



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE PROPÓLEOS
RECOLECTADOS EN LA ZONA MELÍFERA DEL ALTIPLANO”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. GABRIELA LIZETH ZARCO ESPINOSA



TUTOR: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

AÑO: 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	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Secretario	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcaba

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Q.F.B. Gabriela Lizeth Zarco Espinosa

Sustentante

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Tutor

El presente trabajo fue presentado en la 8va Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales que se llevó a cabo del 23 al 25 de mayo de 2012, en la UMAR-Huatulco, Oaxaca, México, en modalidad cartel.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de permanecer a ella y brindarme una mejor educación para forjarme como profesionista y que mediante el Posgrado en Ciencias Químicas me ha permitido continuar creciendo académica y profesionalmente.

A CONACyT por la beca otorgada (245525) para realizar mis estudios en el Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por brindarme su apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado asignado por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo de tesis y por sus valiosas observaciones y comentarios para mejorarlo.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz, por su valioso apoyo brindado en el manejo del equipo HPLC, que contribuyó en una parte importante para la realización de esta tesis.

A la Q. Georgina Duarte Lisci, por su apoyo durante la realización de los análisis de CG-EM.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los distintos espectros utilizados en esta investigación.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal por el apoyo económico otorgado para realizar el presente trabajo mediante el proyecto PICA10-27.

Índice

I. Lista de abreviaturas.	III
II. Lista de figuras.	V
III. Lista de diagramas y gráficas.	VIII
IV. Lista de tablas.	IX
1 Resumen.	11
2 Antecedentes.	13
2.1 <i>Propóleo.</i>	13
2.1.1 Definición y generalidades.	13
2.1.2 Usos en la medicina tradicional: Propiedades biológicas y farmacológicas.	14
2.1.3 Otras actividades del propóleo.	20
2.1.4 Clasificación del propóleo de acuerdo a su origen.	21
2.1.5 Composición química.	24
2.1.6 Preparados que contienen propóleo en su composición.	32
2.2 <i>Estrés oxidante: definición y generalidades.</i>	36
2.2.1 Antioxidantes: definición y clasificación.	38
2.2.2 Patologías asociadas al estrés oxidante.	40
3 Justificación y objetivos.	42
4 Desarrollo experimental.	44
4.1 <i>Material vegetal.</i>	44
4.2 <i>Procedimientos generales de análisis.</i>	45
4.2.1 Análisis cromatográficos.	45
4.2.2 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.	45
4.3 <i>Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.</i>	46
4.3.1 Identificación de la presencia de pinocembrina.	46
4.3.2 Cuantificación de la pinocembrina.	47
4.4 <i>Cuantificación del contenido de fenoles totales.</i>	47
4.5 <i>Cuantificación del contenido de flavonoides totales.</i>	48
4.6 <i>Evaluación de la actividad antioxidante.</i>	48
4.6.1 Actividad inhibidora del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH).	48
4.6.2 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS ⁺).	49
4.6.3 Medida de la capacidad reductora: Ensayo FRAP.	49

4.7	<i>Evaluación de la actividad antibacteriana.</i>	50
4.7.1	Microorganismo de prueba.	50
4.7.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	50
4.7.3	Procedimiento general del ensayo.	51
4.8	<i>Microextracción en fase sólida de la fase gaseosa acoplada a cromatografía de gases con espectrometría de masas en tiempo de vuelo (HS-SPME-CG-EM-TOF).</i>	52
4.8.1	Microextracción.	52
4.8.2	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM).	52
4.8.3	Obtención del índice de concentración (F_{ij}).	53
4.8.4	Identificación de los compuestos volátiles.	55
4.9	<i>Estudio fitoquímico biodirigido del propóleo obtenido en el apiario de "Acuexcomatl".</i>	55
4.9.1	Preparación del extracto.	55
4.9.2	Fraccionamiento primario del extracto etanólico.	55
4.9.3	Fraccionamiento secundario.	56
4.9.4	Aislamiento y purificación de los compuestos flavonoides.	57
5	Resultados y discusión.	60
5.1	<i>Estudio fitoquímico biodirigido del propóleo Acuexcomatl.</i>	62
5.1.1	Caracterización estructural de los metabolitos aislados.	70
5.2	<i>Comparación de la actividad biológica, del contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de los propóleos.</i>	81
5.3	<i>Cuantificación por HPLC del flavonoide pinoembrina (1).</i>	83
5.4	<i>Análisis de la composición de volátiles.</i>	87
6	Conclusiones.	104
7	Perspectivas.	105
8.	Anexo 1	106
9.	Referencias.	116

I. Lista de abreviaturas.

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6 sulfonato de amonio
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
ERO	Especies reactivas de oxígeno
DE	Desviación estándar
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazilo
FRAP	Poder antioxidante reductor de fierro
h	Hora
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
HPLC	High-performance liquid chromatography
HS-SPME-GC-MS-TOF	Head space in solid phase microextraction to gas chromatography coupled with mass spectrometry time of flight
HS	Fase gaseosa
IFN	Interferon
IL	Interleucina

I. Lista de abreviaturas (continuación).

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
J	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
µg	Microgramo
µl	Micro litro
µmol	Micromol
mg	Miligramo
mmol	Milimol
mL	Mililitro
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PGE	Prostaglandina
ppm	Partes por millón
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
SPME	Microextracción en fase sólida
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
TFA	Ácido trifloro acético
TIC	Cromatograma iónico total
ton	Toneladas

II. Lista de figuras.

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Apariencia física de la muestra de propóleo recolectada en el apiario de Acuexcomatl.	14
2	Patrones quimiogeográficos de los tipos de propóleos.	22
3	Mapa de la República Mexicana en donde se muestran las 5 regiones apícolas en que se divide el territorio nacional.	24
4	Muestra de productos disponibles en el mercado con propóleo en su composición.	32
5	Productos encontrados en el mercado a base de propóleo y de otras especies vegetales.	33
6	Reacciones de formación y eliminación de especies reactivas oxígeno (ERO).	37
7	Ubicación geográfica de los apiarios en dónde se recolectaron los propóleos analizados.	44
8	Mecanismo de acción de los antioxidantes ABTS ^{•+} y DPPH [•] .	65
9	Estructuras químicas de los cinco compuestos aislados a partir del extracto etanólico del propóleo colectado en el apiario Acuexcomatl.	67
10	Estructura química de la pinocembrina y sus datos de espectrometría de masas.	70
11	Espectro de RMN ¹ H de pinocembrina (1).	72
12	Espectro de RMN ¹³ C de pinocembrina (1).	72

II. Lista de figuras (Continuación).

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
13	Estructura química de la alpinetina (3) y de la 5-metileterpinobanksina (6).	73
14	Espectro de RMN ¹ H de la mezcla de alpinetina (3) y 5-metileterpinobanksina (6).	75
15	Espectro de RMN ¹³ C de la mezcla de alpinetina (3) y 5-metileter pinobanksina (6).	75
16	Espectro NOE de la mezcla de alpinetina (3) y 5-metileterpinobanksina (6).	76
17	Identificación por HPLC de pinocembrina (1) en los extractos etanólicos de los propoleos colectados.	84
18	Perfiles cromatográficos obtenidos para los extractos etanólicos de los propóleos recolectados.	86
19	Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en el propóleo colectado en el apiario Acuexcomatl obtenido por la técnica HS-SPME-GC-MS-TOF utilizando tres fibras diferentes.	88
20	Comparación de los espectros de masas del α -pineno y 3-careno.	91
21	Comparación del cromatograma iónico total de los estándares empleados y el cromatograma iónico total obtenido de la muestra del propóleo proveniente del apiario Acuexcomatl para la obtención de los índices de Kovats.	92
22	Comparación de los cromatogramas iónicos totales de los propóleos estudiados.	94

II. Lista de figuras (Continuación).

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
A	Curvas de calibración utilizadas para la determinación de la capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales.	107
B	Espectros de RMN ¹ H, RMN ¹³ C y NOE de la 4',7-dimetilnaringenina (5) .	110
B-a	Espectro NOE de la 4',7-dimetilnaringenina (5) .	111
C	Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C de la acetina (2) .	112
C-a	Espectro NOE de la acetina (2) .	113
D	Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C de la galangina (4) .	114
E	Perfiles cromatográficos obtenidos para los extractos etanólicos de los propóleos evaluados a una concentración de 2.0 mg/mL.	115

III. Lista de diagramas y gráficas.

<i>Diagrama</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Procedimiento del fraccionamiento primario y secundario del extracto etanólico obtenido a partir del propóleo “Acuexcomatl”.	59

<i>Gráfica</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Actividad antioxidante y antibacteriana, contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico y las fracciones derivadas del fraccionamiento del propóleo seleccionado.	66
2	Actividad antioxidante y antibacteriana de los compuestos aislados a partir del propóleo de Acuexcomatl.	69

IV. Lista de tablas.

<i>Tabla</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Estructura química de algunos compuestos aislados a partir del propóleo.	25
2	Preparados comerciales que contienen propóleo asociados con extractos de diferentes plantas medicinales.	34
3	Clasificación de los antioxidantes.	39
4	Ubicación geográfica de los apiarios	44
5	Testigos utilizados en el ensayo biológico, para determinar la CMI.	51
6	Resumen de las condiciones de preparación y análisis de las muestras de los diferentes propóleos analizados por la técnica HS-SPME-CG-EM-TOF.	54
7	Fraccionamiento secundario por cromatografía de la fracción primaria F-AcOEt.	56
8	Resumen del fraccionamiento ternario de la fracción F-F.	58
9	Ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas para los ensayos de ABTS, DPPH, FRAP, fenoles y flavonoides totales.	62
10	Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los compuestos aislados en RMN ¹ H y RMN ¹³ C.	78
11	Contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos de los propóleos colectados.	81

IV. Lista de tablas (Continuación).

<i>Tabla</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
12	Actividad inhibidora de los extractos etanolicos de los propoleos en estudio frente a los radicales DPPH' y ABTS'+ y habilidad reductora por el ensayo FRAP	82
13	Ecuaciones de las curvas de calibración de pinocembrina realizadas para los dos sistemas cromatográficos utilizados.	85
14	Contenido de pinocembrina en los extractos etanólicos de los diferentes propóleos analizados.	85
15	Valores del índice de capacidad de concentración F_{ij} del propóleo colectado en el apiario Acuexcomatl para las tres fibras empleadas.	87
16	Compuestos volátiles obtenidos para las 3 fibras empleadas en el propóleo "Acuexcomatl"	88
17	Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas.	95
A	Resumen de los valores obtenidos para la actividad antioxidante y antimicrobiana.	108

1 Resumen.

El propóleo es un material multifuncional utilizado por las abejas para la construcción, el mantenimiento y la protección de sus colmenas. Desde la época antigua, este recurso natural ha sido aprovechado por el hombre debido a sus propiedades antibacterianas, antibióticas, antifúngicas, antivirales, antitumorales y antioxidantes, entre otras. Desde el punto de vista químico, el propóleo se compone básicamente de 50% de resinas y bálsamos vegetales; 30% de ceras; 10% de aceites esenciales y aromáticos; 5% de polen y 5% de otras sustancias. En este sentido, en literatura describe el aislamiento de más de 300 compuestos entre los que destacan compuestos de carácter fenólico, terpenoide, esteroide, flavonoide, azúcares y aminoácidos.

Estudios farmacológicos previos han permitido demostrar que tanto su actividad biológica como su potencia están relacionadas con su composición química. Esta composición es altamente variable y se encuentra íntimamente ligada con la zona geográfica, la vegetación y la época de recolección.

En este marco de referencia, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en determinar la composición química, la capacidad antioxidante y la actividad antibacteriana de extractos etanólicos preparados a partir de diferentes muestras de propóleos colectados en la zona rural del Distrito Federal.

En el presente trabajo se describe el estudio fitoquímico del extracto etanólico de una muestra de propóleo proveniente del apiario “Acuexcomatl” ubicado en la Delegación Xochimilco del Distrito Federal. La aplicación de diferentes procedimientos cromatográficos permitió el

aislamiento de pinocembrina (**1**), acacetina (**2**), alpinetina (**3**), 4',7-galangina (**4**), dimetilnaringenina (**5**) y 5-metileterpinobanksina (**6**). Como ensayos biológicos se utilizaron: la capacidad antioxidante frente a los radicales DPPH[·] y ABTS^{·+}, así como capacidad de reducir a fierro (por sus siglas en inglés FRAP, Ferric Reducing Ability of Plasma); además de determinar su actividad sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.. La galangina (**4**) presentó la mayor actividad antioxidante y la pinocembrina (**1**) el mejor efecto antibacteriano, con respecto a los otros compuestos aislados.

El trabajo también incluye la cuantificación de pinocembrina (**1**), el contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico de cinco propóleos recolectados, siendo el extracto etanólico del apiario Buhó quien posee el mayor contenido de dicho flavonoide y dichos compuestos. Sin embargo, los cinco propóleos cumplen con el contenido de fenoles y flavonoides totales establecidos en las normas de calidad emitidas por Argentina y Brasil.

Por otra parte, se realizó la determinación de los compuestos volátiles presentes en cada propóleo utilizando la técnica de microextracción en fase sólida a partir de la fase gaseosa separada por cromatografía de gases y analizada por espectrometría de masas en tiempo de vuelo (HS-SPME-GC-MS-TOF). Dicho análisis permitió establecer que los terpenoides son sus principales constituyentes.

