S. mutans* en la superficie del esmalte dental en presencia de sacarosa. Las flechas indican la organización estructural de glucanos dentro de microcolonias de *S. mutans*. **B** se muestra una imagen en tres dimensiones de la relación estructural entre los glucanos (Bowen & Kooh, 2011).

2.7 Síntesis de los glucanos extracelulares bacterianos

Este proceso se produce por la acción de enzimas extracelulares sintetizadas por las bacterias denominadas glucosiltransferasas, que constituyen un factor de virulencia significativo en el inicio de la caries dental.

2.7.1 Función que desempeñan los glucanos extracelulares bacterianos

Los glucanos tienen 2 funciones fundamentales: mediar la adherencia bacteriana y servir como fuente nutricional.

1. Adherencia.

Los glucanos adhesivos como el mutano median la unión de las bacterias a la superficie del diente, así como a otras bacterias, por lo tanto, promueven la adherencia y co-adherencia, así como la permanencia y maduración de la placa

dental. Constituyen así elementos críticos en el incremento de las proporciones del *S. mutans* en la placa y de su cariogenicidad, es decir, su capacidad de producir caries dental.

2. Fuente nutricional.

Los polisacáridos extracelulares pueden también ser utilizados por las bacterias como fuente de nutrientes, gracias a la síntesis de enzimas glucanohidrolasas como las dextranasas, glucanasa y la mutanasas por parte de las propias bacterias.

Se conoce que la dextranasa puede ubicarse en la superficie de la pared celular o ser liberada al espacio extracelular, en ambos casos, su acción permite la utilización de los glucanos como fuente nutricional, la dextranasa unida a la pared, se considera que también participa en el control de las propiedades adhesivas del glucano extracelular (García *et al.*, 2008).

Las glucanohidrolasas presentes en el biofilm de la placa dental pueden influir sobre la síntesis y estructura de los glucanos formados por las enzimas dependientes de sacarosa como sustrato como pueden ser las glucosiltransferasas (García *et al.*, 2008).

2.8 Tipos de glucosiltransferasas (GTFs)

Una clasificación de las GTFs se basa en las características de solubilidad en agua del glucano que producen. Según este criterio el *S. mutans* produce 3 formas diferentes de glucosiltransferasas, cada una de las cuales sintetiza un polímero de glucano a partir de la sacarosa.

Estas son:

1. La GTF-I (que provienen del gen GTFB) produce al glucano insoluble en agua denominado mutano, rico en uniones glicosídicas alfa (1-3).
2. La GTF-S (que provienen del genGTFD) produce un glucano similar al dextrano, pues es soluble en agua y rico en enlaces alfa (1-6).
3. La GTF-SI (que provienen del gen GTFC) produce una mezcla de glucanos solubles e insolubles en agua (García *et. al.*, 2008)

Las GTFs reconocen e hidrolizan a la sacarosa produciendo las unidades de hexosa componentes, solo los residuos de glucosa son polimerizados originando a los glucanos.

La enzima continúa transfiriendo residuos de glucosa al polímero a partir de la sacarosa en un proceso complejo y aún no entendido, el mecanismo se complica más ya que la enzima no solo produce glucanos lineales sino que también introduce ramificaciones.

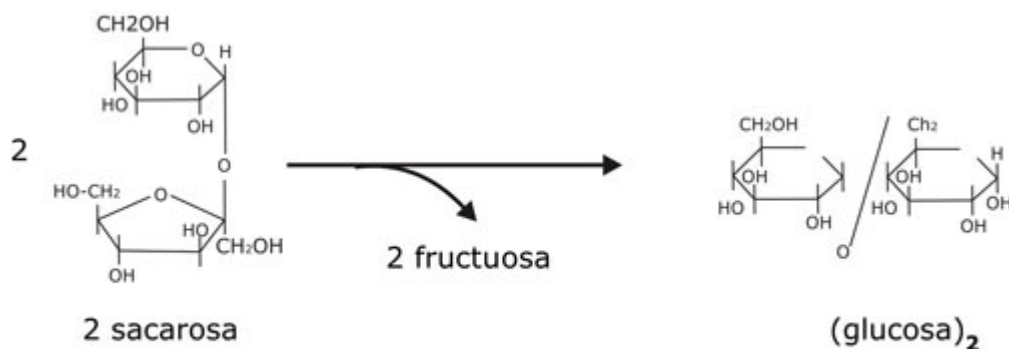


Figura 7. Reacciones que catalizan las glucosiltransferasas bacterianas (García *et al.*, 2008).

Las glucosiltransferasas tienen un peso molecular promedio de 160 kDa y se componen funcionalmente de 3 regiones, una región denominada variable en la porción N-terminal, otra región altamente conservada que es la catalítica y la región de unión al glucano localizada en la porción C-terminal (Figura 8). Las glucosiltransferasas han sido propuestas como sitios potenciales de fármacos anticaries, su unión específica a la proteína es necesaria para obtener sustancias inhibitorias específicas para las glucosiltransferasas y que no tengan efectos adversos para otras enzimas que hidrolizan carbohidratos en la cavidad oral.

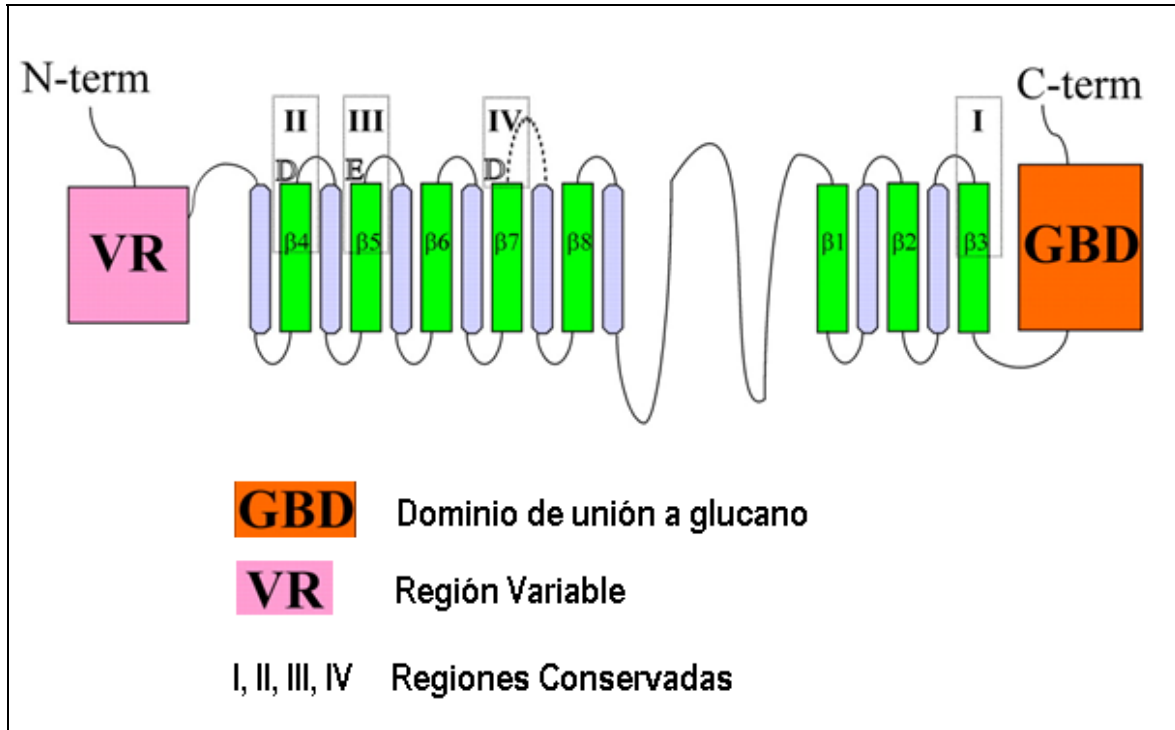


Figura 8. Diagrama topológico de los miembros de la familia de las glucantransferasas GH70. Tomado y adaptado de van Hijum *et al.*, 2006

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En nuestro país las enfermedades de la cavidad oral representan un problema de salud pública el cual no es abordado con la debida seriedad y los programas existentes se enfocan en la corrección y no en la prevención del problema. Otro de los problemas que se enfrentan es el uso excesivo y a la automedicación de los antibióticos, lo cual ha incrementado la aparición de bacterias resistentes, disminución en la eficacia de los tratamientos y ha limitado su rango terapéutico contra patógenos ocasionando que los tratamientos se vuelvan más costosos, invasivos, peligrosos e ineficientes. Las razones antes mencionadas hacen necesaria la búsqueda de alternativas para el tratamiento de estas enfermedades infecciosas, en este sentido, los productos naturales representan una alternativa que ayuda a combatir eficazmente a los microorganismos patógenos de una forma accesible a la población. Es importante destacar que estudios previos demuestran el valor de los productos naturales en la prevención y el tratamiento de las enfermedades de la cavidad oral sin ocasionar efectos adversos graves e indeseados.

Uno de los productos naturales más utilizados como un agentes antimicrobianos son los propóleos y se ha encontrado que representan una fuente potencial de compuestos con actividad sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* y las enzimas glucosiltransferasas que produce esta bacteria como uno de los factores que le permiten establecerse.