2 Antecedentes.

2.1 Propóleo.

2.1.1 Definición y generalidades.

La palabra propóleo deriva de los vocablos griegos “*pro*” (defensa de) y “*polis*” (ciudad o colmena) de tal forma que propóleo significa “protección de la colmena” (Ghisalberti, 1979). El propóleo es una sustancia resinosa resultante de la mezcla de enzimas salivales de las abejas con materiales de carácter lipofílico recolectados a partir de las yemas y las grietas de la corteza de diversas plantas como son el álamo, el castaño de Indias, los abedules y las coníferas (Bankova, 2005; Gardana, 2007).

La recolección del propóleo a partir de las colmenas se realiza raspando o colocando trampas, siendo este último método el que produce propóleos de mejor calidad y con menor contaminación por plomo. En las zonas templadas la obtención del propóleo se realiza antes de la llegada del invierno, mientras que en los climas tropicales se hace al inicio de la estación lluviosa que es cuando la propolización parece ser más activa (Farré *et al.*, 2004). En este sentido, la época y el método de recolección representan dos aspectos importantes para considerar, ya que la recolección puede realizarse en la temporada donde se determine que existen las concentraciones más elevadas de los compuestos que poseen las actividades biológicas de interés (Sforcin, 2007).

Físicamente, el propóleo puede describirse como una sustancia dura y quebradiza a bajas temperaturas, sin embargo, si es calentado levemente se torna maleable y viscoso; su coloración varía del amarillo-verdoso al marrón oscuro, lo cual se debe básicamente a las fuentes vegetales y a su

antigüedad (Burdock, 1998). Generalmente, posee un sabor acre aunque a veces es amargo y tiene un aroma semejante al de la miel debido a los compuestos volátiles presentes en el mismo (Niraldo, 2005). Su punto de fusión oscila entre 60-70 °C aunque en algunos casos puede llegar hasta 100 °C (Marcucci, 1995). En la **Figura 1** se ilustra la apariencia física de una muestra de propóleo recolectada en el apiario de Acuexcomatl de la zona rural del Distrito Federal.



Figura 1. Apariencia física de la muestra de propóleo recolectada en el apiario de Acuexcomatl.

2.1.2 Usos en la medicina tradicional: Propiedades biológicas y farmacológicas.

El propóleo es utilizado por las abejas como antimicrobiano (Bankova, 2005), para suavizar las paredes internas y sellar agujeros en la colmena, de esta forma se reduce la entrada de frío, viento y de posibles intrusos (Burdok, 1998). Por otra parte, esta resina es utilizada para embalsamar animales pequeños muertos que no pudieron ser retirados de la colmena, evitando así su putrefacción (Niraldo, 2005).

El propóleo ha sido aprovechado por el hombre desde la edad antigua, ya que su uso se remonta a la época de los Egipcios, quienes al igual que las abejas, lo utilizaban para embalsamar cadáveres (Ghisalberti, 1979); por otra parte, los Incas lo utilizaban como antipirético; los griegos y los romanos como antiinflamatorio en el tratamiento de heridas, úlceras y abscesos (Castaldo y Caspaso, 2002). En los siglos XII–XV, se utilizó como antiinflamatorio bucal y en el tratamiento de las caries dentales, resfriados y forúnculos (Castaldo y Caspaso, 2002). En Europa, entre los siglos XVII–XIX se destacó por sus propiedades antibacterianas y, finalmente, a partir de 1900 el propóleo fue utilizado como desinfectante y cicatrizante (Niraldo, 2005). Esta última propiedad es aprovechada en África, hace más de 90 años, combinando esta resina con la vaselina para confeccionar pomadas antibacterianas (Marcucci, 1996).

Es así, que a través de los años esta resina ha sido y continúa siendo utilizada debido a sus múltiples y versátiles propiedades biológicas antibacterianas, antibióticas, antifúngicas (Hegazi, *et al.*, 1996 y 2000), antivirales (Volpi, 2006), antiprotozoarias (Castaldo y Caspaso, 2002), antitumorales, inmunoestimulantes (Zhou, 2008), antiulcericas, hipotensoras, citostáticas (Bruschi, 2003), antioxidantes, antineoplásicas, antiinflamatorias (Peña, 2008), anestésicas, antisépticas, cicatrizantes (Hroboňová, 2009), bacteriostáticas, coléricas, espasmolíticas (Burdok, 1998), antihipertensivas (Niraldo, 2005), antidiabéticas (Sforcin y Bankova, 2011), regeneradoras de tejido cartilaginoso y tejido óseo (McLennan, 2008), además el propóleo posee acción desintoxicante en el hígado (Marcucci, 1996).

2.1.2.1 Actividad antimicrobiana.

Estudios previos han demostrado la eficacia del propóleo contra el crecimiento de bacterias Gram positivo (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus*

spp., *Bacillus* spp.) y bacterias Gram negativo (*Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter aerogenes*, *Bordetella bronchiseptica*, *Serratia marcescens*) (Dobrowalski, 1991; Marcucci, 1996; Ataç-Uzel, 2005; Castaldo y Caspaso, 2002). Además, estudios previos han demostrado que extractos derivados del propóleo presentan actividad contra el protozoario *Trypanosoma cruzi* (Castaldo y Caspaso, 2002).

Por otra parte, extractos provenientes de propóleos demostraron actividad contra *Candida albicans*, *Microsporum* sp., *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum* (Marcucci, 1995; Farré, 2004; Castaldo y Caspaso, 2002). También, presentan actividad contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), del herpes, de las influencias tipo A y B y de la viruela (Marcucci, 1995; Castaldo y Caspaso, 2002).

Los principales componentes con actividad antimicrobiana presentes en los propóleos son del tipo flavonoide, ácido fenólico y los ésteres de los ácidos fenólicos (Hernández y Bernal, 1990; Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin, 2000). Sin embargo, se ha descrito que propóleos provenientes de zonas tropicales que no contienen compuestos de este tipo presentan una actividad antimicrobiana similar, lo que indica que la combinación de diferentes sustancias en el propóleo son esenciales para dicha actividad biológica (Chang-Li, 2005).

2.1.2.2 Actividad antiinflamatoria.

La actividad antiinflamatoria del propóleo se encuentra descrita principalmente para dolencias musculares y de las articulaciones, además de inflamaciones ocasionadas por infecciones, reumatismo y torceduras (Marcucci, 1996). Estudios previos realizados en ratones C57BL/6 a los cuales se les administraron diferentes extractos de propóleo durante un

periodo de 14 días mostraron una inhibición en la producción de las interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-10 y del interferón IFN- γ (Sforcin, 2011).

Por otra parte, estudios realizados utilizando como modelo ratones a los cuales se les indujeron edemas con carragenina demostraron el efecto antiinflamatorio de extractos acuosos y etanólicos de propóleo. Estos estudios demostraron que el mecanismo responsable del efecto antiinflamatorio se debe a una disminución en los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) y de óxido nítrico (NO). Otros estudios utilizando ratas a las cuales se les indujo artritis permitieron determinar que la administración de extractos de propóleo inhibían de forma significativa la producción de interleucina-6 (IIL-6) (Fuliang-Hu, 2005). Esta respuesta antiinflamatoria en parte se encuentra relacionada con los flavonoides presentes en los propóleos, puesto que algunos flavonoides poseen la capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides, lo cual está relacionado con dicho efecto (Florez, 2002).

2.1.2.3 Actividad inmunoestimulante.

Investigaciones previas realizadas utilizando extractos de propóleo describen que la capacidad de secreción de citocinas se incrementa significativamente tras la administración los mismos (Farré, 2004; Basim, 2006). Asimismo, existen estudios que han demostrado que extractos etanólicos de propóleo son capaces de activar las etapas iniciales de la respuesta inmune mediante la expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4, así como la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1 e IL-6 (Orsatti, 2010). Otras investigaciones en las cuales se administraron extractos derivados del propóleo al 10% en ratones de la cepa BALB/c a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg describen un incremento en la producción de anticuerpos por los ratones (Sforcin, 2007).

Recientemente, se demostró que la administración como coadyuvante de un extracto acuoso de propóleo al 13% a pacientes asmáticos por un período de dos meses redujo el grado de incidencia y la severidad de los ataques provocados por la misma (Sforcin, 2007).

2.1.2.4 Actividad citotóxica y antitumoral.

Estudios realizados *in vivo* con ratones a los cuales se les administraron extractos de propóleo, han demostrado un incremento en la actividad citotóxica de las células asesinas (NK), inhibiendo así el crecimiento celular y de la apoptosis en diferentes líneas tumorales (Marcucci, 1995), como es el caso del carcinoma cervical humano (Castaldo *et al.*, 2002; Marcucci, 1996) y del linfoma murino (Sforcin y Bankova, 2011).

2.1.2.5 Actividad anestésica, antiséptica y cicatrizante.

Las propiedades anestésicas del propóleo han sido aprovechadas por cirujanos plásticos brasileños para el tratamiento estético de pieles con acné y arrugas superficiales. En la medicina dental se le utiliza para el tratamiento de gingivitis y caries dental (Serra, 1995). Por otra parte, preparados o extractos de propóleo se utilizan ampliamente para el tratamiento de infecciones en la garganta (Burdok, 1998; Niraldo, 2005; Walgrave *et al.*, 2005). Por último, estudios recientes demuestran que el propóleo favorece la reepitelización de heridas en roedores diabetizados (McLennan, 2008).

2.1.2.6 Actividad antiulcerosa.

Estudios previos demuestran que algunos componentes del propóleo como el ácido cafeico, el ácido *p*-cumárico y el ácido cinámico, compuestos

de carácter fenólico poseen propiedades antiulcéricas. Asimismo, se ha reportado que extractos de propóleos presentan un efecto gastroprotector (Sforcin, 2011).

Por otra parte el grupo de trabajo de Primon (2007) ha demostrado que el extracto etanólico de propóleo verde brasileño reduce de forma significativa las lesiones gástricas inducidas por indometacina, etanol y estrés en una dosis de 500 mg/kg.

2.1.2.7 Actividad antidiabética.

Matsushige y colaboradores (1996) demostraron que el extracto acuoso de propóleo posee un efecto preventivo en la destrucción de las células β -pancreáticas al inhibir la generación del IL-1 β y la actividad de la óxido nítrico sintasa. Otras investigaciones describen que la administración del extracto acuoso o etanólico por un periodo de 7 días en ratas diabetizadas permitió controlar su glicemia y modular sus niveles de glucosa (Sforcin, 2011).

2.1.2.8 Capacidad antioxidante.

El propóleo es una fuente natural de antioxidantes que protegen a los ácidos grasos y lipoproteínas séricas de la oxidación, debido a su capacidad estabilizadora de radicales libres y a su efecto inhibitor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Farré *et al.*, 2004). En este sentido existen estudios que demuestran que el porcentaje de neutralización de radicales libres por esta resina es equiparable al descrito para la vitamina C (Velázquez *et al.*, 2007).

La excelente capacidad antioxidante descrita para el propóleo se atribuye básicamente a su elevado contenido de flavonoides. Estos

compuestos poseen en su estructura un número variable de hidroxilos fenólicos que poseen propiedades quelantes del hierro y otros metales de transición confiriéndoles una gran capacidad antioxidante (Havsteen, 1983). Por ello, los flavonoides desempeñan un papel esencial en la protección frente a daños provocados por el estrés oxidativo relacionado con un elevado número de patologías como cardiopatía isquémica, aterosclerosis, cáncer, entre otras más (Florez, 2002). Las propiedades antirradicales libres de los flavonoides se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Florez, 2002).

2.1.3 Otras actividades del propóleo.

Además de las actividades biológicas descritas previamente, en la literatura se ha reportado el efecto potenciador de extractos de propóleo sobre la actividad de antibióticos como la biomicina, la tetraciclina, la neomicina, la polimixina, la penicilina y la estreptomina (Marcucci, 1996; Sforzin, 2000). Existen estudios que han demostrado la actividad sinérgica entre el ciprofloxacino y el propóleo en el tratamiento de la queratitis experimental inducida por *Staphylococcus aureus* (Sforzin, 2011).

Además de las aplicaciones del propóleo en la medicina tradicional, esta resina se ha incorporado en productos domésticos, cosméticos y alimentarios, debido a sus propiedades biológicas (Chan-Li, 2005). Por su actividad cicatrizante ha sido aprovechado en la industria de cosméticos para la elaboración de cremas, faciales, pomadas, lociones (Nirardo, 2005), shampoos, ungüentos, acondicionadores, brillos labiales y barnices (Walgrave *et al.*, 2005). Por otro lado, debido a sus propiedades antimicrobianas ha sido incorporado en hilos y cremas dentales, así como en enjuagues bucales (Burdok, 1998) para tratar diversas afecciones de la

cavidad oral como la gingivitis y la caries dental, principalmente (Walgrave *et al.*, 2005).

En la industria alimentaria el propóleo se ha incorporado en suplementos alimenticios y como aditivo en algunos alimentos y bebidas (Valencia, 2012). En algunos países, se adicionan unas gotas de una solución de propóleos en productos envasados o en alimentos frescos (como pescados congelados, grasas y aceites), con la finalidad de prolongar su vida útil entre dos y tres veces más. Además, la adición de propóleo en bebidas como el ron ayuda a mejorar la calidad del mismo. Por otro lado, en algunos países, se han efectuado estudios con resultados positivos para la conservación del mango con propóleos (Allende, 2012).

Cabe mencionar que antiguamente esta resina era utilizada por famosos fabricantes de violines como un ingrediente de la composición de los barnices y pulidores de los mismos, de tal forma que la coloración que se observa en algunos violines hechos por antiguos maestros de Cremona es debida en parte al propóleo (Marcucci, 1996).

2.1.4 Clasificación del propóleo de acuerdo a su origen.

Estudios farmacológicos previos han permitido demostrar que tanto la actividad biológica como la potencia de cada propóleo dependen básicamente de su composición química, misma que es altamente variable y se encuentra íntimamente ligada con la zona geográfica, la época de recolección, además de la raza de abeja (Soleo de Funari, 2007; Bankova 2005; Chaillou, 2009; Ataç-Uzel *et al.*, 2005). Por otra parte, es necesario considerar los disolventes y el método de extracción ya que los extractos etanólicos al 60-80% inhiben el crecimiento microbiano, mientras que al 70-80% tienen una mayor actividad antioxidante (Farré *et al.*, 2004).

La zona geográfica es uno de los factores determinantes en la composición y por ende en la actividad biológica de los propóleos y aunque las abejas de la misma colonia pueden visitar plantas de diferentes especies, a menudo pareciera que hay una preferencia marcada con ciertas resinas, observándose así cinco patrones quimiogeográficos de los tipos de propóleos a nivel mundial (**Figura 2**), los cuales se clasifican en propóleos poplares o de climas templados, propóleos verdes o de climas tropicales, propóleos derivados de *Clusia*, propóleos derivados de *Macaranga* o de la región del pacifico y propóleos de las regiones orientales del Mediterráneo. Cada uno de ellos posee una composición característica (Salatino, 2011).



Figura 2. Patrones quimiogeográficos de los tipos de propóleos. **I.** Propóleos poplares o de climas templados. **II.** Propóleos verdes o de climas tropicales. **III.** Propóleos derivados de *Clusia*. **IV.** Propóleos derivados de *Macaranga* o de la región del pacifico. **V.** Propóleos de las regiones orientales del Mediterráneo.

Los componentes característicos de propóleos de climas templados o poplares (**I**), tanto de los hemisferios norte y sur, son flavonoides sin sustituyentes en el anillo B, ácidos fenilpropanoides y sus ésteres. Las fuentes de estos componentes son los exudados de las yemas apicales de las especies de *Populus* principalmente *P. nigra* (Salatino, 2011).

Propóleos de clima tropical o de tipo verde (**II**) como lo es el propóleo más importante de Brasil, tienen una composición bastante distinta, principalmente contienen fenilpropanoides prenilados, ácidos caféico y quínico, sustancias que derivan a partir de yemas vegetativas de *Baccharis dracunculifolia* (Salatino, 2011).

Propóleos cuya fuente son los exudados de las flores de *Clusia* (**III**) poseen en su composición benzofenonas preniladas, como lo es el caso de los propóleos de Venezuela, Cuba y de algunos propóleos de Brasil (Salatino, 2011).

Flavanonas de geranilo han sido reportadas para muestras de propóleos de la región del Pacífico (**III**), como es el caso de Taiwán y Okinawa. Recientemente, compuestos similares se han reportado para el propóleo de las regiones de África, como Egipto y Kenia. Los componentes del propóleo de Okinawa derivan de los exudados de la fruta de *Macaranga tanarius*, de la cual existen aproximadamente 280 variedades que producen diversos compuestos derivados de geranilo. Por lo tanto, no es de extrañar que el propóleo producido en África, Japón y Taiwán tenga composiciones similares (Salatino, 2011).

Los propóleos de las regiones orientales del Mediterráneo (**IV**), como Grecia, Creta y Turquía, pueden contener predominantemente diterpenos o antraquinonas. La fuente de los diterpenos parece ser la especie *Cupressaceae*, sin embargo, nada se ha sugerido con respecto a los orígenes de las antraquinonas (Salatino, 2011).

Con base a lo anterior, los propóleos mexicanos se ubican dentro de los propóleos de clima templados o poplares, sin embargo es importante destacar que el territorio mexicano comprende climas y regiones muy diferentes, con lo cual es necesaria la clasificación de los propóleos

mexicanos. Sin embargo, en México sólo existe una clasificación de las zonas apícolas: la región del Altiplano, la Costa del Pacífico, la Región del Golfo, la región Norte y la región de la Península de Yucatán (**Figura 3**). Dentro de las cuales se ubica al Distrito Federal dentro de la zona correspondiente al altiplano. Esta región se distingue por tener mieles ámbar y ámbar claro de gran auge en el mercado europeo. Su origen floral es el acahual, la acacetillam la jarilla, el toronjil morado y la espinocilla, entre otros (Claridades, 2010).



Figura 3. Mapa de la República Mexicana en donde se muestran las 5 regiones apícolas en que se divide el territorio nacional.

2.1.5 Composición química.

Desde el punto de vista químico el propóleo se compone de 50% de resinas y bálsamos vegetales; 30% de ceras; 10% de aceites esenciales y aromáticos; 5% de polen y 5% de otras sustancias (Burdok, 1998). La literatura química disponible a la fecha describe el aislamiento de más de 300 compuestos entre los que destacan compuestos de carácter fenólico, terpenoides, esteroides, flavonoides, azúcares y aminoácidos (Kalogeropoulos *et al.*, 2009). En la **Tabla 1** ilustran algunos de los compuestos más representativos aislados del propóleo.

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir del propóleo.

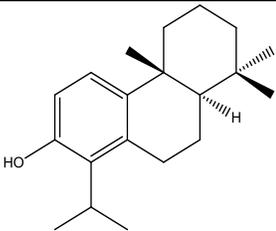
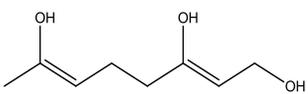
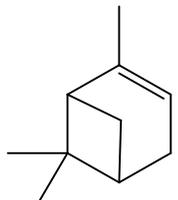
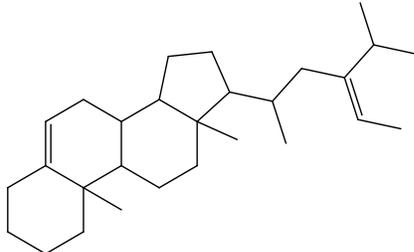
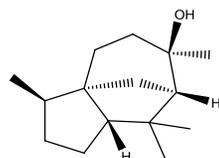
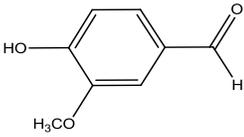
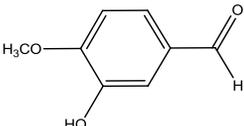
	<i>Compuesto químico</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Referencia</i>
Terpenoides	Totarol		Popova, 2009
	Geraniol		Marcucci, 1996; Bankova, 2000
	Pineno		Bankova, 2000
	Fucosterol		Popova, 2009
	Cedrol		Silici, 2005
Aldehídos	Vainillina		Marcucci, 1996; Mohammadzadeh, 2007
	Isovainillina		Marcucci, 1996

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir del propóleo (continuación).

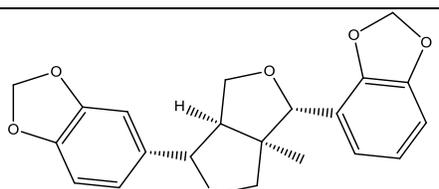
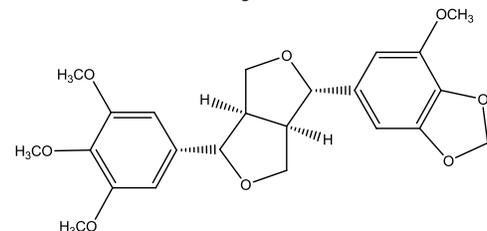
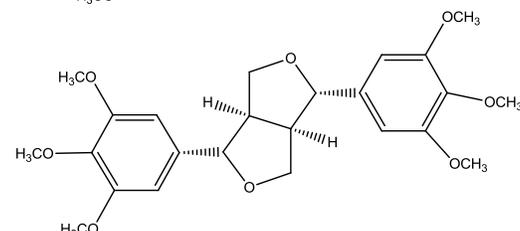
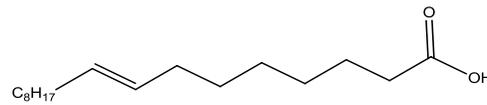
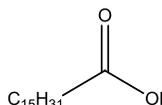
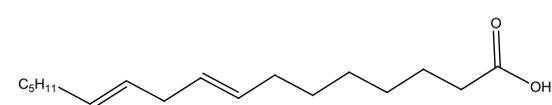
<i>Compuesto químico</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Referencia</i>
Lignanos	<p>Sesamina</p> 	Bankova, 2000; Silici, 2005
	<p>Sesartenina</p> 	Bankova, 2000
	<p>Yangambina</p> 	Bankova, 2000
Ácidos grasos	<p>Ácido oleico</p> 	Marcucci, 1996; Ataç-Uzel, 2005
	<p>Ácido palmítico</p> 	Ataç-Uzel, 2005; Marcucci, 1996
	<p>Ácido linoleico</p> 	Marcucci, 1996; Ataç-Uzel, 2005

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir del propóleo (continuación).

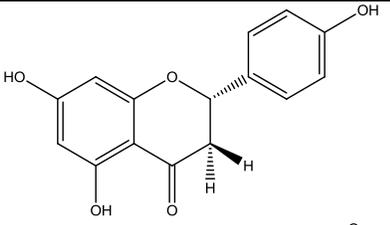
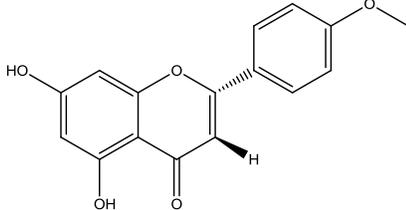
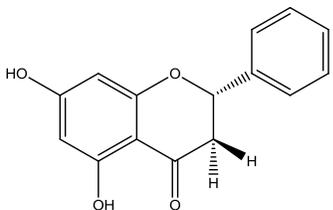
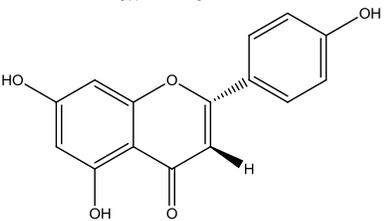
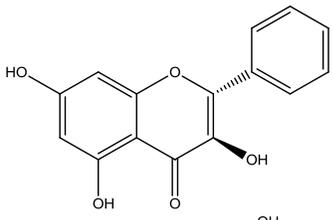
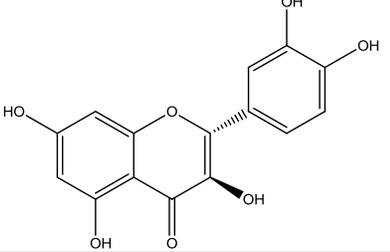
<i>Compuesto químico</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Referencia</i>
Flavonoides		Ataç-Uzel, 2005; Silici, 2005
		Marcucci, 1996; Silici, 2005
		Marcucci, 1996; Ataç-Uzel, 2005; Gardana, 2007; Silici, 2005
		Marcucci, 1996; Gardana, 2007
		Marcucci, 1996; Ataç-Uzel, 2005 Gardana, 2007; Silici, 2005
		Ataç-Uzel, 2005. Silici, 2005.

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir del propóleo (continuación).

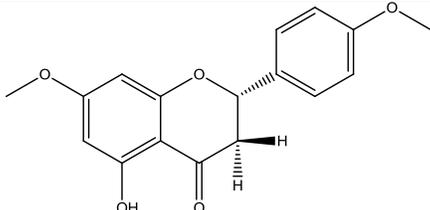
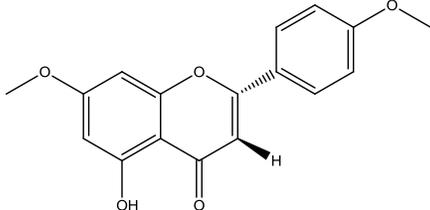
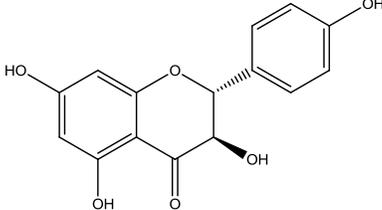
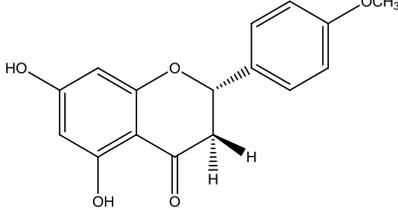
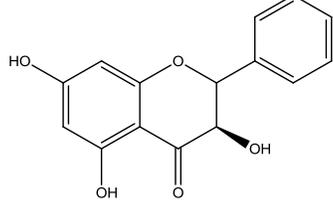
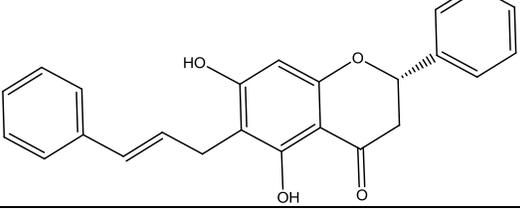
<i>Compuesto químico</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Referencia</i>
4',7-Dimetilnaringenin a		Medina 2011
4',7-Dimetilapigenina		Medina 2011
Canferol		Bankova <i>et al.</i> , 1983
Isokurametina		Téllez y Murillo 2011
Pinobanksina		Usia <i>et al.</i> , 2002
6-Cinamilcrisina		Usia <i>et al.</i> , 2002

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir del propóleo (continuación).