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en evaluar el potencial antimicrobiano y anticariogénico del propóleo y aislar los compuestos responsables de estas actividades. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Preparar el extracto etanólico a partir del propóleo utilizando un método de maceración y etanol como disolvente. Este proceso permitirá la obtención de

los extractos en cantidad suficiente para cuantificar el efecto inhibitorio sobre la bacteria *Streptococcus mutans*, también, permitirá realizar el fraccionamiento del extracto activo.

- Realizar fraccionamientos del extracto etanólico derivado del propóleo, empleando para ello métodos cromatográficos convencionales y procesos de partición. Esta actividad permitirá la obtención de una serie de fracciones de menor complejidad que el extracto original.
- Aislar los compuestos activos a partir de las fracciones primarias. Esta actividad permitirá obtener los principios activos en forma pura para evaluar la actividad antimicrobiana y sobre las enzimas glucosiltransferasas de *S. mutans*.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos Generales

4.1.1 Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 1% seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa de los compuestos. La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM empacado en columna de vidrio (5 × 30 cm) y utilizando diversos sistemas de elución (CH₂Cl₂:MeOH y MeOH).

4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear para protón (RMN-¹H, 400 MHz) y carbono 13 (RMN-¹³C, 100 Hz) se realizaron en un equipo Varian modelo VNMRS. Los espectros de masas se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV y bombardeos de átomos rápidos (EM-FAB) mediante la técnica de impacto electrónico (EM/IE). Los espectros se realizaron utilizando CD₃OD y DMSO y tetrametilsilano (TMS) como referencia, reportando los desplazamientos químicos en ppm.

4.2 Material Vegetal

El propóleo utilizado en este estudio fue recolectado en el apiario “El panteón” ubicado en San Pablo Oztotepec de la Delegación Milpa Alta en el Distrito Federal. En la Figura 9 se ilustra la ubicación del apiario “El panteón”.

Una muestra de referencia de este material vegetal se guarda en el laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.



Figura 9. Mapa del DF donde se ubica la delegación Milpa Alta.

4.3 Estudio fitoquímico de propóleo

4.3.1 Preparación del extracto del propóleo

El material vegetal (278 g) se sometió a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente utilizando 1.3 L de etanol por un periodo de 8 días, se filtro al vacío el extracto obtenido y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose así un extracto total de consistencia cerosa de color marrón (92 g).

4.3.2 Fraccionamiento primario del extracto del propóleo

Una muestra del extracto obtenido se suspendió en metanol-agua (95:5) y fue sometida a diferentes particiones con CH_2Cl_2 , AcoEt y CH_3OH utilizando 300 mL de cada disolvente y por triplicado. De este procedimiento se obtuvieron 3 fracciones: F1, F2 y F3, respectivamente.

4.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto del propóleo a partir de F-1

La fracción F-1 (28.1512 g) se sometió a un proceso de CCA sobre gel de sílice, se eluyó utilizando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$ a diversas proporciones (tabla 5). Este proceso generó 10 fracciones combinadas (F1.1 – F1.10).

Tabla 5. Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F1

Sistema de elución	Proporción	Fracciones Obtenidas	Fracciones Combinadas
CH ₂ Cl ₂	100	1 – 3	F1.1
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	95:5	4 – 5	F1.2
		6 – 8	F1.3
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	90:10	9 – 11	F1.4
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	85:15	12 – 13	F1.5
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	80:20	14 – 15	F1.6
		16	F1.7
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	70:30	17 – 19	F1.8
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	1:1	20	F1.9
		21 – 25	F1.10
CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	100		

4.3.4 Fraccionamiento terciario a partir de F1.3

La fracción F1.3 (2.094g de peso) fue sometida a un fraccionamiento en CCA utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil se utilizó CH₃OH. Mediante este proceso se obtuvieron 20 fracciones que posteriormente fueron reunidas por similitud cromatográfica, obteniendo 7 fracciones combinadas (F1.3.1 – F1.3.6). En la Tabla 6 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción F1.3.

Tabla 6. Fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F1.3.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones Obtenidas	Fracciones combinadas
CH ₃ OH	100	1 – 3	F1.3.1
		4 – 5	F1.3.2
		6	F1.3.3
		7 – 9	F1.3.4
		10 – 18	F1.3.5
		19 – 20	F1.3.6

4.3.5 Obtención y purificación de acetina a partir de F1.3.5

La fracción F1.3.5 (0.321 g) de peso fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil se utilizó CH₃OH. Mediante este proceso se obtuvieron 15 fracciones que posteriormente fueron reunidas por similitud cromatográfica, obteniendo 5 fracciones combinadas (F1.3.5A – F1.3.5E). En la Tabla 7 se resume el proceso de purificación de PAN-C001.

A partir de la fracción F1.3.5D se formó un sólido de color amarillo el cual se purificó mediante un proceso de cristalización. Este proceso permitió la obtención de 50 mg de un compuesto (PAN – C001). El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como el flavonoide acetina (Figura 12).

Las fracciones F1.3.5D, F1.3.5A y F1.3.6 se combinaron pues presentaron características similares al hacer cromatografía en capa fina. Con esto se obtuvo una porción adicional de acetina.

Tabla 7. Purificación de PAN-C001a partir de la fracción F1.3.5

Sistema de elución	Proporción	Fracciones Obtenidas	Fracciones combinadas
CH ₃ OH	100	1 – 2	F1.3.5A
		3 – 4	F1.3.5B
		5	F1.3.5C
		6 – 10	F1.3.5D
		11 – 15	F1.3.5E

4.3.6 Fraccionamiento terciario del extracto de propóleo a partir de F1.2

La fracción F1.2 (13.99 g de peso) fue sometida a un fraccionamiento terciario mediante CCA utilizando gel de sílice como adsorbente y como disolvente mezclas de hexano y CH₂Cl₂ en polaridad creciente, se colectaron fracciones de 300 mL, las cuales se concentraron al vacío por separado. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía en capa fina y las fracciones que presentaban similitud cromatográfica se unieron para formar 17 fracciones. En la Tabla 8 se resume el fraccionamiento terciario de F1.2.

Tabla 8. Fraccionamiento terciario por CCA a partir de F1.2

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1 – 3
Hexano - CH ₂ Cl ₂	50:50	4, 5
Hexano - CH ₂ Cl ₂	40:60	6, 7
CH ₂ Cl ₂	100	8

4.3.7 Obtención y purificación de 4',7-dimetilapigenina a partir de F1.2

Las fracciones F-2 y F-3 se analizaron por CCF y combinaron por su similitud cromatográfica. El compuesto mayoritario detectado en la fracción combinada F-2-

3 se separó mediante sucesivas recristalizaciones de acetona-metanol y como resultado de este proceso se obtuvieron 190 mg de un sólido de color amarillo al cual se le denominó PAN-3A, que fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas siendo este compuesto 4',7-dimetilapigenina. (Figura 14).

4.3.8 Fraccionamiento terciario de F1.1

La fracción F1.1 (7.04 g de peso) fue sometida a un fraccionamiento terciario mediante CCA utilizando gel de sílice como adsorbente (Figura 10) y como disolvente mezclas de diversos disolventes que se colocaron en polaridad creciente (Tabla 9). Se colectaron fracciones de 75 ml, las cuales se concentraron al vacío por separado. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía en capa fina y las fracciones que presentaban similitud cromatográfica se unieron para formar 15 fracciones.

4.3.9 Obtención y purificación de 4',7-dimetilnaringenina a partir de F1.1b-c

Se combinaron las fracciones F-B y F-C utilizando como criterio su similitud cromatográfica a lo que se le hizo una cristalización simple y posteriormente una recristalización con acetona y metanol. Este proceso permitió la obtención de 834.5 mg de un compuesto de color blanco al cual se le denominó PAN-B2, dicho compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como el flavonoide 4',7-dimetilnaringenina (Figura 13).

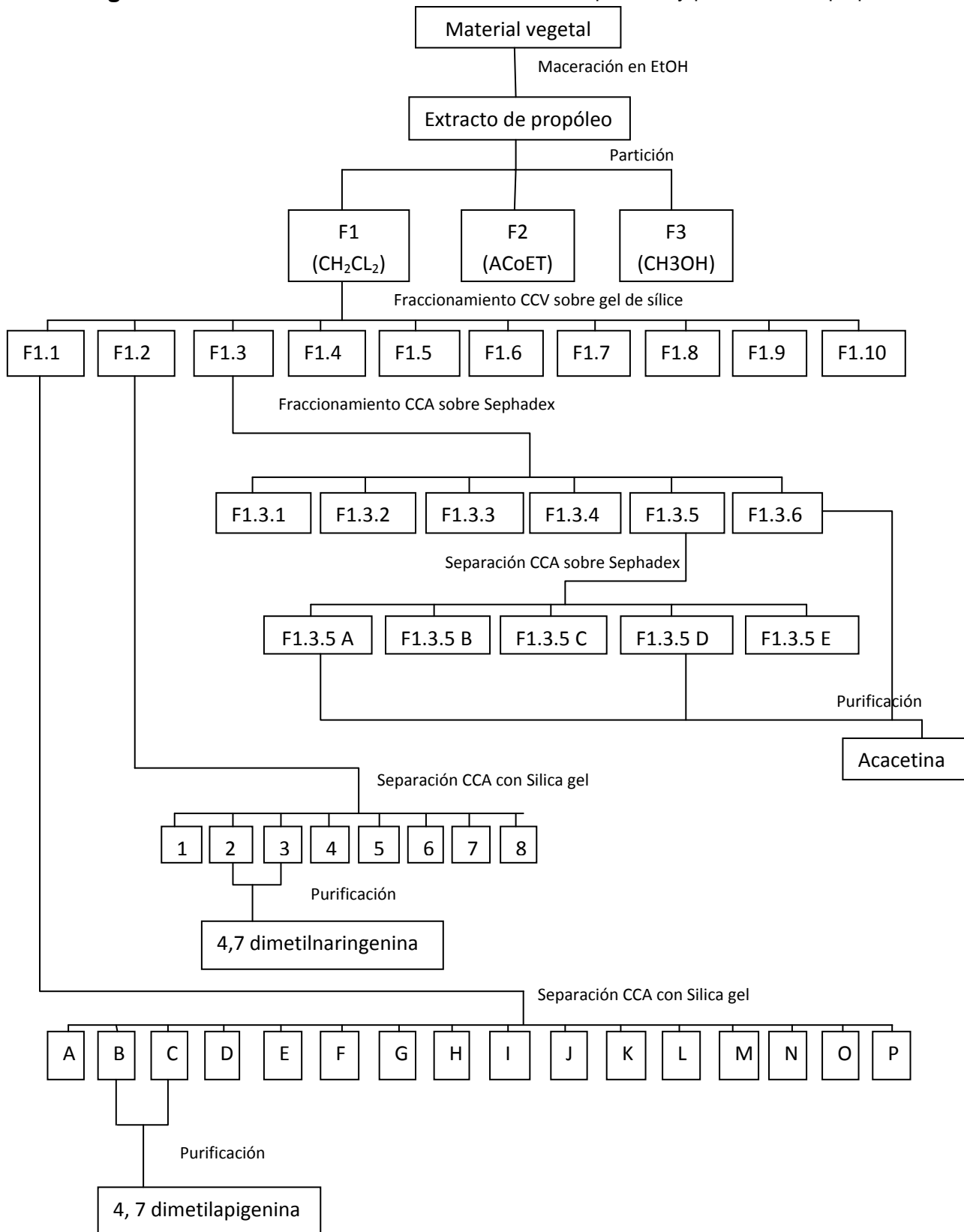
Tabla 9. Fraccionamiento terciario por CCA a partir de F1.1

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones combinadas
Hexano	100	A	1 – 9
Hexano – CH ₂ Cl ₂	50:50	B	10 - 16
Hexano – CH ₂ Cl ₂	40:60	C	17 – 22
		D	23 - 26
		E	27 – 31
		F	32 – 43
		G	44
Hexano – CH ₂ Cl ₂	20:80	H	45 – 49
		J	50
		K	51
		L	52 - 54
		M	55
CH ₂ Cl ₂	100	N	56 – 64
CH ₂ Cl ₂ – CH ₃ OH	95:5	O	65 - 68
CH ₂ Cl ₂ – CH ₃ OH	95:5	P	69 - 73



Figura 10. Cromatografía en columna abierta utilizando silica gel como adsorbente.

Diagrama 1. Proceso de extracción, fraccionamiento, separación y purificación de propóleo.



4.4 Ensayo Biológico

4.4.1 Medición de la actividad enzimática

Para la medición de la actividad enzimática de la GTFs se preparó una solución stock (5mg/mL) de cada uno de los compuestos que anteriormente fueron aislados y purificados (PAN – C001, 3A y B2) se tomaron 2, 4, 8 y 20 μ l respectivamente por triplicado para obtener diferentes concentraciones (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL y 0.5 mg/mL). La actividad enzimática se realizó al mezclar 50 μ l de medio de reacción que contuvo 100 mM de amortiguador de acetatos pH 6.2, 5% de sacarosa, para posteriormente agregar el compuesto a medir, el volumen se ajustó a un volumen de 60 μ L y se inicio la reacción enzimática con la adición de 6 μ l de GTFs (obtenidas según se describe en Da Silva – Leitao *et al.*, 2004), se incubó por 21 horas a 37°C. Al término de este periodo se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos en microcentrifuga y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. En el sobrenadante se encuentran los glucanos solubles y para precipitar se adicionaron 200 μ l de etanol, se incubó por 20 horas a una temperatura de -20°C. Trascurrido este tiempo se volvió a centrifugar a una velocidad de 12000 rpm por 5 minutos en microcentrifuga, el botón obtenido se resuspendió con 80 μ l de HCl 1M y se incubó a ebullición por 30 min. Finalmente se neutralizó la solución al adicionar 80 μ l NaOH 1M.

4.4.2. Cuantificación de contenido de glucosa en los glucanos.

La cuantificación de la cantidad de glucosa liberada de los glucanos se realizó por un método en microplaca de 96 pozos tipo ELISA, con un método que acopla la reacción específica de la glucosa con la reducción del NAD⁺ leyendo la absorbancia del NADH producido a una longitud de onda de 340 nm. Se midieron 20 μ l de las muestras de glucanos hidrolizados resultado del procedimiento descrito en el punto anterior y se colectaron en la microplaca, se les agregaron 200 μ l del reactivo enzimático de glucosa (REG de SIGMA G3293) el cual contiene ATP, MgCl₂, NAD⁺, hexocinasa y glucosa – 6P deshidrogenasa. Se consideró que

por cada mol de glucosa liberada del glucano corresponde a 1 mol de NADH producido.

Debido a que la glucosa producida representa la glucosa que fue unida a los glucanos por la actividad de la GTFs, entonces, la actividad de la enzima se expresa en unidades de concentración por el tiempo de incubación de la enzima ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

4.4.3 Obtención del valor de I_{50} de los compuestos obtenidos del extracto de propóleo sobre la actividad de las glucosiltransferasas.

Para el análisis de los datos de actividad de la enzima se utilizó el programa estadístico MicroCalOrigin 6.0 utilizando los datos por regresión lineal y no lineal.

Se utilizaron los datos del porcentaje de actividad residual y como modelo matemático la ecuación mostrada (figura 11) para obtener así el valor de I_{50} (concentración a la cual se inhibe al 50% la actividad enzimática) y V_0 (velocidad inicial o actividad sin inhibidor) de cada uno de los extractos evaluados.

$$v_{residual} = \frac{V_0 \times I_{50}}{I_{50} + C}$$

Donde:

V_0 = Velocidad inicial

I_{50} = Concentración a la cual se inhibe al 50% la actividad enzimática

C = Concentración del compuesto a evaluar

Figura 11. Ecuación para obtener el valor de I_{50}

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En México existe una megadiversidad vegetal, la cual da origen a una gran variedad de propóleos que no han sido estudiados sistemáticamente. Por esta razón, en nuestro grupo de trabajo, nos hemos enfocado al estudio de estas resinas. El material de estudio fue seleccionado con base en la actividad que presentó sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans*. Esta bacteria presenta entre otros factores invasivos, la producción de glucanos a partir de los carbohidratos de la dieta mediante la acción de las enzimas glucosiltransferasas.

En primer lugar, la resina (278 g.) se sometió a un proceso de extracción por maceración utilizando 1.3 L de etanol, obteniéndose un extracto color marrón y consistencia cerosa con peso total de 92 g.

El extracto resultante se evaluó de nueva cuenta con la finalidad de corroborar la actividad observada para el extracto realizado en pequeña escala. Como resultado del proceso se obtuvo que el extracto inhibe el crecimiento de *S. mutans* con una CMI de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con base en estos resultados, se decidió continuar con el estudio del extracto etanólico del propóleo con la finalidad de aislar los compuestos responsables de la actividad detectada.

El extracto activo se sometió a un fraccionamiento primario utilizando un método de partición y como disolventes CH_2Cl_2 , AcOEt y $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$, obteniéndose las fracciones primarias F-1, F-2 y F-3, respectivamente. Posteriormente, se determinó el efecto de las fracciones sobre el crecimiento de *S. mutans* y como resultado se obtuvo que la actividad antibacteriana se concentro en la fracción F-1. Como siguiente paso, se realizó el fraccionamiento secundario a partir de la fracción F-1 (28.15 g.) utilizando CCA, gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$ en diferentes proporciones. Este proceso permitió la obtención de 10 fracciones de las cuales solo se trabajo con las fracciones activas F-1.1, F-1.2 y F-1.3. Por último, a partir de sucesivas cromatografías utilizando gel de sílice, Sephadex LH-20 y recristalizaciones se

obtuvieron los compuestos denominados PAN-C001, PAN-B2 y PAN-3A, respectivamente. La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos. (Espectros de resonancia magnética nuclear para proton, carbono 13, espectros de masas).

5.1 Identificación del compuesto PAN-C001 (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona o acetina) [1].

El compuesto PAN-C001 (1) se aisló como un sólido amarillo soluble en una mezcla de metanol. La fórmula molecular del compuesto se estableció como $C_{16}H_{12}O_5$. La estructura del compuesto se determinó por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura para la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona conocida con el nombre trivial de acetina (Duddeck et al., 1978; Lago *et al.*, 2007). En la Figura 12 se ilustra el espectro de RMN¹H obtenido para la acetina.