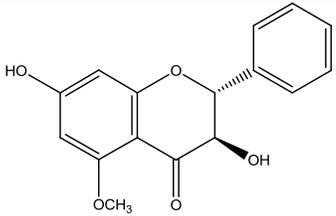
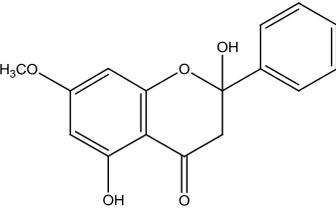
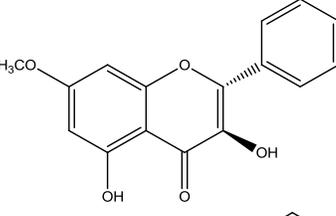
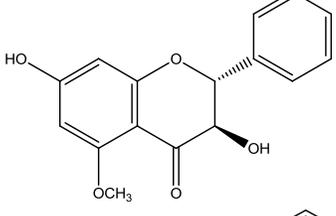
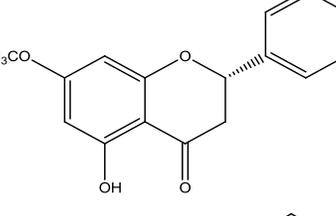
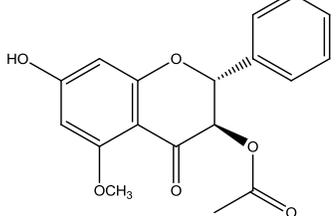
<i>Compuesto químico</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Referencia</i>
3,7-Dihidroxi-5-metoxiflavanona		Bankova, 1983
2,5-Dihidroxi-7-metoxiflavanona		Bankova <i>et al.</i> , 1983
7-Metilgalangina		Banskota, 2002
5-Metiléter pinobanksina		Banskota, 2002
Pinostrobin		Ataç-Uzel, 2005
3-Acetato de pinobanksina		Ataç-Uzel, 2005

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir del propóleo (continuación).

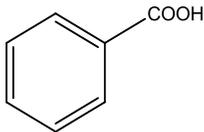
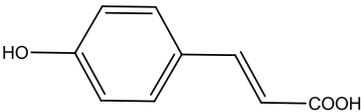
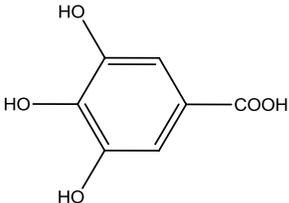
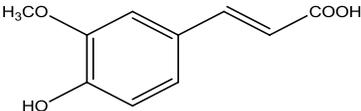
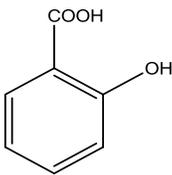
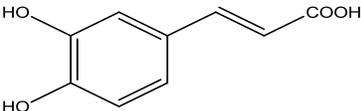
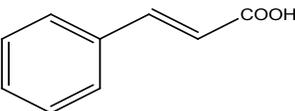
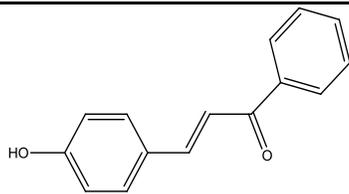
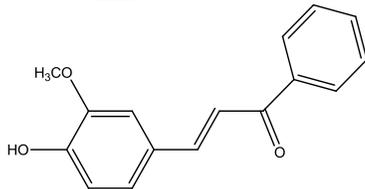
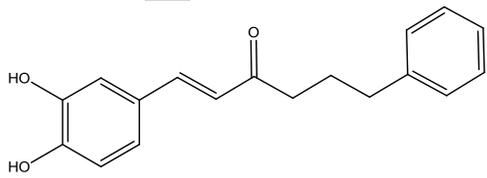
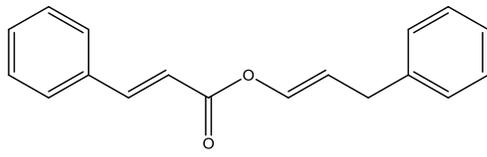
<i>Compuesto químico</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Referencia</i>
Ácido benzoico		Marcucci, 1996 Ataç-Uzel, 2005 Silici, 2005 Mohammadzadeh, 2007
Ácido <i>p</i> -cumárico		Marcucci, 1996
Ácido gálico		Marcucci, 1996
Ácido ferúlico		Ataç-Uzel, 2005 Silici, 2005
Ácido salicílico		Marcucci, 1996
Ácido cafeíco		Ataç-Uzel, 2005 Gardana, 2007
Hidroquinona		Popova, 2009
Ácido cinámico		Gardana, 2007

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir del propóleo (continuación).

<i>Compuesto químico</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Referencia</i>	
Compuestos fenólicos (continuación)	<i>p</i> -coumarato de bencilo		Popova, 2005
	Ferulato de bencilo		Popova, 2005
	Cafeato de feniletilo		Popova, 2005
	Cinamato de cinamilo		Popova, 2005

Como se ilustró en la **Tabla 1**, el grupo de los flavonoides (flavanoles, chalconas, flavonas y dihidroflavonas) son el tipo de compuestos aislados con mayor frecuencia a partir de muestras de propóleo, seguidos de compuestos fenólicos y todos ellos representan el grupo de productos activos más importantes presentes en el propóleo. Otros compuestos aislados son azúcares como la galactosa y la xilosa (Marcucci, 1996); vitaminas como la B₁, B₂, B₆, C y E, minerales como la plata, el cesio, el mercurio, el lantano, el antimonio, el cobre, el manganeso, el hierro, el calcio, el aluminio, el vanadio y el silicio (Marcucci, 1995); y algunos aminoácidos como la lisina, la fenilalanina, la cisteína, la glicina, la leucina y la serina (Marcucci, 1996).

2.1.6 Preparados que contienen propóleo en su composición.

En México y el mundo, existen agroindustrias que manufacturan preparados a base de propóleo, un ejemplo es la agroindustria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de la Estación Experimental Agropecuaria Famaillá (INTA EEA Famaillá), que ha montado una planta piloto de procesamiento de propóleos desarrollando múltiples productos. Para ello, en primer término se prepara el extracto etanólico de los propóleos y posteriormente se evapora el etanol con la finalidad de obtener los componentes biológicamente activos. Posteriormente, a partir del extracto obtenido se preparan tinturas, cremas, jabones, ungüentos, tabletas, etc. (Bedascarrasbure, 2001). En la **Figura 4** se ilustran algunos de los preparados desarrollados que contienen propóleo en su composición.



Figura 4. Muestra de productos disponibles en el mercado con propóleo en su composición.

Es importante mencionar que los productos desarrollados a base de propóleo se combinan con otros derivados de la colmena como la miel y el polen, así como diversas plantas medicinales (ej. sauco, gordolobo, bugambilia, equinacea, ajo, canela, etc.). Estos productos se utilizan con frecuencia para tratar enfermedades respiratorias, bucales, gastrointestinales, inflamatorias, además de fortalecer el sistema inmune. La administración de estas asociaciones se realiza utilizando diferentes

presentaciones, entre las cuales se puede mencionar a los jarabes, gotas, infusiones, extractos, tizanas, pastillas (caramelos), cápsulas, jabones, ampollitas, entre otras (**Figura 5**). En la **Tabla 2** se describen algunos de los preparados disponibles en el mercado en los cuales se incorporan extractos de propóleo en combinación con los de diversas especies vegetales, además de su posología y su uso recomendado.



Figura 5. Productos encontrados en el mercado a base de propóleo y de otras especies vegetales. **A.** Gotas de ajo con propóleo, **B.** Tizana de abango con propóleo; **C.** Jabón de propóleo con manzanilla; **D.** Capsulas de propóleo con *Echinacea* y germen de trigo; **E.** Jarabe de propóleo con eucalipto, gordolobo y miel de abeja; **F.** Jarabe de miel con propóleo, eucalipto, gordolobo, sauco, polen y mentol; **G.** Propóleo en spray con esencia de eucalipto, mentol y miel; **H.** Ampolletas de equinacea con propóleo; **I.** Ampolletas a base de extractos de propóleo, Sauco, Llantén, semilla de pomelo, Regaliz, Equinacea y Astrágalus; **J.** Jarabe de miel con aloe vera y propóleo; **K.** Spray de propóleo con jengibre, miel de abeja y menta; **L.** Jarabe de miel con propóleo y melisa; **M.** Jarabe de miel con propóleo y extracto de palto; **N.** Spray de propóleo con canela y miel de abeja.

Tabla 2. Preparados comerciales a base de propóleo asociados con diversas plantas medicinales.

Preparado	Asociación (extracto)	Usos recomendados	Posología	Nombre comercial
Jarabe	eucalipto, gordolobo y miel de abeja	afecciones del sistema respiratorio (tos)	adultos: 2 cucharadas/4 h Niños: 1 cucharada /4 h	Sin tos
Jarabe	melisa y miel	tratamiento de problemas gastrointestinales, colon irritable de origen nervioso.	1 a 2 cucharaditas dos a tres veces al día	Miel propóleo-Melisa
Gotas	ajo	fortalecimiento del sistema inmune. Tratamiento de bronquitis y afecciones respiratorias, dolor de oído, presión alta, problemas gástricos y dérmicos.	agregar 10 a 15 gotas a media taza de agua tibia o leche. administrar 3 veces al día.	Ajo propóleo gotas
Nebulizador	jengibre, miel de abeja y menta.	tratamiento de tos y resfriados	aplicar varias veces al día	Nebulizador propóleo-jengibre
Ampolletas	equinácea	fortalecer el sistema inmune	ingerir una ampolleta al día preferiblemente a la hora del desayuno, sola o disuelta en agua o zumo	Master plant
Ampolletas	sauco, llantén, semilla de pomelo, regalíz,	fortalecer el sistema inmune	Tomar una ampolleta diaria por la mañana	Inmunoguard

	equinácea y Astrágalus			
Tizana	abango	tratamiento de los síntomas del resfriado común,	no especificada	Abango con propóleo (Therbal®)

Tabla 2. Preparados comerciales de propóleo asociados con diversas plantas medicinales (continuación).

Preparado	Asociación (extracto)	Uso recomendado	Posología	Nombre comercial
Tabletas	equinacea	fortalecer el sistema inmune. tratamiento de problemas del tipo alérgico, fiebre, tos, anginas y dolor de garganta. Antibiótico.	adultos: 2 tabletas antes de cada comida. Niños 2 tabletas al día.	Antibiotil propóleo
Cápsulas	equinacea y germen de trigo	fortalecer el sistema inmune	tomar una cápsula al día antes del desayuno.	Propóleo con equinácea 1.000mg
Pastillas	fresa y acerola	tratamiento de afecciones de la garganta, boca y afecciones respiratorias	tomar de 4 a 6 pastillas al día	Propóleo BIO
Jabón	manzanilla	Antibacteriano	-----	Protex propolis
Pasta dental	mirra	Prevención de placa dentobacterina.	-----	Tom's of Maine Toothpaste Propolis & Myrrh
Crema	aloe manzanilla consuelda	Para problemas de la piel	-----	Aloe propolis crem

2.2 Estrés oxidante: definición y generalidades.

En la mayor parte de las células, al menos un 90% del oxígeno molecular consumido es utilizado para la fosforilación oxidativa en la producción de ATP. El resto del O_2 se emplea en una amplia gama de reacciones metabólicas especializadas. Existen al menos 200 enzimas conocidas que utilizan O_2 como sustrato y prácticamente la totalidad de estas utiliza un ión metálico para potenciar la reactividad del oxígeno como es el caso de la citocromo oxidasa (Mathews, 2002).

Sin embargo, la eficacia de estas enzimas oxidasas no suele ser del 100%, de tal forma que a menudo se generan especies de oxígeno reducidas de forma incompleta: superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que se forma a partir de una reducción del O_2 ; peróxido de hidrógeno (HOOH) que se forma a partir de una reducción de dos electrones; y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que se forma por una reducción de tres electrones). Estas especies radicales producidas son más reactivas que el O_2 y son denominadas de forma colectiva especies reactivas de oxígeno (ERO) (Finley, 2011). En la **Figura 6** se muestran las reacciones de formación y eliminación de estas especies radicales.

Específicamente, el radical hidroxilo es el más reactivo y es el responsable del daño de otras moléculas biológicas; daña a las proteínas de varias formas, así como a las membranas en un proceso denominado peroxidación lipídica, que es una reacción en cadena, en la cual se pueden generar radicales que inicien otra reacción de peroxidación. Asimismo, el radical hidroxilo también daña a los ácidos nucleicos, produciendo la ruptura de la cadena de polinucleótidos y cambiando la estructura de las bases del ADN (Saikat, 2011).

Por otra parte, el radical superóxido que es relativamente atóxico puede combinarse fácilmente con otro radical libre, el óxido nítrico (NO \cdot), produciendo peroxinitrito (OONO \cdot), que es considerada una especie reactiva de oxígeno que también produce peroxidación lipídica (Mathews, 2002).