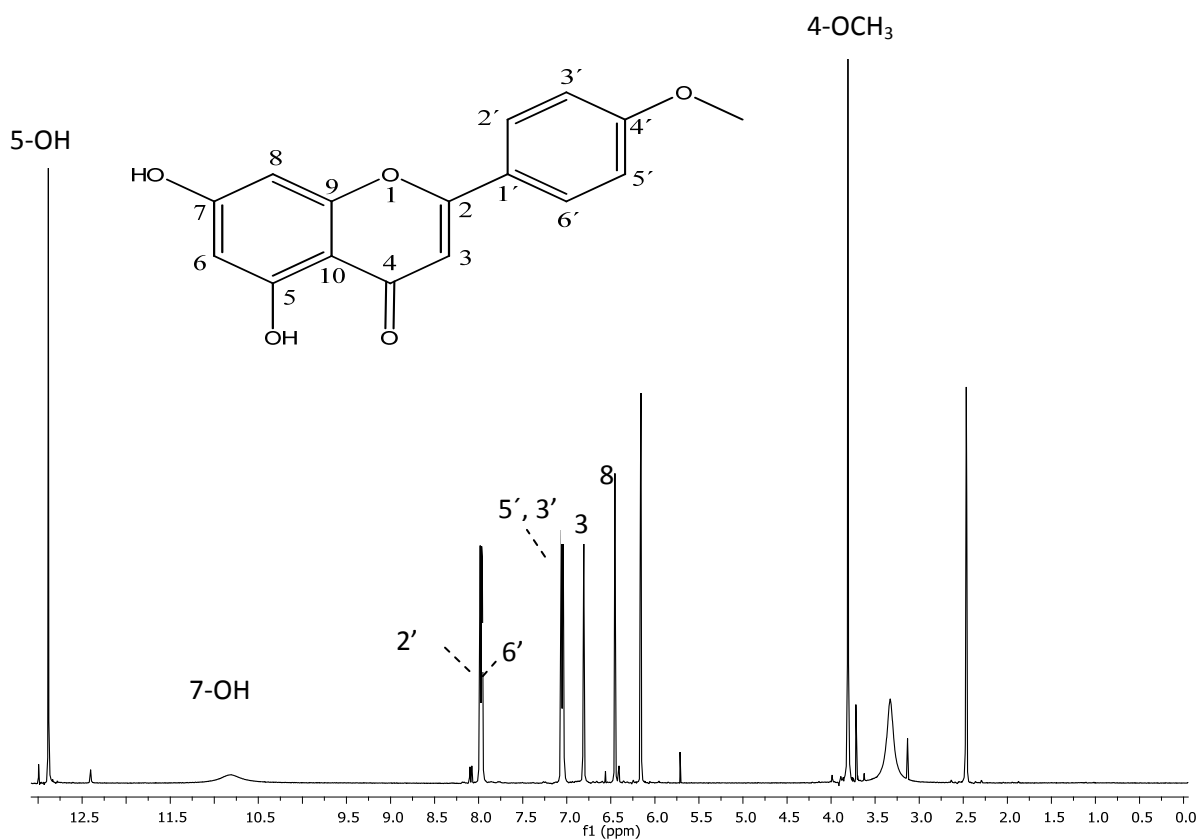


Figura 12. Espectro de RMN¹H de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina **PAN-C001**).

La acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona) es un flavonoide (Figura 15), al cual se le han reportado actividades diversas entre las cuales podemos destacar: la antiperoxidativa, antiinflamatoria y antiplasmodica (Kraft *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2008). Otras actividades de esta flavona son las anticancerígenas y se ha encontrado que inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis, además, bloquea el ciclo celular en la fase G1 (Saravana *et al.*, 2009). Otros estudios previos reportan que inhibe la proliferación celular mediante la inducción de citotoxicidad y apoptosis en células cancerígenas tipo HeLa (Szliszka *et al.*, 2011). Por otra parte, al administrarse en conjunto con TRAIL (factor de tumor de necrosis relacionado con el ligando inductor a la apoptosis) posee una actividad sinérgica en la promoción de la apoptosis de células cancerígenas (Szliszka *et al.*, 2011). La acacetina induce la apoptosis vía la activación de las caspasas, generación de especies reactivas de oxígeno, activación de p53, sistema apoptótico Fas/FasL (Szliszka *et al.*, 2011). Además, se ha encontrado que la acacetina puede inhibir la glutatión reductasa, citocromo P450 y topoisomerasas catalizadas por religación I – DNA. (Ya- Ling *et al.*, 2004). Esta flavona se ha aislada previamente de especies vegetales como la *Betula spp.* (Lahtinen *et al.*, 2006), el *Chrysanthemum morifolium* (Lin *et al.*, 2005) y el *Gingko biloba* (Jiang *et al.*, 2008). Por último, es importante mencionar que la acacetina ha sido encontrada en propóleos recolectados en diferentes partes del mundo (Szliszka *et al.*, 2011).

5.2 Identificación de 4',7-dimetilnaringenina (2)

El compuesto **PAN-B2**, se aisló como un sólido cristalino blanco soluble en metanol. La fórmula molecular del compuesto se estableció como C₁₇H₁₆O₅ con base en los espectros de RMN y espectrometría de masas. El compuesto **PAN-B2** se identificó como la 4',7-dimetilnaringenina con base en la comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura (Lago *et al.*, 2007). En la Figura 13 se ilustra el espectro de RMN¹H

Resultados y Discusión

obtenido para **PAN-B2**. Estudios fitoquímicos previos reportan el aislamiento de esta flavanona a partir de *Phrodus bridgesii* (Gambaro *et al.*, 1985), *Terminalia fagifolia* (Garcez *et al.*, 2006) y *Perityle vaseyi* (Asteraceae) (Bohm *et al.*, 1986).

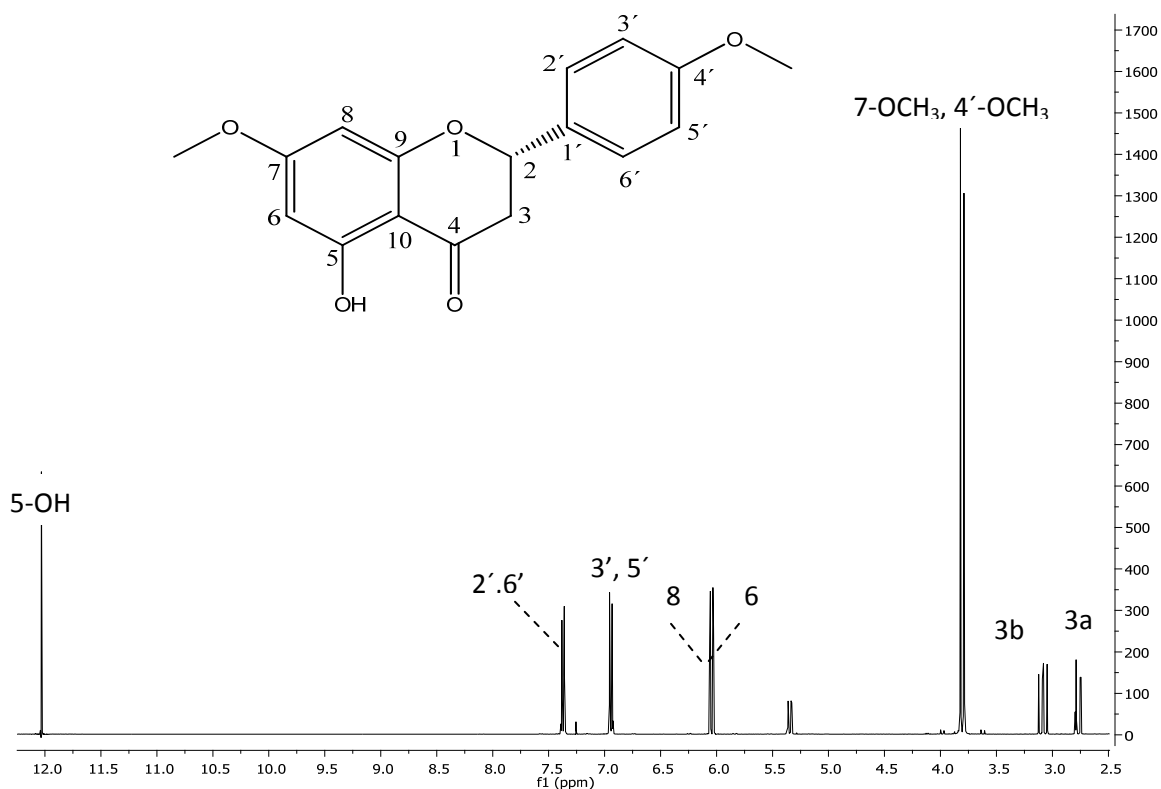


Figura 13. Espectro de RMN-¹H de la 4',7-dimetilnaringenina (**PAN-B2**).

Estudios previos realizados con la finalidad de determinar la actividad biológica de la 4',7-dimetilnaringenina describen la actividad de esta flavanona contra el carcinoma de laringe utilizando la línea celular Hep2, carcinoma mucoepidermoide pulmonar con la línea celular H292 y se le han demostrado propiedades citotóxicas y anticancerígenas (Garcez, 2006). Otros estudios describen la actividad de este compuesto sobre canales Kv 1.3 produciendo la inhibición de la proliferación de la expresión de células cancerígenas (Teisseyre *et al.*, 2009). Por

último, a la 4',7-dimetil naringenina ha sido descrita como un modulador de las bombas de eflujo (Wesolowska, *et al.*, 2007).

5.3 Identificación de la 4',7-dimetilapigenina (3).

El compuesto **PAN-3A** se aisló como un sólido amarillo soluble en diclorometano. La fórmula molecular del compuesto se estableció como $C_{17}H_{14}O_5$ con base en los espectros de RMN y espectrometría de masas. Este flavonoide se identificó siguiendo una estrategia similar a la descrita previamente como la 4',7-dimetilapigenina (Chaves *et al.*, 1988). En la Figura 14 se ilustra el espectro de RMN¹H obtenido para PAN-3A.

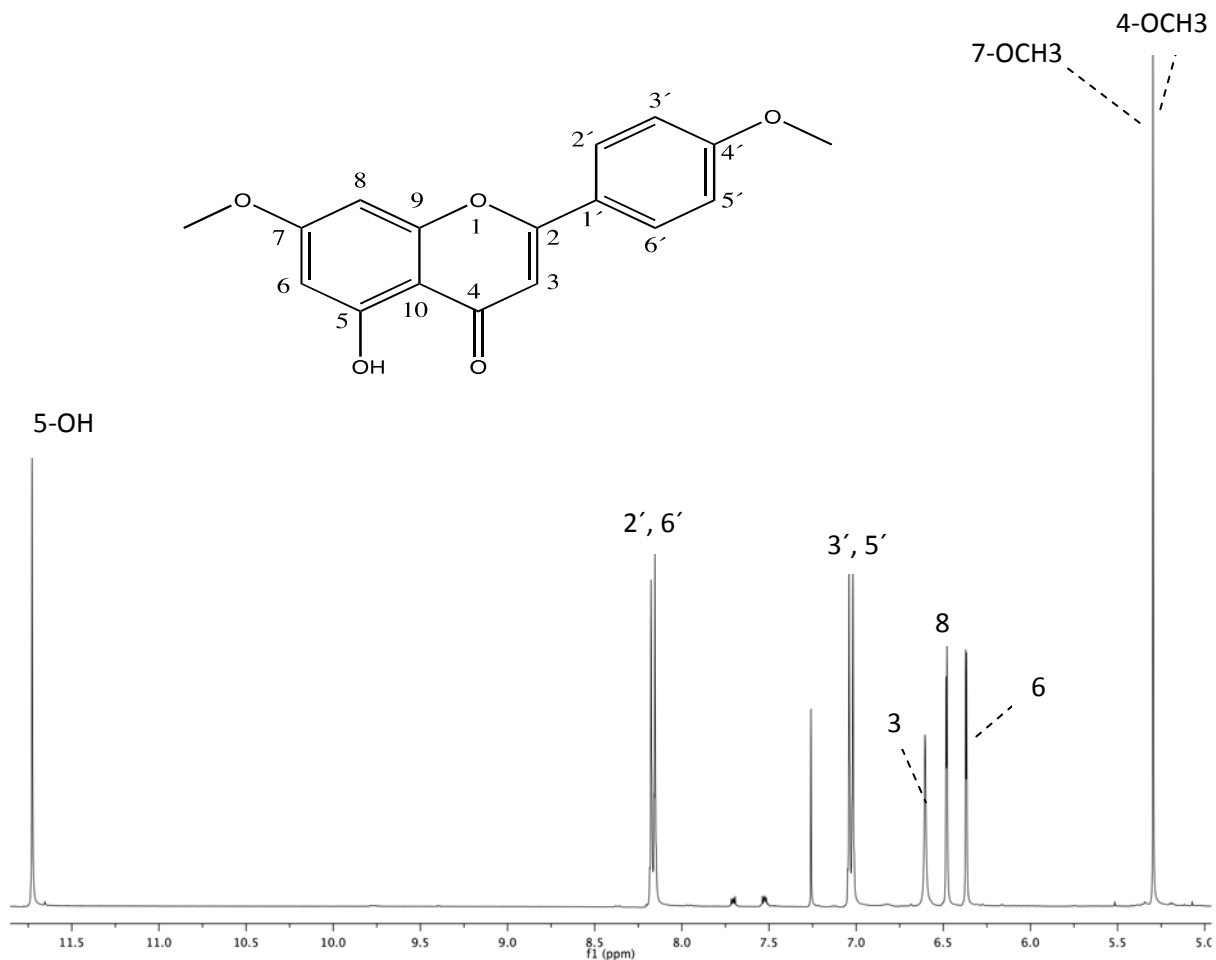


Figura 14. Espectro de RMN¹H de la 4',7-dimetilapigenina (**PAN-3A**).

Es importante destacar que la 4',7-dimetilapigenina es conocida también con el nombre 4',7-dimetoxiapigenina (5-hidroxi-4',7-dimetilflavona), aislado de *Alnus acuminata* (Betulaceae), *A. japonica*, *Boesenbergia pandurata*, *Epimedium sagittatum*, *Saussurea japonica*, *Lethedon tannaensis* y se ha encontrado que muestra un efecto citotóxico contra leucemia murina (P-388), carcinoma de nasofarínge humano (KB) así como actividad antiinflamatoria (Salama *et al.*, 2005).

5.4 Efecto de los compuestos acacetina (PAN-C001), 4',7-dimetilnaringenina (PAN-2B) y 4',7-dimetilapigenina (PAN-3A) sobre la actividad de formación de glucanos mediada por la glucosiltransferasa de *S. mutans*.

Uno de los retos de la odontología actual es el descubrimiento o síntesis de sustancias capaces de inhibir o disminuir la aparición, persistencia y recurrencia de bacterias patógenas con influencia negativa en los tejidos de la cavidad bucal. Diversos compuestos son empleados para el control de la caries dental, utilizando criterios tales como: actividad antimicrobiana, actividad anti-glucosiltransferasa, inhibición enzimática y el reemplazo de sacarosa por otros edulcorantes como el xylitol.

El efecto de los flavonoides (PAN-C001, PAN-2B y PAN-3A) sobre la síntesis de los glucanos por las enzimas glucosiltransferasas de *S. mutans* se determinó con la finalidad de conocer su potencial anticárida de los compuestos. Los tres compuestos se encuentran estructuralmente relacionados, las principales diferencias que se pueden destacar son la ausencia de la doble ligadura en las posiciones C-2 y C-3 y la sustitución de un grupo hidroxilo en la posición C-7 en el caso de la acacetina (PAN-C001). En la Figura 15 se ilustran las estructuras de los compuestos PAN-C001, PAN-2B y PAN-3A.

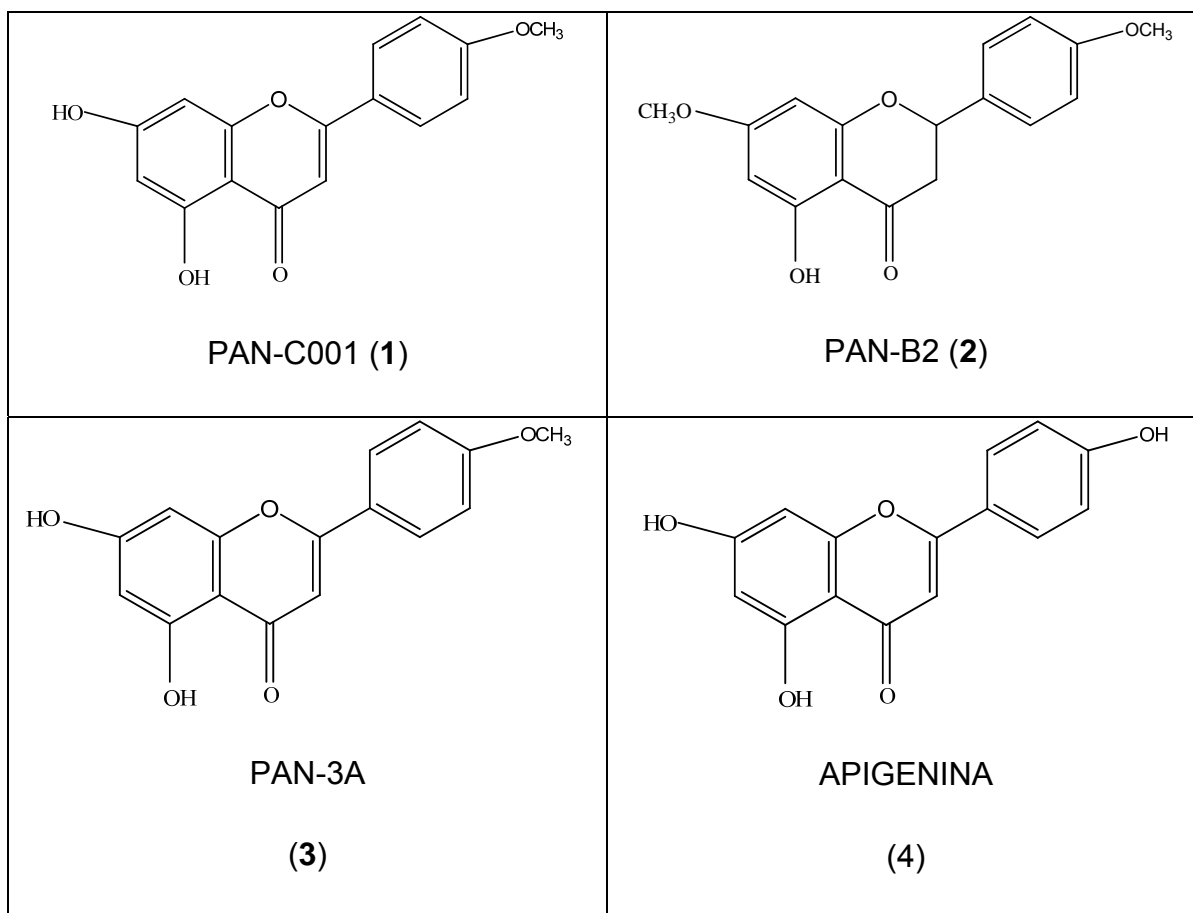


Fig. 15. Estructuras de los flavonoides PAN-C001(1), PAN-B2 (2), PAN-3A (3) y Apigenina.