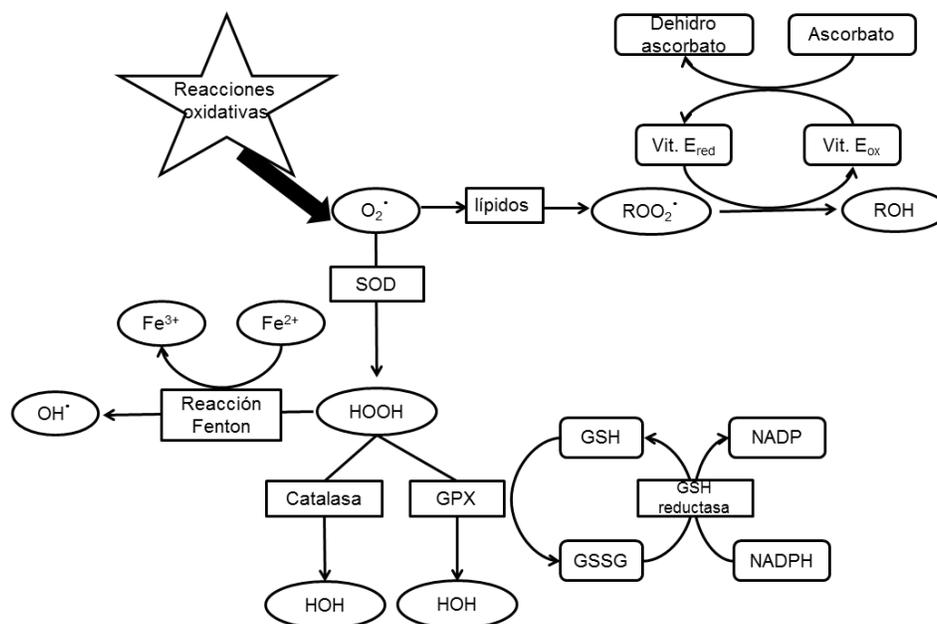


Figura 6. Reacciones de formación y de eliminación de las especies reactivas de oxígeno. Antioxidantes como la vitamina E y algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa o glutatión peroxidasa (GXP) pueden reducir a dichas especies; otros cofactores como el glutatión (GSH), el ascorbato y el NADPH y enzimas como la glutatión reductasa son importantes para la regeneración de la reducción de estas moléculas y/o enzimas.

Cualquiera que sea su origen, la producción a gran escala de especies reactivas de oxígeno producen un daño considerable en los tejidos en los que se producen, generando así estrés oxidativo y para contrarrestarlo el organismo emplea defensas enzimáticas y no enzimáticas.

El estrés oxidativo puede generarse mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones

ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, etc. (Veiga, 1997).

2.2.1 Antioxidantes: definición y clasificación.

Para contrarrestar el daño provocado por el estrés oxidativo existen sistemas enzimáticos antioxidantes y sistemas antioxidantes no enzimáticos que son capaces de metabolizar a los radicales libres generados en los procesos redox en las células (Guerra, 2002).

El término antioxidante tiene diferentes connotaciones según el área de especialidad, ya que por ejemplo en biología un antioxidante es un compuesto capaz de neutralizar especies reactivas generadas metabólicamente; mientras que en el área de alimentos, el término implica una sustancia utilizada por sus características funcionales como lo es el de retardar la oxidación (Finley, 2011). De esta forma los antioxidantes juegan un papel crucial en el mantenimiento de una salud óptima y en la defensa del daño provocado por los radicales libres formados durante el metabolismo. En la **Tabla 3** se resume la clasificación de los antioxidantes.

Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes (Saikat, 2011).

<i>Tipo de antioxidante</i>		<i>Ejemplos</i>
De acuerdo a su Naturaleza	Antioxidantes enzimáticos	Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutación peroxidasa (GPx), Glutación reductasa (GR).
	Antioxidantes no enzimáticos	Glutación reducido (GSH), L-arginina, coenzima Q ₁₀ , bilirrubina, transferina, ácido úrico.
	Metabólicos Nutrimentales	Vitamina E, vitamina C, carotonoides, flavonoides, omega-3, ácidos grasos, compuestos fenólicos.
De acuerdo a su fuente	Antioxidantes endógenos	Bilirrubina, glutación, ácido lipoico, N-acetilcisteína, NADPH y NADH, ubiquinona, ácido úrico, enzimas (SOD, CAT, GPx, GR)
	Antioxidantes de la dieta	Vitaminas E y C, β-caroteno y otros carotenoides y oxicarotenoides, polifenoles (flavonoides, flavonas, proantocianidinas, flavanoles)
	Metales unidos a proteínas	Albumina (cobre), ceruloplasmina (cobre), metalotioneina (cobre), ferritina (hierro), mioglobina (hierro), transferina (ferretina).
De acuerdo a su mecanismo de acción	Sistemas catalíticos de neutralización de diversas ERO	Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutación peroxidasa (GPx).
	Unión o inactivación de los iones metálicos que evitan la producción de ROS por medio de la reacción de Haber-Weiss	Ferritina y catequinas
	Autodestrucción y ruptura de la cadena de los antioxidantes de barrido, destrucción de ERO.	Vitamina C, Vitamina E, ácido úrico, flavonoides, glutación.
	Neutralización de ERO	Carotenoides, antocianidinas.

2.2.2 Patologías asociadas al estrés oxidante.

Existen una serie de patologías atribuibles al ataque de radicales libres que están implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas (Guerra, 2001). A continuación se describen algunas de estas patologías:

- Envejecimiento prematuro: resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a las ERO. Además, se ha detectado una menor actividad proteolítica que en las células jóvenes, una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de ERO y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas (Rivet, 2000).
- Ateroesclerosis: la formación de una placa de grasa y de otras sustancias que cubren parcial o totalmente los vasos sanguíneos. Esta placa, se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL son alterados. Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de diversos factores que inician o extienden la lesión aterosclerótica. Se ha demostrado una estrecha relación entre ERO y LDL, se sabe que su aumento tiene una influencia directa en la aparición de aterosclerosis (Guerra, 2001).
- Cáncer: el desarrollo tumoral es un proceso altamente complejo caracterizado por la presencia de necrosis celular del tejido sano, crecimiento incontrolado de las células cancerosas, neovascularización del área afectada para asegurar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, entre otros muchos fenómenos. Se ha sugerido la implicación de los

radicales libres en el desarrollo tumoral. Los radicales libres estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la neovascularización tumoral o angiogénesis. Por otra parte, debe considerarse que la transformación oncogénica está condicionada por la presencia de genes mutados u oncogenes que controlan funciones celulares clave, y esto puede influenciarse por el estado redox celular (Borek, 2004).

- La catarata senil: los radicales generados en el cristalino producen entrecruzamiento, desnaturalización, degradación de sus proteínas y otros efectos, formándose gránulos microscópicos de composición compleja por la aglomeración desordenada de moléculas que crecen en tamaño y cantidad, produciendo inicialmente el efecto Tindall y finalmente, la total opacificación del cristalino (Fletcher, 2010).

- Diabetes mellitus: a concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de ERO se incrementan. Sin embargo, el incremento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos, no sólo está relacionado con la aceleración en la producción de ERO, sino también con la disminución de antioxidantes. (Oberley, 1997; Roja, 2005).

- Hipertensión arterial (HTA): la HTA puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones producidas por las ERO. En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante. La HTA predispone a acelerar la aterosclerosis, al menos en parte a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidante en los vasos arteriales (Guerra, 2001).

3 Justificación y objetivos.

Desde tiempos inmemoriales, el propóleo ha jugado un rol importante en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos debido a sus múltiples propiedades biológicas. Es por ello que países como Argentina y Brasil han emitido directivas que establecen los contenidos mínimos de resinas, fenoles y flavonoides totales (compuestos responsables de la actividad biológica), así como los máximos admisibles de diversas impurezas físicas y químicas que los propóleos y sus extractos deben poseer para que puedan ser utilizados como materia prima en la elaboración de diversos productos farmacéuticos y cosméticos. Sin embargo, en México no existe una norma que establezca los criterios de calidad que deban poseer los propóleos mexicanos para dichos fines, a pesar de ser un producto ampliamente utilizado en nuestro país. Lo cual se debe básicamente a que la información acerca de los propóleos mexicanos es escasa.

Considerando el potencial productivo y el incremento en el consumo de este producto a nivel mundial, surge la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la composición química, las propiedades biológicas y los límites de seguridad de los propóleos mexicanos que permitan a los productores nacionales comercializar productos de calidad a base de ellos.

Con base en estas consideraciones, el objetivo general del presente proyecto de investigación es determinar la composición química, la capacidad antioxidante *in vitro* y el efecto sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* de propóleos recolectados en la zona melífera del altiplano mexicano. Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- ✓ Colectar diversas muestras de propóleos de la zona melífera del altiplano mexicano (zona rural del Distrito Federal).
- ✓ Realizar el estudio químico del extracto etanólico de uno de los propóleos recolectados.
- ✓ Aislar mediante técnicas cromatográficas los compuestos mayoritarios presentes en el extracto del propóleo seleccionado.
- ✓ Caracterizar los compuestos aislados empleando métodos espectroscópicos y espectrométricos, tales como espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C mono y bidimensional.
- ✓ Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides totales en el extracto, y las fracciones derivadas mediante el método desarrollado por Folin y Kumasawa, respectivamente.
- ✓ Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto, de las fracciones derivadas y de los compuestos aislados, mediante la actividad inhibitoria de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH $^{\bullet}$), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzoatiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS $^{\bullet+}$), así como de su capacidad para reducir a hierro (FRAP, por sus siglas en inglés).
- ✓ Determinar la actividad biológica, el contenido de fenoles y de flavonoides totales de al menos otras cuatro muestras más y comparar los resultados obtenidos con el propóleo seleccionado.
- ✓ Cuantificar mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) el compuesto mayoritario presente en el extracto del propóleo seleccionado y de al menos otras cuatro muestras más.
- ✓ Establecer la composición de volátiles presentes en las diferentes muestras de propóleos utilizando la técnica de microextracción en fase sólida de la fase gaseosa acoplada a cromatografía de gases con espectrometría de masas en tiempo de vuelo (HS-SPME-CG-EM-TOF).

4 Desarrollo experimental.

4.1 Material vegetal.

Las muestras de los propóleos estudiados fueron obtenidas en los apiarios Acuexcomatl, Trojes, Don Nico, Búho y Valentín ubicados en la zona rural del Distrito Federal. La recolección de los mismos se realizó 2010 por investigadores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. En la **Figura 7** y en la **Tabla 4** se describe la ubicación donde se recolectaron los propóleos analizados.



Figura 7. Ubicación gráfica de los apiarios donde se colectaron los diversos propóleos analizados.

Tabla 4. Ubicación geográfica de los apiarios.

<i>Apiario</i>	<i>Ubicación</i>	<i>m.s.n.m.*</i>
Acuexcomatl	Poblado de San Luis Tlaxialtemalco Xochimilco, D.F.	2240
Don Nico	Topilejo, Tlalpan, D.F	2410
Búho	Poblado de San Pablo Ozotepec, Milpa Alta, D.F.	2420
Trojes	Poblado de san Antonio Tecomitl, Delegación Milpa Alta, D.F	2420
Valentín	Poblado de San Pedro Atocpan, Milpa Alta, D.F.	2420

*m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

4.2 Procedimientos generales de análisis.

4.2.1 Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM y Sephadex LH-20 (Fluka). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica o preparativa se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio y/o de vidrio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60F₂₅₄ Merck ®, tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas fueron reveladas con vainillina sulfúrica, seguido de calentamiento (aproximadamente 110 ° C) hasta la visualización completa. Cabe destacar que antes de ser reveladas, dichas placas fueron visualizadas a dos longitudes de onda (254 y 365 nm).

4.2.2 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas se realizó en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) se determinaron en un espectrómetro Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de Carbono 13 (RMN-¹³C) se generaron en un equipo marca Varian, modelo VNMRS el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz, respectivamente. Los espectros se registraron utilizando CDCl₃, MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆ y acetona-*d*₆ y los

desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

4.3 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se realizó en un cromatógrafo Shimadzu modelo 10 AVP equipado con un detector UV dual. El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software LC-solution versión 1.22 SP1. Los perfiles cromatográficos se registraron empleando una columna Purospher® STAR RP-18, con un tamaño de partícula de 5 μm , 4.6 mm de diámetro interno y 15 cm de longitud para los propóleos de los apiarios de Valentín y Don Nico, mientras que para los propóleos de Acuexcomatl, Búho y Trojes se utilizó una columna Waters, X-bridge C₁₈, con un tamaño de partícula de 5 μm , 4.6 mm de diámetro interno y 5 cm de longitud. La detección se ajustó a 290 y 254 nm.

4.3.1 Identificación de la presencia de pinocembrina.

La identificación de pinocembrina en los extractos de los propóleos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y la absorbancia del estándar con las señales presentes en el cromatograma obtenido con el extracto. Para ello, se prepararon las disoluciones de los extractos y del estándar a una concentración de 1 mg/mL en etanol. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla binaria de MeOH/(H₂O:TFA 0.1%) en proporción 55:45. El flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL/min, el volumen de inyección de 10 μL y una temperatura de 25 °C.

4.3.2 Cuantificación de la pinocembrina.

Para la cuantificación de pinocembrina presente en los extractos etanólicos de los propóleos se prepararon las disoluciones de cada extracto a una concentración de 2 mg/mL para los propóleos “Acuexcomatl”, “Don Nico”, “Trojes” y “Valentín”, mientras que para el propóleo “Búho” la concentración del extracto fue de 1 mg/mL. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se describen en el punto 4.3.1 excepto para los propóleos de Valentín y Don Nico. En este caso, la fase móvil consistió en una mezcla ternaria compuesta por MeOH/ACN/(H₂O/TFA 0.1%) en proporción 30:20:50. Para cada sistema se realizó una curva de calibración de pinocembrina con seis niveles de concentración (5, 10, 25, 50, 100 y 150 µg/mL).

4.4 Cuantificación del contenido de fenoles totales.

La cuantificación del contenido de fenoles totales se realizó utilizando el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con ligeras modificaciones. En el tubo de reacción se adicionaron 100 µL de solución metanólica de las muestras a analizar (1 mg/mL), 800 µL de agua y 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (1:1). Se agitó y se dejó en reposo por 8 minutos. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de Na₂CO₃ al 20%. Por último, se incubó por una hora en ausencia de luz y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter D4® 530 Life science UV/VIS.