Antes de determinar el efecto de los flavonoides aislados en el presente trabajo sobre las glucosiltransferasas de *S. mutans* fue necesario determinar las posibles interferencias de los disolventes en los cuales se diluyeron cada uno de estos compuestos (PAN-C001, PAN-B2 y PAN-3A). Los disolventes utilizados fueron metanol para la acetina y la 4',7-dimetilnaringenina, mientras que para el caso de la 4',7-dimetilapigenina se utilizó diclorometano. Como resultado de este ensayo se determinó que el metanol no tenía ninguna influencia sobre la actividad enzimática, mientras el diclorometano, sí interfería en la realización del bioensayo incrementando la absorbancia. En la Figura 16 se observa el efecto sobre la absorbancia de volúmenes crecientes de diclorometano.

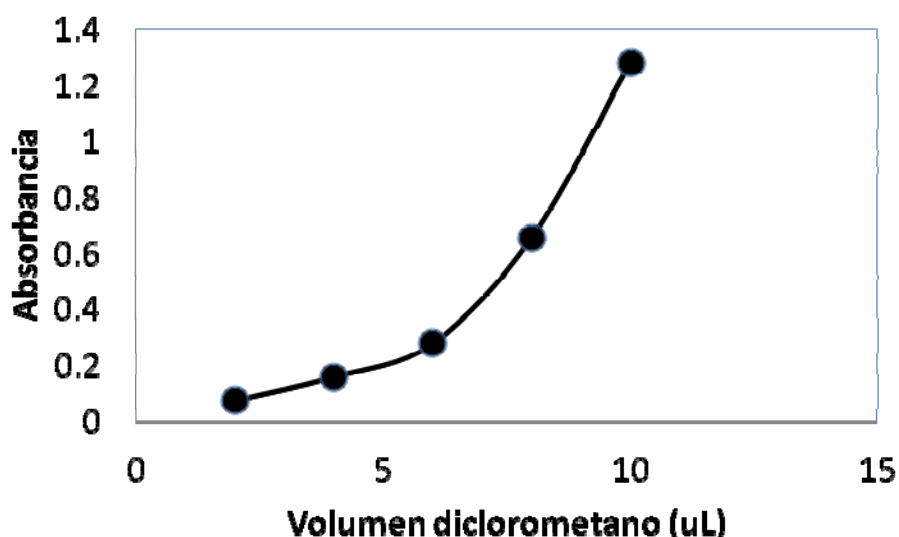


Fig.16. Efecto de volúmenes crecientes de diclorometano en la absorbancia del medio de ensayo utilizado para determinar la actividad de la glucosiltransferasa de *S. mutans*.

Al realizar la determinación de efecto de la 4',7-dimetilapigenina sobre la actividad de las glucosil transferasas de *S. mutans* se encontró que este flavonoide no ocasiona una inhibición de las GTFs, por el contrario, induce un incremento de su actividad. Con la finalidad de corroborar este efecto, el ensayo se repitió tres veces con tres replicas por vez utilizando extractos de glucosiltransferasas diferentes. Por otra parte, es importante destacar que en estudios previos se ha reportado que la apigenina es un potente inhibidor de las glucosiltransferasas de *S. mutans* con un inhibición del 90% a una concentración de 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$, además de inhibir entre un 30 a un 58% la formación del biofilm de *S. mutans* en esferas de hidroxiapatita cubiertas de saliva (Koo *et al.*, 2002).

Las diferencias observadas en la actividad sobre las GTFs para la 4',7-dimetilapigenina (**3**) con respecto a las descritas por Koo y colaboradores (2002) para la apigenina (**4**) tienen como explicación que esta última presenta dos grupos hidroxilo en las posiciones C-4' y C-7 y, en el caso del compuesto **3** estos han sido sustituidos por dos metoxilos. Figura 15. La presencia de los grupos hidroxilo de la apigenina podría ser importante para la interacción con la enzima a través de la formación de puentes de hidrógeno. En la Figura 17 se muestra la curva

dosis respuesta del porcentaje de actividad contra la glucosiltransferasa con respecto a la concentración de la 4',7-dimetilnaringenina.

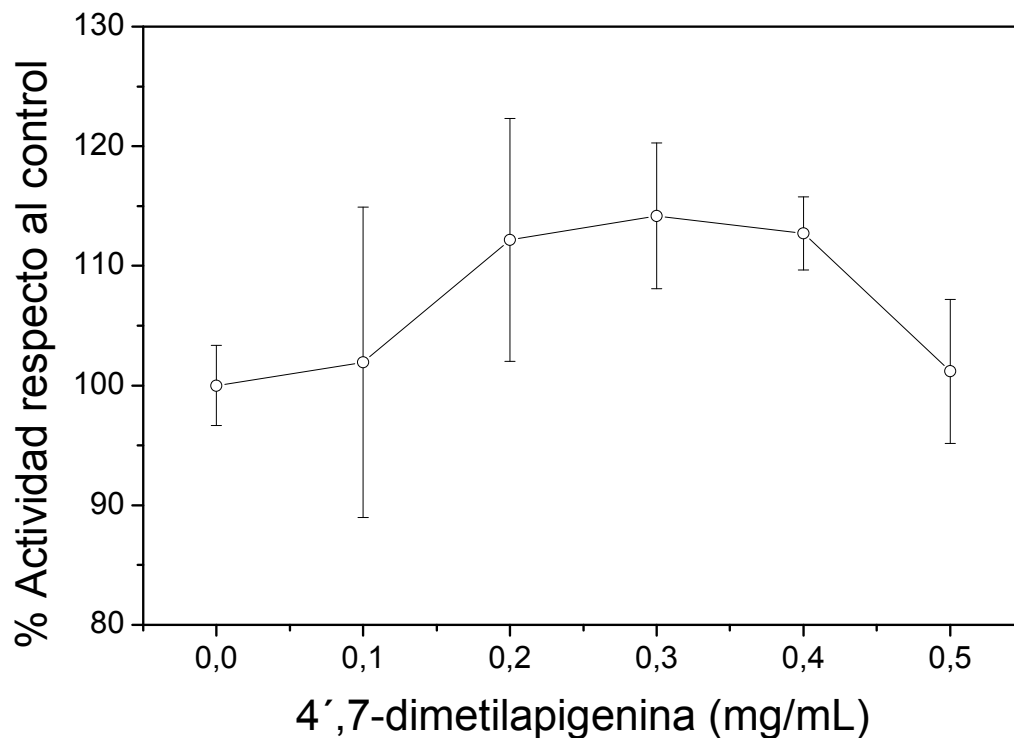


Fig. 17. Curva dosis respuesta de la 4',7-dimetilapigenina sobre la actividad de la glucosiltransferasa. Se considero la actividad en ausencia de compuesto como el 100%.

Por otra parte, el compuesto acacetina (**1**), molécula que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-7, sí produjo un efecto inhibitor en la actividad de las glucosiltransferasas (Figura 18), con una I_{50} de 0.133 mg/mL, concentración similar a la reportada por Koo y colaboradores (2002) para la inhibición de la enzima por el flavonoide apigenina. Se ha explicado que la inhibición de estas enzimas por los flavonoides tiene que ver con la presencia del doble enlace entre las posiciones C-2 y el C-3 (Figura 15), lo que provee un sitio de adición nucleofílica de las cadenas de los aminoácidos de las glucosiltransferasas, en

particular de un residuo de aspártico que se encuentra en una de las cadenas del sitio activo de la enzima y que podría actuar como nucleófilo (Koo *et al.*, 2002).

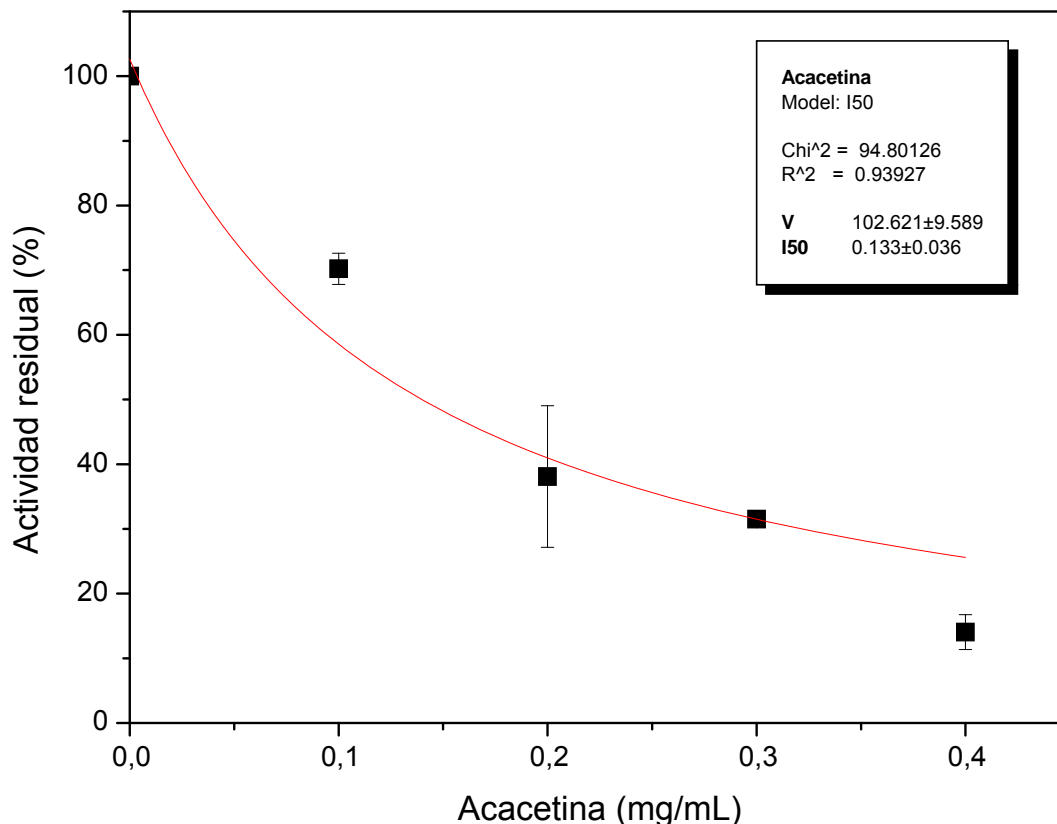


Fig 18. Efecto inhibitorio de la acetina sobre la actividad de la glucosiltransferasa de *S. mutans*. Se realizó el ensayo de actividad de formación de glucanos y se cuantificó la cantidad de glucosa en los glucanos por un método enzimático acoplado a la formación de NADH. La actividad en ausencia de compuesto se consideró como el 100%.

Por último, se evaluó el efecto de la 4',7-dimetilnaringenina sobre las enzimas glucosiltransferasas de *S. mutans*. Es importante destacar que este compuesto no presenta el doble enlace de las posiciones C-2 y C-3. El efecto observado para la 4',7-dimetilnaringenina a la concentración más baja utilizada (0.1 mg/mL) fue el de aumentar la actividad de la enzima y a concentraciones mayores inducir una discreta disminución en la actividad de la enzima. (Figura 19). Debido a que la inhibición de la enzima a 0.2 mg/mL es alta y mayor a la observada a otras concentraciones del compuesto, no se puede determinar un valor de I₅₀ para 4',7-dimetilnaringenina.

Se conoce que algunas plantas y bacterias poseen enzimas glucosiltransferasas, las cuales, utilizan a los flavonoides como sustratos y por esta razón, son capaces de glicosilar a flavonoides como la naringenina y producir compuestos glicosilados (Werner y Morgan, 2009), por lo que el uso de esos compuestos como sustrato de las glucosiltransferasas de bacterias es posible. Sin embargo, debido a la modesta inhibición que ocasiona la 4',7-dimetilnaringenina en la glucosiltransferasa no es posible proponerlo como un candidato ideal para ser usado como compuesto anticaries.

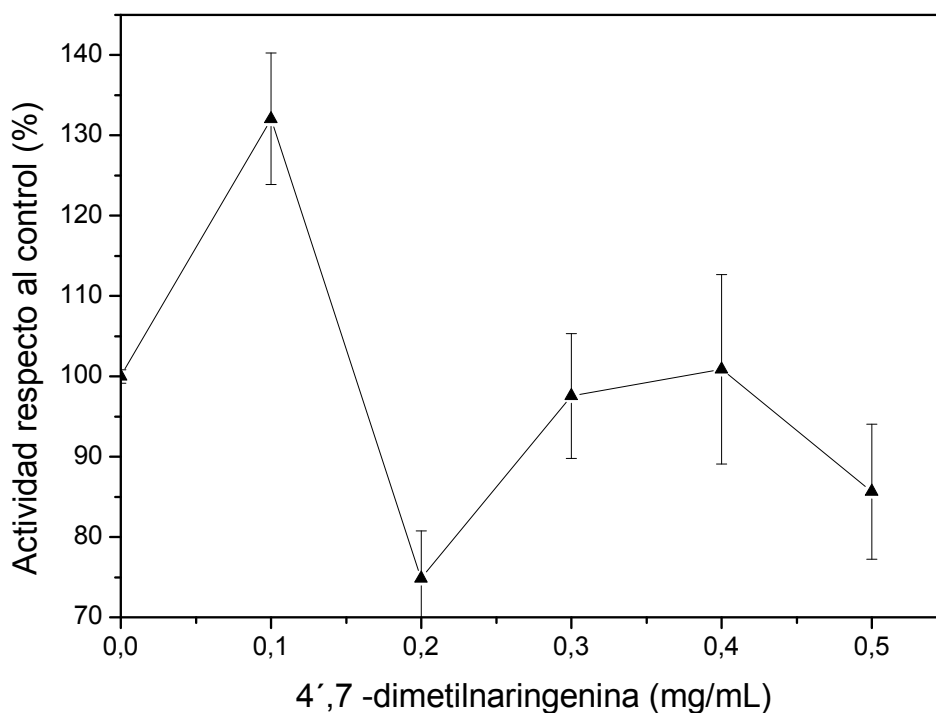


Fig 19. Efecto de 4',7-dimetilnaringenina a en la actividad de las glucosiltransferasas de *S. mutans*.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- i) El proceso de extracción mediante maceración con etanol de una muestra de propóleo colectado en la zona rural de la Ciudad de México permitió la obtención de un extracto etanólico activo.
- ii) El estudio químico biodirigido del extracto etanólico preparado a partir del propóleo, permitió el aislamiento y la caracterización de tres flavonoides (acacetina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina).
- iii) Los flavonoides evaluados en el ensayo sobre el efecto inhibitorio de las GTFs mostraron comportamientos distintos, sin embargo, fue posible determinar que la acacetina posee un efecto inhibitorio sobre la actividad de las GTFs, mientras que la 4',7-dimetilnaringenina presentó una modesta inhibición. Por último, 4',7-dimetilapigenina no tuvo actividad inhibitoria sobre las GTFs.
- iv) La presencia del flavonoide acacetina corrobora el uso del propóleo como agente antibacteriano y anticarcinógeno. En estudios previos realizados se ha encontrado que la acacetina presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) para *S. mutans* de 250 µg/ml. (Medina M. 2010).

7. PERSPECTIVAS

- ❖ Continuar el estudio químico y biológico de las fracciones secundarias y terciarias que fueron aisladas en el presente proyecto, con la finalidad de aislar y purificar compuestos minoritarios para su posterior estudio biológico.
- ❖ Desarrollar un método analítico por HPLC para cuantificar a los flavonoides acacetina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilnaringenina y así establecer una relación cuantitativa en los diferentes propóleos de la región de Milpa Alta.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiko, E., Saido, T., Fukushima, K. (1999). Inhibitory effect of a self derived peptide on glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(28): 15797–15802.
- Bankova, V. (2000). Determining quality in propolis samples. *J. Am. Apither. Soc.*, 7(2).
- Bankova, V. (2005) Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1): 29-32.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Naturforsch*, 57: 530-533.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.*, 15(7): 561-571.
- Benito de Cárdenas, I. (1994). Efecto del tratamiento preventivo sobre la microflora salival: recuento de estreptococos. *Rev. Asoc. Odontol. Argent.*, 82(2): 126-31.
- Bojanich, A., Calamari, S., Cornejo, L., Barembaum, S., Virga, C., Dorronsoro, S. (2003). Efecto de polímeros sobre los niveles de IgAs anti-*Streptococcus mutans* y la producción de dextranos de *Streptococcus mutans* autóctonos (estudio *in vitro* e *in vivo*). *Av Odontoestomatol*, 19(5).
- Bowen, W., Koo, H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.*, 45: 69-86.
- Burdock, G. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.*, 36(4): 347-363.
- Cañas, S. (2002). Els Productes del Rusc. *Mètode*, (33): 51-55.
- Castaldo, S., y Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73:S1-S6.