Con la finalidad de expresar los resultados como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de muestra), se construyó una curva de calibración en un intervalo de concentración entre 10-200 µg/mL. En todos los casos, se realizaron tres réplicas independientes y los resultados se muestran como el promedio de las determinaciones ± desviación estándar.

4.5 Cuantificación del contenido de flavonoides totales.

El contenido de flavonoides totales se calculó utilizando la metodología descrita por Kumazawa y colaboradores (2004). El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos. Para ello, se colocaron 100 μL de la solución muestra (1 mg/mL) y se adicionaron 100 μL de la solución etanólica de AlCl_3 al 2%. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente se midió, la absorbencia a 420 nm en un lector de Elisa Labssystem Multiskan® MCC/340.

El contenido de flavonoides totales fue calculado como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/g de muestra) a partir de una curva de calibración realizada con este compuesto, en un intervalo de concentración de 10-60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las evaluaciones de cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio de las determinaciones \pm desviación estándar.

4.6 Evaluación de la actividad antioxidante.

4.6.1 Actividad inhibidora del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH $^{\bullet}$).

La actividad antioxidante de las muestras se evaluaron mediante la capacidad atrapadora del radical DPPH $^{\bullet}$ utilizando la metodología descrita por Rojano y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos. Se colocaron 100 μL de solución de cada muestra (1 mg/mL) y, posteriormente, se adicionaron 100 μL de solución etanólica de DPPH \cdot 0.208 mM. La absorbancia fue medida después de incubar a temperatura ambiente por un periodo de 20 min a 515 nm en un lector de Elisa Labssystem Multiskan® MCC/340. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición y expresados

como equivalentes de Trolox por miligramo de muestra ($\text{mM}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{muestra}}$), de acuerdo con una curva de calibración realizada con el antioxidante comercial Trolox en un intervalo de 3.2 a 200 $\text{mM}_{\text{Trolox}}$.

4.6.2 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS^{•+}).

La capacidad atrapadora del radical ABTS^{•+} de las muestras se midió empleando el método de Kriengsak y colaboradores (2006) con ligeras modificaciones. El radical ABTS^{•+} se generó por reacción de oxidación de una solución 7mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio. La solución resultante se conservó en ausencia de luz por 12 horas antes de su uso. Posteriormente, esta solución se diluyó con MeOH hasta obtener una absorbancia inicial de al menos 0.70 a 734 nm. Para realizar el bioensayo se colocaron 20 μL de solución de cada muestra (1 mg/mL) en cada pozo. Posteriormente, se adicionaron 180 μL de la solución con el radical ABTS^{•+} ajustada a una absorbancia de 0.70. La absorbancia final se midió a 700 nm después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente. Se construyó una curva de calibración de Trolox como estándar en un intervalo de 12.8 a 500 $\text{mM}_{\text{Trolox}}$ y los resultados se expresaron en equivalentes de Trolox por miligramo de muestra ($\text{mM}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{muestra}}$).

4.6.3 Medida de la capacidad reductora: Ensayo FRAP.

La evaluación de la actividad reductora se realizó siguiendo el método de Strain (1996) con modificaciones. Para realizar la determinación se adicionaron a cada pozo 20 μL de la solución de propóleo (1 mg/mL), 180 μL del reactivo FRAP (2.5 mL de solución 2,4,6-tripiridil-S-triazina 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 mL de FeCl₃ 20 mM y 25 mL de buffer acetato 300 mM a un pH de 3.6). La mezcla resultante se incubó durante 30 minutos a

temperatura ambiente; al término de este proceso se registró la absorbancia a 593 nm. La capacidad reductora se expresó como capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico ($\text{mM}_{\text{ácido ascórbico}}/\text{g}_{\text{muestra}}$) de acuerdo a una curva de calibración de ácido ascórbico realizada en un intervalo 10 a 1500 mM.

4.7 Evaluación de la actividad antibacteriana.

4.7.1 Microorganismo de prueba.

Para realizar la determinación del efecto de los extractos y compuestos aislados sobre el crecimiento bacteriano se utilizó como microorganismo de prueba a la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* (ATCC 10499).

4.7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El efecto de los compuestos y los extractos etanólicos sobre el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* se determinó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos. La cepa de *S. mutans* utilizada se conservó en glicerol a -64°C a partir del cultivo original ATCC. Para reactivar la cepa, se incubó un inóculo de la bacteria original criopreservada por 24 h en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés). En seguida, se resembraron las bacterias que crecieron utilizando de nueva cuenta caldo BHI y se incubó por 4 horas. Posteriormente, la suspensión celular se ajustó a 2 en la escala de McFarland correspondiente a una concentración de 1×10^6 UFC/mL utilizando un espectrofotómetro Agilent, modelo 8453E. El valor de CMI se definió como la concentración mínima del compuesto o extracto de prueba que limitaba la turbidez a menos de $0.05 A_{660 \text{ nm}}$.

4.7.3 Procedimiento general del ensayo.

En los 96 pozos de la placa se colocaron 100 μL del medio de cultivo. Posteriormente, se adicionaron en la línea A 100 μL de la muestra (2.0 mg/mL) y se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 100 μL de línea en línea (A-H) desechando los últimos 100 μL . Como paso siguiente se agregaron 80 μL de medio de cultivo enriquecido con 1% de sacarosa e inmediatamente se adicionaron 20 μL de la bacteria *S. mutans* (1×10^6 UFC/mL). Como controles se utilizaron: el medio de cultivo inoculado con la bacteria de prueba (control negativo), el medio sin inocular (control de esterilidad) y el medio de cultivo con inóculo y disolvente (control de disolvente) y el medio con inóculo y gluconato de clorhexidina al 0.12% como muestra (control positivo) (**Tabla 5**). Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora Labnet 211DS. Por último se leyeron en una lectora de placas de Elisa a 660 nm para determinar su CMI. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 5. Testigos utilizados en el ensayo biológico, para determinar la CMI.

<i>Control</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Compuesto de prueba</i>
Control de disolvente	Con inóculo	Agua-DMSO (1mL:100 μL)
Control negativo	Con inóculo	Medio BHI
Control de esterilidad	Sin inóculo	Medio BHI
Control positivo	Con inóculo	Gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12%

4.8 Microextracción en fase sólida de la fase gaseosa acoplada a cromatografía de gases con espectrometría de masas en tiempo de vuelo (HS-SPME-CG-EM-TOF).

4.8.1 Microextracción.

La microextracción se realizó empleando fibras de 50/30 μm de divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS) y 75 μm de divinilbencen-polidimetilsiloxano (DVB/PDMS). Las fibras se activaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Supelco).

Para cada extracción se emplearon aproximadamente 200 mg de cada propóleos, 5 mL de agua y 20 mg de NaCl. Cada muestra se colocó por separado en un vial de 40 mL con séptum de politetrafluoroetileno (PTFE). Posteriormente, cada vial fue sometido a agitación a una temperatura de 45-50°C y la fibra para la microextracción se expuso en la fase gaseosa del vial para la sorción de los analitos durante 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la fibra del vial y se introdujo en el inyector del cromatógrafo por 3 minutos para su desorción y su análisis. Para evitar cualquier sesgo experimental en el análisis, el proceso se realizó por triplicado para cada muestra y para cada una de las fibras.

4.8.2 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM).

Para la realización del análisis se empleó el espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo Agilent 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5%fenil-polimetilsiloxano de 10 m \times 0.18 mm \times 0.18 μm). La temperatura del inyector se mantuvo a 300°C; utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a una velocidad lineal de 1 mL/min (medido a 250°C). La

temperatura del horno se programó a 40°C (durante 1 minuto) y se incrementó la temperatura a 20°C/min hasta los 300°C durante 5 minutos. Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo de inyección “split” (1:20).

La ionización se llevó a cabo mediante impacto electrónico a 70eV; la temperatura de la cámara de ionización fue de 200°C y la de la línea de transferencia de 250°C. Se programó una velocidad espectral de 20 espectros/seg. El barrido de masas fue de 33-400 uma (unidad de masa atómica). En la **Tabla 6** se resumen las condiciones bajo las cuales las muestras fueron preparadas y analizadas.

4.8.3 Obtención del índice de concentración (F_{ij}).

El coeficiente F_{ij} se obtuvo realizando el procedimiento del inciso 4.8.1 para cada una de las fibras. Este índice fue introducido inicialmente por Zuba *et al.*, (2002) y fue modificado posteriormente por Hamm *et al.* (2003) de la siguiente manera:

$$F_{ij} = \frac{\sum_i H_{ij}}{k \sum_{ij} H_{ij}}$$

Dónde: F_{ij} es el índice de la capacidad de concentración de la fibra j para los analitos i , k es el número de fibras empleadas y, H_{ij} el área o pico del analito i para la fibra j .

Tabla 6. Resumen de las condiciones de preparación y análisis de las muestras mediante HS-SPME-CG-EM-TOF.

	<i>Parámetro</i>	<i>Condición</i>
<i>Preparación de la muestra</i>	Técnica de preparación de la muestra	Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa (HS-SPME)
	Microfibra utilizada	2cm 50/30µm DVB/CAR/PDMS Marca Supelco Lote P340030 No. Cat. 573-48-U.
	Tiempo de exposición de la fibra	45 minutos
	Temperatura de la muestra	45-50°C (baño de agua)
	Posición de la fibra en la extracción	En fase gaseosa (Headspace)
	Tiempo de sorción en el inyector	3 minutos
	<i>Análisis de la muestra</i>	Marca y modelo del equipo
Técnica analítica		CG-EM-TOF
Temperatura del inyector		300°C
Cromatógrafo de gases		Agilent 6890N
Columna capilar (fase)		DB5 10m x 0,18mm dii x 0,18µm
Programación de la temperatura del horno		40°C (1 minuto), 20°C/minuto hasta 300°C (5 minutos)
Tipo de inyección		Split (con división de flujo) 1:20
Gas acarreador		Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
Flujo del gas acarreador		1 mL/minuto
Temperatura de la línea de transferencia		250°C
Tipo de ionización		Ionización electrónica (IE)
Analizador másico		Tiempo de vuelo (TOF)
Velocidad de adquisición espectral		20 espectros/segundo
Retraso/encendido del filamento		0 minutos
Intervalo masas		45-400u
Temperatura de la cámara de ionización	200°C	
Compuestos de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)	

4.8.4 Identificación de los compuestos volátiles.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó por medio de la comparación de sus espectros de masas y de sus índices de retención con los reportados en la biblioteca electrónica NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) y en la biblioteca Wiley Versión 2.0.

4.9 Estudio fitoquímico biodirigido del propóleo obtenido en el apiario de “Acuexcomatl”.

4.9.1 Preparación del extracto.

El material vegetal (200 g) se sometió a una extracción por maceración a temperatura ambiente utilizando 1000 mL de etanol por un período de 48 horas. Posteriormente, el extracto obtenido se filtró al vacío y se recuperó el disolvente a presión reducida para finalmente obtener 85.4 g del extracto total.

4.9.2 Fraccionamiento primario del extracto etanólico.

El extracto etanólico se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando un método de partición líquido-líquido. Para ello, el extracto etanólico se suspendió en 700 mL de metanol-agua (95:5) y posteriormente, se sometió a un proceso de reparto utilizando secuencialmente hexano (300 mL × 3) y acetato de etilo (AcOEt, 300 mL × 3). Las particiones resultantes fueron concentradas a presión reducida. Este proceso condujo a la obtención de las fracciones primarias F-Hex, F-AcOEt y F-MeOH.

4.9.3 Fraccionamiento secundario.

Los 58.0 g de la fracción F-AcOEt se sometieron a un segundo fraccionamiento vía cromatografía en columna abierta sobre 500 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevó a cabo con CH₂Cl₂ y se incrementó gradualmente con acetona. Se colectaron 95 fracciones de 500 mL cada uno y se reunieron aquellas que resultaron ser cromatográficamente similares. De esta forma se generaron 14 fracciones combinadas (F-A a F-N). En el **Tabla 7** se resume este proceso.

Tabla 7. Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatográfica en columna abierta de la fracción F-AcOEt.

<i>Fase móvil</i>	<i>Proporción (%)</i>	<i>Fracciones</i>	<i>Fracciones combinadas</i>	<i>Clave</i>
CH ₂ Cl ₂ - Acetona	100	1-10	1	F-A
	99:1	11-25	2	F-B
	98:2	26-33	3-10	F-C
	97:3	34-41	11-12	F-D
	95:5	42-46	13	F-E
	90:10	47-53	14-20	F-F
	85:15	54-63	21-37	F-G
	80:20	64-70	38-44	F-H
	70:30	71-84	45-48	F-I
	50:50	85-89	49-52	F-J
Acetona	100	90-95	53-61	F-K
			62-72	F-L
			73-79	F-M
			80-95	F-N

4.9.4 Aislamiento y purificación de los compuestos flavonoides.

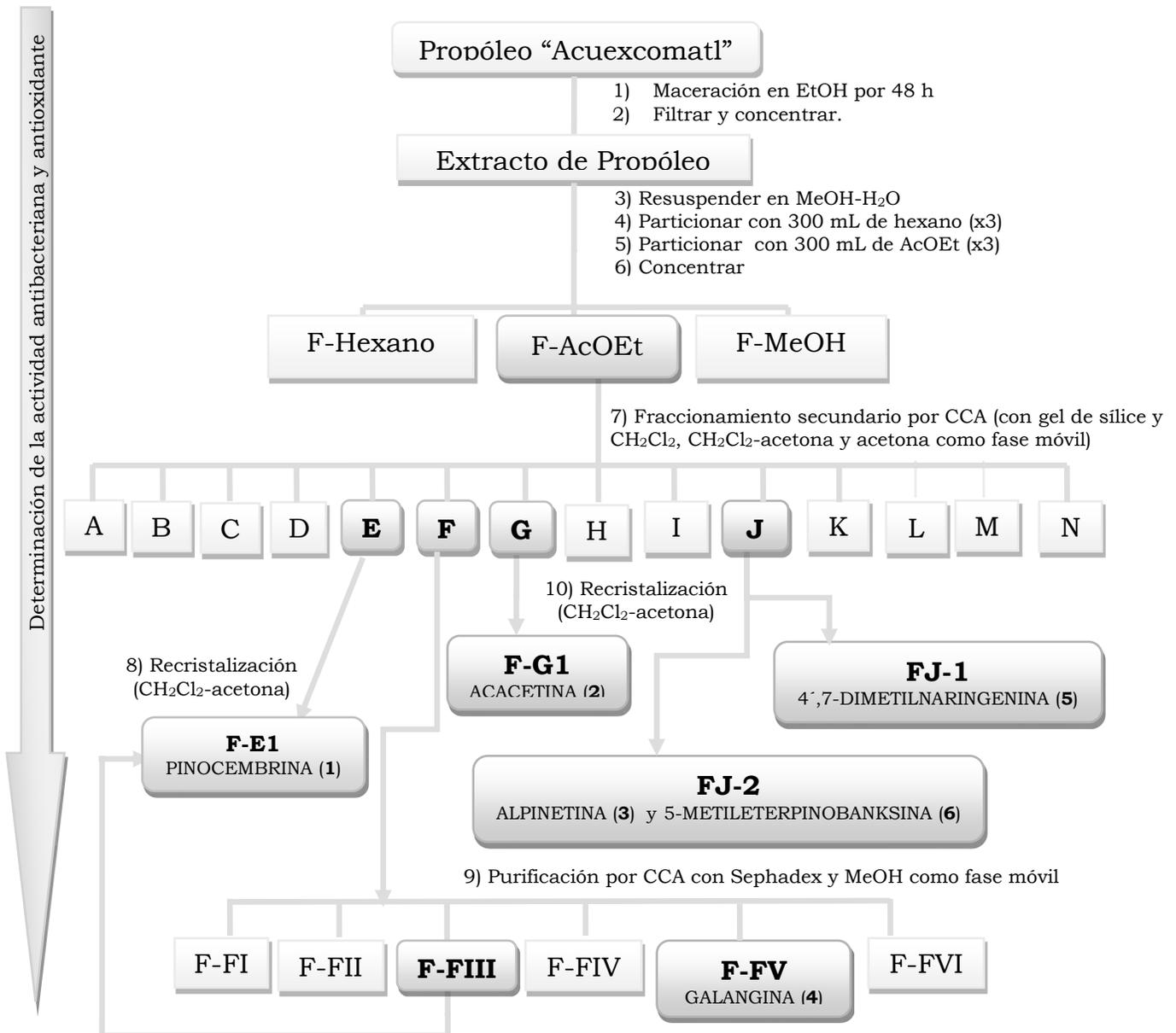
A partir de las fracciones F-E, F-G y F-J precipitaron los compuestos denominados F-E1, F-G1, F-J1 y F-J2, respectivamente. Estos compuestos fueron purificados mediante recristalización por par de disolventes utilizando CH₂Cl₂-metanol en diferentes proporciones. Los compuestos denominados previamente como F-E1, F-G1 y F-J1 fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como la pinocembrina (**1**), la acacetina (**2**), y la 4',7-dimetilnaringenina (**5**), respectivamente. El compuesto con la clave F-J2 fue caracterizado como una mezcla de alpinetina (**3**) y 5-metileterpinobanksina (**6**) en proporción 4:1.

Por otra parte, la fracción F-F se recromatografió utilizando una columna abierta de Sephadex LH-20 (24 × 5 cm) como adsorbente y MeOH como fase móvil. Se recolectaron 15 fracciones de 50 mL. Cada fracción se analizó mediante CCF y se reunieron aquellas que resultaron similares. De esta forma, se generaron 6 fracciones (F-I a F-VI). Las fracciones F-FIII y F-FV fueron caracterizadas como pinocembrina (**1**) y galangina (**4**), respectivamente. En el **Tabla 8** se resume el fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F-F. En el **Diagrama 1** se resume el proceso de purificación de los compuestos mayoritarios presentes en el propóleo seleccionado.

Tabla 8. Resumen del fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta de la fracción F-F.

<i>Fase móvil</i>	<i>Fracciones</i>	<i>Fracciones reunidas</i>	<i>Clave</i>
MeOH	1 - 15	1	I
		2	II
		3-8	III
		9	IV
		10-13	V
		14-15	VI

Diagrama 1. Proceso de aislamiento y purificación de los compuestos presentes en el propóleo del apiario “Acuexcomatl”.



5 Resultados y discusión.

Los resultados de la presente disertación se dividen en cuatro partes. La primera abarca aquellos aspectos concernientes a la investigación química biodirigida de la muestra de propóleo recolectada en el Centro Ecológico Acuexcomatl, que comprende la determinación sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*, la evaluación del potencial antioxidante y el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico derivado, de las fracciones y de los compuestos aislados. La segunda concierne en la comparación de la actividad biológica, el contenido de fenoles y de flavonoides totales en las muestras de propóleos recolectadas. La tercera se refiere a la cuantificación mediante HPLC del flavonoide pinocembrina y por último, la cuarta parte comprende la determinación de la composición de los compuestos volátiles utilizando la técnica acoplada HS-SPME-GC-MS-TOF en cinco muestras independientes recolectadas en diferentes apiarios ubicados en la Zona Rural del Distrito Federal (Zona melífera del Altiplano de México).

Antes de discutir los resultados, es importante destacar que la selección del propóleo como material de estudio se realizó con base en un criterio etnomédico, el cual ha demostrado, ser un buen punto de partida para el descubrimiento de compuestos bioactivos de interés medicinal (Rosas-Piñón *et al.*, 2012).

Durante la fase inicial del proyecto, se realizó una cuidadosa revisión en la literatura sobre diversos aspectos relacionados con el propóleo. Esta actividad indicó que en México existen seis zonas melíferas (Claridades, 2010, Salatino *et al.*, 2011) y diferentes clases de propóleo (Salatino, 2011). Por otra parte, esta revisión arrojó como resultados la ausencia de

estudios en propóleos producidos en la zona melífera del Altiplano de México.

A partir de uno de los propóleos recolectados y desecados (Acuexcomatl) se preparó el extracto etanólico y se ensayó con la finalidad de determinar su actividad contra el crecimiento de *S. mutans* y su capacidad antioxidante. La actividad antibacteriana se determinó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos, siguiendo la metodología descrita por Hernández y colaboradores (2012).

La capacidad antioxidante se determinó utilizando los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP (Prior *et al.*, 2005). Los resultados se expresaron en unidades aceptadas internacionalmente como son: los equivalentes Trolox ($TEAC = mM_{Trolox}/g_{mta}$) para los ensayos de DPPH y ABTS, y los equivalentes de ácido ascórbico ($AEAC = mM_{ác. ascórbico}/g_{mta}$) para el ensayo de FRAP.

Por otra parte, se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales debido a que ambos son parámetros importantes en el control de calidad de los propóleos (Alzaga, 2011). El contenido de fenoles totales fue calculado como equivalentes de ácido gálico por miligramo de muestra ($mg_{ác. gálico}/g_{mta}$); mientras que el contenido de flavonoides como equivalentes de quercetina ($mg_{quercetina}/g_{mta}$).

Con la finalidad de comparar la actividad biológica y el contenido químico del extracto etanólico del propóleo de Acuexcomatl se preparón a pequeña escala extractos etanólicos de otras muestras de propóleos recolectadas y se ensayaron de la misma forma. En la **Tabla 9** se resumen las ecuaciones resultantes de las curvas de calibración realizadas para cada ensayo.

Tabla 9. Ecuaciones de las rectas obtenidas para los ensayos de ABTS, DPPH, FRAP, fenoles y flavonoides totales.

<i>Ensayo</i>	<i>Intervalo de la curva</i>	<i>Ecuación de la recta</i>	<i>(r²)</i>
Fenoles totales ($\lambda=760\text{nm}$)	10 - 200 $\mu\text{g/mL}$	$\text{ABS} = 0.0036 \cdot C_{\text{ác.gálico}}$	0.0098
Flavonoides totales ($\lambda=420\text{nm}$)	10 - 60 $\mu\text{g/mL}$	$\text{ABS} = 0.0226 \cdot C_{\text{quercetina}}$	0.0099
ABTS ($\lambda=700\text{nm}$)	3.2 - 75 mM	$\text{ABS} = 0.0012 \cdot C_{\text{Trolox}} + 0.7928$	0.9970
DPPH ($\lambda=490\text{nm}$)	12.8 - 500 mM	$\text{ABS} = 0.0043 \cdot C_{\text{Trolox}} + 0.4298$	0.9983
FRAP ($\lambda=595\text{nm}$)	10 - 1500 mM	$\text{ABS} = 0.0006 \cdot C_{\text{ác. asc.}} + 0.0382$	0.9955

ABS : Absorbencia

5.1 Estudio fitoquímico biodirigido del propóleo Acuexcomatl.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de fenoles ($44.5 \text{ mg}_{\text{ác.gálico}}/\text{g}_{\text{mta}}$) y flavonoides totales ($16.65 \text{ mg}_{\text{quercetina}}/\text{g}_{\text{mta}}$), el propóleo de Acuexcomatl cumple con las especificaciones de control de calidad establecidas por las normas de Argentina y Brasil. En estos documentos se establece que el contenido mínimo de compuestos fenólicos y flavonoides totales debe ser de $40 \text{ mg}_{\text{ác.gálico}}/\text{g}_{\text{mta}}$ y $5 \text{ mg}_{\text{quercetina}}/\text{g}_{\text{mta}}$, respectivamente para que el propóleo o sus extractos puedan ser utilizados como materia prima para elaborar productos de uso farmacéutico y cosmético.

La actividad antioxidante mostrada por el extracto en los ensayos de DPPH[·] y ABTS^{·+} fue de $62.2 \text{ mM}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{mta}}$ y $344.8 \text{ mM}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{mta}}$, respectivamente. Por otra parte, mostró una actividad reductora en el ensayo de FRAP de $348.8 \text{ mM}_{\text{ác.ascórbico}}/\text{g}_{\text{mta}}$. Por último, el extracto presentó una CMI de $261 \mu\text{g/mL}$ sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*. Es importante mencionar que un extracto preparado a partir de materiales vegetales es considerado activo si presenta una CMI menor a $1000 \mu\text{g/mL}$ (Rivero-Cruz, 2008; Rosas-Piñón, 2012). Sin embargo, la potencia exhibida por los extractos no se compara

con el gluconato de clorhexidina (control positivo), antimicrobiano tópico utilizado en los enjuagues bucales para el tratamiento de la gingivitis y periodontitis, cuya CMI es de 1.2 µg/mL.

Con base en los resultados anteriores se decidió realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto etanólico preparado a partir del propóleo recolectado en el apiario de Acuexcomatl. Para ello, el extracto total se fraccionó utilizando un método de partición líquido-líquido utilizando como disolventes hexano, acetato de etilo y metanol acuoso (9:1). Como resultado de este proceso se obtuvieron las fracciones primarias F-Hex, F-AcOEt y F-MeOH. En seguida, se determinó su capacidad antioxidante, el efecto sobre el crecimiento de la bacteria *S. mutans* y el contenido de fenoles y flavonoides totales para cada fracción obtenida.

La fracción F-AcOEt presentó la mejor actividad antibacteriana (CMI de 275 µg/mL) y la mejor capacidad antioxidante (356.5 mM_{trolox}/g_{mta}, 76.0 mM_{trolox}/g_{mta} y 1202.1 mM_{ác.ascórbico}/g_{mta} en los ensayos ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente). En las **Gráficas 1A a 1F**, se ilustran dichos resultados.

Por este motivo, la fracción F-AcOEt se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando gel de sílice como adsorbente y mezclas de diclorometano y acetona en un gradiente de polaridad como fase móvil. Como resultado de este proceso se obtuvieron catorce fracciones secundarias (FA - FN). Dichas fracciones fueron evaluadas para determinar de nueva cuenta su actividad antibacteriana, capacidad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides totales. En las **Gráficas 1A a 1F** se ilustran los resultados correspondientes.

Las fracciones F-A a F-F presentaron un contenido de fenoles mayor a $80 \text{ mg}_{\text{ác. gálico}} / \text{g}_{\text{mta}}$ en comparación con el resto de las fracciones cuyos contenidos fueron menores a $60 \text{ mg}_{\text{ác. gálico}} / \text{g}_{\text{mta}}$ (**Gráfica 1A**). Por otra parte, es importante mencionar que la fracción F-F presentó la mayor concentración de flavonoides ($47.5 \text{ mg}_{\text{quercetina}} / \text{g}_{\text{mta}}$) con respecto al resto de las fracciones cuyos contenidos se encuentran por debajo de $25 \text{ mg}_{\text{quercetina}} / \text{g}_{\text{mta}}$ (**Gráfica 1B**).