- Chaves, N., Rios, J., Gutierrez, C., Escudero, J. y Olias, J. (1988). Analysis of secreted flavonoid of *Cistus ladanifer* L. by high performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *Journal of chromatography*, 799: 111-115.
- Choi, Y., Lee, W., Nam, S., Choi, K., Park, Y. (1999). Apoptosis induced by propolis in human hepatocellular carcinoma cell line. *Int J Mol Med*, 4(1):29-32.
- Cuesta, O., Frontana, B., Ramírez, T., Cárdenas, J. (2002). Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Z Naturforsch*, 57:372-378.
- Da Silva-Leitao, D., Da Silva-Filho, A., Morseli-Polizello, A., Bastos, J., Cropanese-Spadaro A. (2004). Comparative evaluation of *in vitro* effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 27:1834-1839.
- Dausch, A., Morales, C., Fort, P., Park, Y. (2008). Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative Medicine*, 5(4):435-441.
- Dayon, S., Ying, Wang., Yi-Han, Zhou., Yingjie, Guo., Juan, Wang., Hui, Zhou., Ze-Sheng, Li., Paul, J. (2009). Fawcett. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug metabolism & Disposition March*, 37(3):629-634.
- Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L., Gismondo, M.R. (2007). In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1914–1921.
- Duddeck, H., Snatzke, G., Yemul, S. (1978). ^{13}C NRM and CD of some 3,8"-bioflavonoids from *Garcinia* species and related flavonones. *Phytochemistry*. 17(8): 1369-1373.

- Durk E. (1997). The Ability of bee products to modulate human immune system. Eight International Symposium on trends in Biomedicine in Finland: allergy, oxidants and antioxidants, and human health.
- Farre, R., Frassetto, L., Sanchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45(1):21-43.
- Fernandez Junior, A., Balestrin, E., Betoni, J., Orsi Rde, O., Da Cunha, M., Montelli, A. (2005). Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(5):563-566.
- Gambaro, V., Piovano, M., Garbarino, J. (1986). 9-acetoxynerylidol from *Phrodusbridgesii*. *Phytochemistry*, 25(3):739-740.
- Garcia, B., Saldaña, B., Basterrechea, M. (2008). Extracellular bacterial glucans: structure, biosynthesis and function. *Revista Cubana Estomatología*, 45:3-4.
- Gomez, M., Arráez, D., Moreno, R., Garcia, P., Segura, A., Fernandez, A. (2005). Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13(1):43-50.
- Hamada, S., Slade, H. (1980). Biology, Immunology, and Carcinogenicity of Streptococcus, *Microbiological reviews*, 44(2):331 – 384.
- Hegazi, A., Abd El Hady, F. (2001). Egyptian propolis: 1 Antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. *Z Naturforsch*, 56(1-2): 82-88.
- Hegazi, A., Abd El Hady, F. (2002). Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z Naturforsch*, 57(3-4):395-402.
- Herrera, C., Fritz, O., Montenegro, G., Alvear, M., Del Sol, M., Salazar, L. (2010). El propoleo reduce la esteatosis hepática inducida por la dieta en ratones. *Int. J. Morphol*, 28(1):75-84.

- Hsiang, S., Yang, M., Ween, H., Chern, J. (2005) Analysis of Flavonoids in Propolis by Capillary Electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13(1):43-50.
- Jiang, L., Fang, G., Zhang, Y., Cao, G., Wang, S. (2008). Analysis of Flavonoids in Propolis and *Ginkgo biloba* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Agric. Food Chem*, 56(24):11571–11577.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Troullidou, E., Mourtzinis, I., Karathanos, V. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116:452-461.
- Koga C. (1995). Testes de atividade de cárie. *RGO Porto Alegre*, 43(3): 141-4.
- Koo, H., Pearson, S., Scott-Anne, K., Abranches, J., Cury, J., Rosalen, P., Park, Y., Marquis, R., Bowen, W. (2002). Effects of apigenin and *tt*-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(5):1 302-1309.
- Koru, O., et al. (2007). In vitro antimicrobial activity of propolis samples of different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, 13: 140-145.
- Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Mavi, S., Bienzle, U., Eich, E. (2003). *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytother Res*, 17:123–8.
- Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 64(3):235-240.
- 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. *Chem Pharm Bull*, 51(6):740-742.

- Labouble, R., y Zozaya, J. (1986). La Apicultura en México. *Ciencia y Desarrollo*, 12(69):17-36.
- Lago, J., Young, M. C., Reigada, J., Soares, M., Roesler, B., Kato, M. (2007). Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. Ihotzkyanum* (piperaceae) *Quim. Nova*. 30(5): 1222-1224.
- Lahtinen, M., Kapari, L., Kentta, J. (2006). Newly hatched neonate larvae can glycosylate: The fate of *Betula pubescens* flavonoids in first instar *Epirrita autumnata*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(3).
- Lin, S., Chung, C., Chiang, C., Hsu, S. (1999). The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. *Am J Chin Med*, 27(1):83-94.
- Lin, Y., Kwon, Y., Labbe, R., Shetty, K. (2005). Inhibition of *Helicobacter pylori* and Associated Urease by Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Appl. Environ. Microbiol*, 71:8558–8564.
- Martins, R., Péreira, E. Jr., Lima, S., Senna, M., Mesquita, R., Santos, V. (2002). Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J. Oral Sci*, 44(1):41-48.
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., Tomas, B. F. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J Agric Food Chem*, 45(8): 2824-2829.
- Medina, M. (2010). Compuestos derivados del extracto etanólico del propóleo con actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Menghinello, P., Cucchiari, L., Palma, F., Agostini, D., Dacha, M., Stocchi, V. (1999). Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using an RP-HPLC method. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 22(19):3007-3018.

- Mirzoeva, O., and Calder, P. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids*, 55(6):441–449.
- Moreno, Z., Martines, P., Figueroa, J. (2007). Efecto antimicrobiano in vitro de propoleos argentinos, colombianos y cubanos sobre *Streptococcus mutans*. *Cientifica*, 5(7): 75-77.
- A.- Muñoz, O., Peña, R., Ureta, E., Montenegro, G., Caldwell, C., Timmermann, B. (2001). Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z Naturforsch*, 56:273-277.
- B.- Muñoz, O., Peña, R., Ureta, E., Montenegro, G., Timmermann, B. (2001). Propolis from Chilean matorral hives. *Z Naturforsch*, 56(3-4):269-272.
- Murat, K., Serdar, K., Semra, K. GC-MS. (2002). Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z Naturforsch*, 57: 905-909.
- Orsolid, N., Basid. (2003). Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol*, 84(2-3):265-73.
- Pan, M., Lai, C., Wang, Y., Ho, C. (2006). Acacetin suppressed LPS-induced upexpression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumorpromotion in mice. *Biochem Pharmacol*, 72:1293–303.
- Park, Y., Alencar, S., Aguiar, C. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*, 50(9):2502-2506.
- Peña, R. (2008). Propolis standardization: a chemical and biological review *Cien. Inv. Agr.*, 35(1):17-26.
- Rivera, J. (2002). The potencial sustainability of two contrasting systems in the terrace areas of Mexico City. Imperial College, London. *PhD Thesis*. 80-95.
- Rivera, J., Losada, H., Lopez, M., Cortes, J., Vieyra, J., Grande, D. (2011). Sistema de producción de miel en las áreas peri-urbanas de Milpa Alta, sureste de Ciudad de México. *Livestock Research for Rural Development*, 19(29).

- Ruela, R., Fuhler, G., Blom, N., Ferreira, C., Aoyama, H., Peppelenbosch, M. (2010). Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death and Disease*, 1(19).
- SAGARPA 2001. Programa nacional para el control de la abeja africana. Información estadística del censo apícola en la península de Yucatán. Delegación Regional. Mayo de 2001. 1-17.
- Salama, A., Avendaño, I. (2005). Actividad antiinflamatoria de δ -amirona y 4',7-dimetoxiapigenina aislado de *Alnus acuminata*. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, 34(2): 117-121
- Saravana, K., Mahitosh, M. (2009). Antiproliferative Effects of Honey and of its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol.2009
- Sathiavelu, .J, Senapathy, G., Devaraj, R., Namasivayam, N. (2009). Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *J Pharm Pharmacol*, 61(6):809-817.
- Scheller, S., Dworniczak, S., Waldemar-Klimmek, K., Rajca, M., Tomczyk, A., Shani, J. (1999). Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Z Naturforsch C A J Biosci*, 54(7-8):549-553.
- Soleo de Funari, C., Oliveira, V., Mathor, M. (2007). Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 206–212.
- Sorkun, K., Süer, B., Salih, B. (2001). Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Z naturforsch*, 56(7-8):666-668.
- Szliszka, E., Czuba, Z., Bronikowska, J., Mertas, A., Paradysz, A., Krol, W. (2011). Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-Induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2011.

- Vynograd, N., Vynograd, I., Sosnowski, Z. (2000). A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7(1):1-6.
- Werner, S., Morgan, J. (2009). Expression of a *Dianthus* flavonoid glucosyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* for whole-cell biocatalysis. *J Biotechnol*, 142 (3-4): 233-41.
- White, D. G., Zhao, S., Singh, R., McDermott, P. F. (2004). Antimicrobial resistance among gram-negative foodborne bacterial pathogens associated with foods of animal origin. *Foodborne Pathog*, 1:137-152.
- Wollenweber, E., Buchmann, S. (1997). Feral honey bees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Z Naturforsch C A J Biosci*, 52(7-8):530-535.
- Ya-Ling Hsu, Po-Lin Kuo, Chi-Feng Liu, Chun -Ching Lin.(2004). Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Science*, 212(1):53-60.
- Yin, Y., Gong, F., Wu, X., Sun, Y., Li, YH, Chen, T., Xu, Q. (2008). Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol*, 120:1–6.