La tendencia de los resultados obtenidos para las fracciones secundarias en los ensayos de DPPH y ABTS son similares (**Gráficas 1C y 1D**). Esta tendencia puede explicarse con el mecanismo de acción por el cual los antioxidantes neutralizan a ambos radicales, el cual es prácticamente el mismo (**Figura 8**). Así, las fracciones secundarias F-A, F-B, F-E, F-F, F-K, F-L y F-M presentaron la mejor capacidad de neutralización para ambos radicales. Sin embargo, la capacidad antioxidante determinada en el ensayo de ABTS es significativamente mayor en comparación con la capacidad antioxidante determinada en el ensayo de DPPH. Estos resultados se encuentran en armonía con los reportados por Flogel en el 2011. En esta oportunidad el autor sugiere que el ensayo de ABTS puede ser una mejor opción con respecto al ensayo de DPPH para determinar la capacidad antioxidante.

Por otro lado, se determinó la habilidad de las fracciones secundarias para reducir al hierro. Los resultados indican que estas fracciones reducen al catión hierro III en un intervalo de concentración de 28 a $260 \text{ mM}_{\text{ac. asc.}} / \text{g}_{\text{mta}}$. Las fracciones F-B - F-F y F-M fueron las más activas mientras que, las fracciones F-H y F-I fueron inactivas (**Gráfica 1E**).

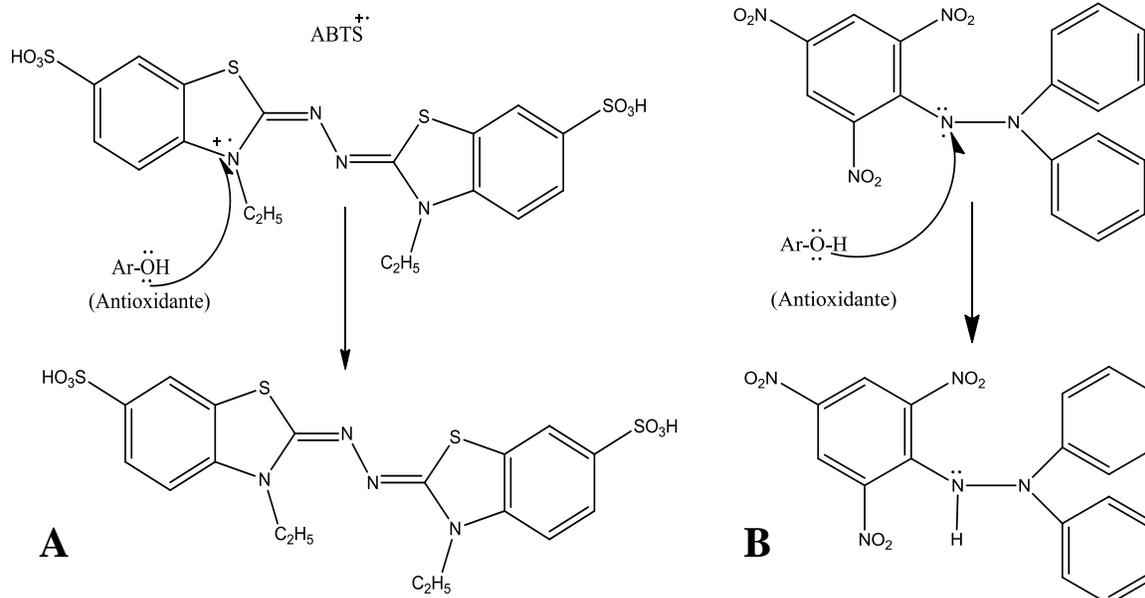
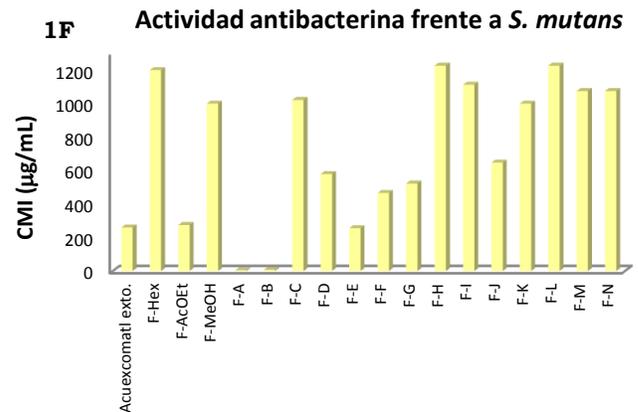
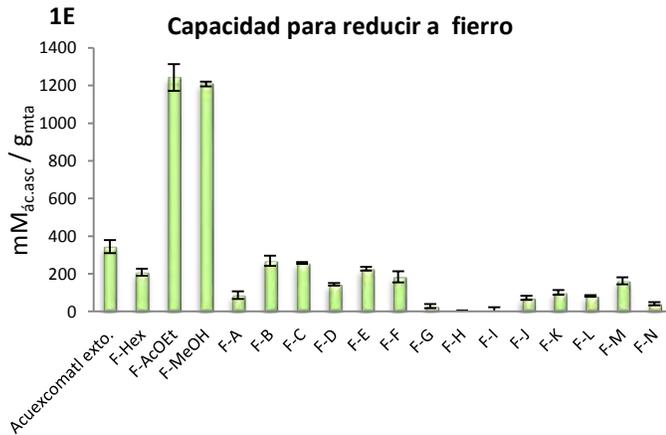
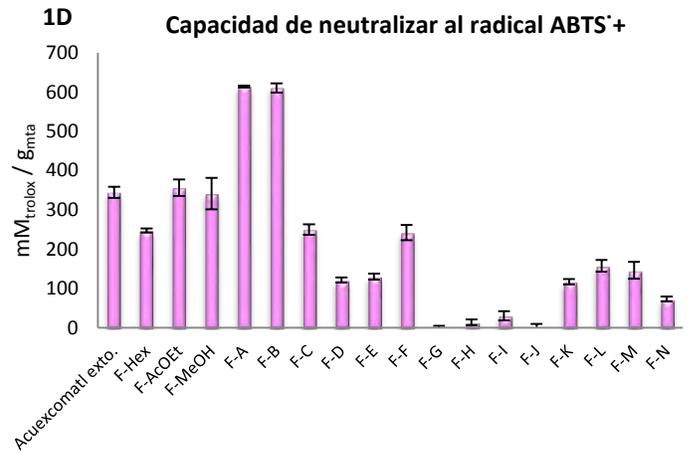
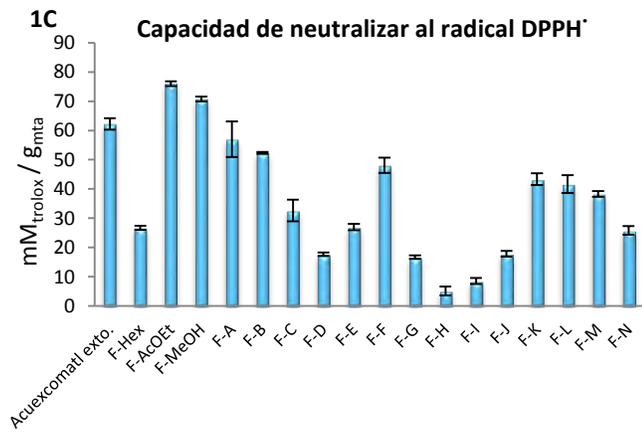
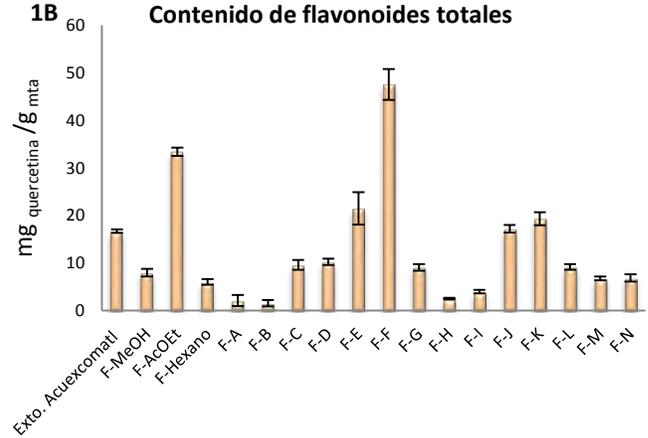
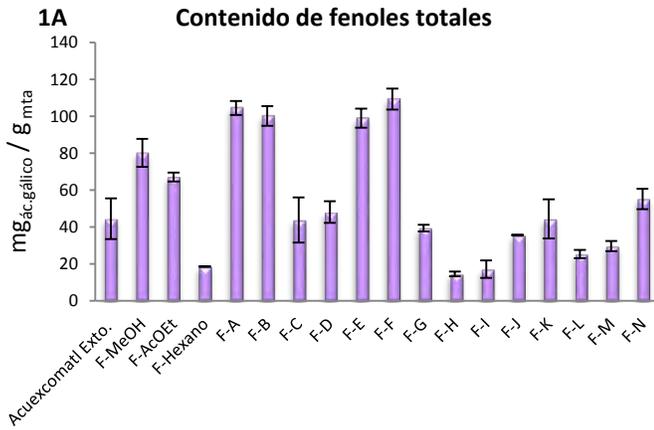


Figura 8. A. Mecanismo de acción de los antioxidantes frente al radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$. **B.** Mecanismo de acción de los antioxidantes frente al radical DPPH.

Por último, el efecto encontrado al ensayar las fracciones secundarias (F-A a F-M) sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans* se encontró en un rango de 4 a 1300 $\mu\text{g/mL}$. Las fracciones F-A y F-B mostraron la mejor actividad con un valor de CMI de 4.26 $\mu\text{g/mL}$ y 6.92, respectivamente (**Gráfica 1F**).

Con base en los resultados anteriores, se decidió continuar el estudio químico con las fracciones F-E, F-F y F-G ya que presentaron la mejor actividad antioxidante y antibacteriana, así como la mayor concentración de fenoles y flavonoides. Aunque las fracciones F-A y F-B presentaron la mayor potencia antibacteriana y las mejores actividades antioxidantes, no fue posible continuar con su estudio químico debido a que la cantidad de muestra con la que se contaba era insuficiente. Sin embargo, se puede inferir que el contenido químico de ambas fracciones es del tipo fenólico.



Gráfica 1. Actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico y las fracciones derivadas del fraccionamiento del propóleo de Acuexcomatl. **A.** Contenido de fenoles totales. **B** Contenido de flavonoides totales. **C.** Capacidad de neutralizar al radical DPPH'. **D.** Capacidad de neutralizar al radical catiónico ABTS'+. **E.** Capacidad de reducir a hierro. **F.** determinación del efecto sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.

A partir de las fracciones F-E y F-G se purificaron los compuestos **F-E1** y **F-G1**, caracterizados como pinocembrina (**1**) y acetina (**2**) respectivamente. La fracción F-F fue recromatografiada como se describe en el desarrollo experimental en el punto 4.9.4, obteniendo seis fracciones (F-FI a F-FVI). A partir de las fracciones F-FIII y F-FV se aislaron cantidades adicionales de pinocembrina (**1**) y el compuesto **F-FV1**, caracterizado como galangina (**4**). Por otra parte, a partir de la fracción F-J se aisló el compuesto **F-J1**, caracterizado como 4',7-dimetilnaringenina y una mezcla constituida por los compuestos alpinetina (**3**) y 5-metileterpinobanksina (**6**) denominada **F-J2**. En la **Figura 9** se ilustran las estructuras químicas de los compuestos aislados.

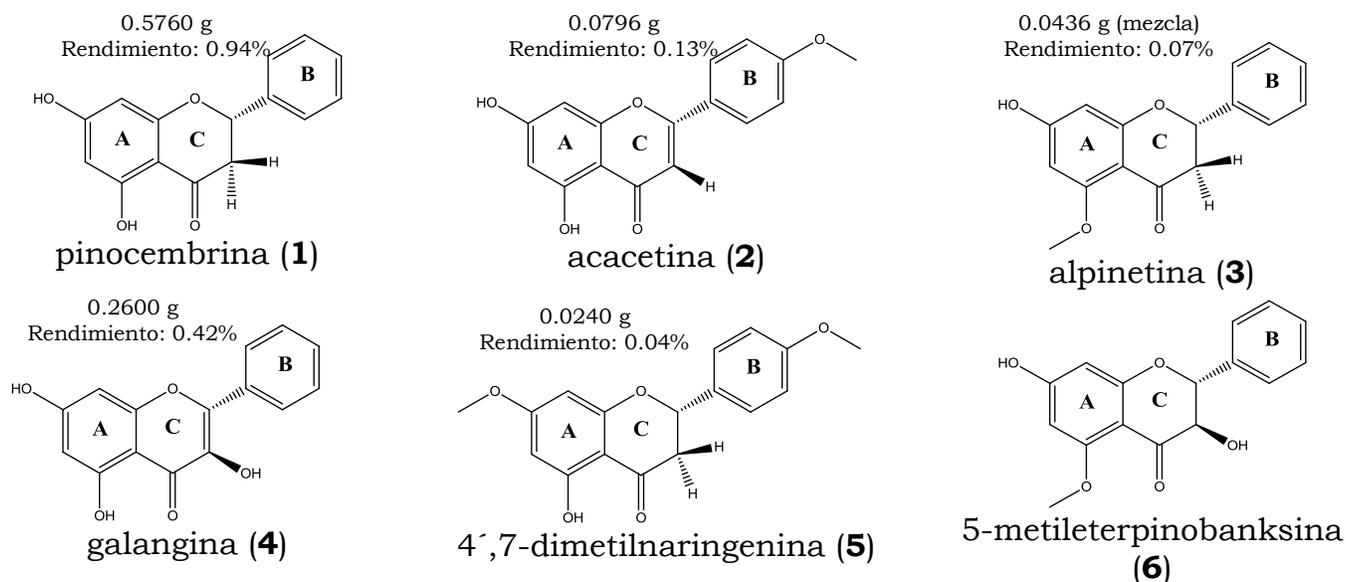


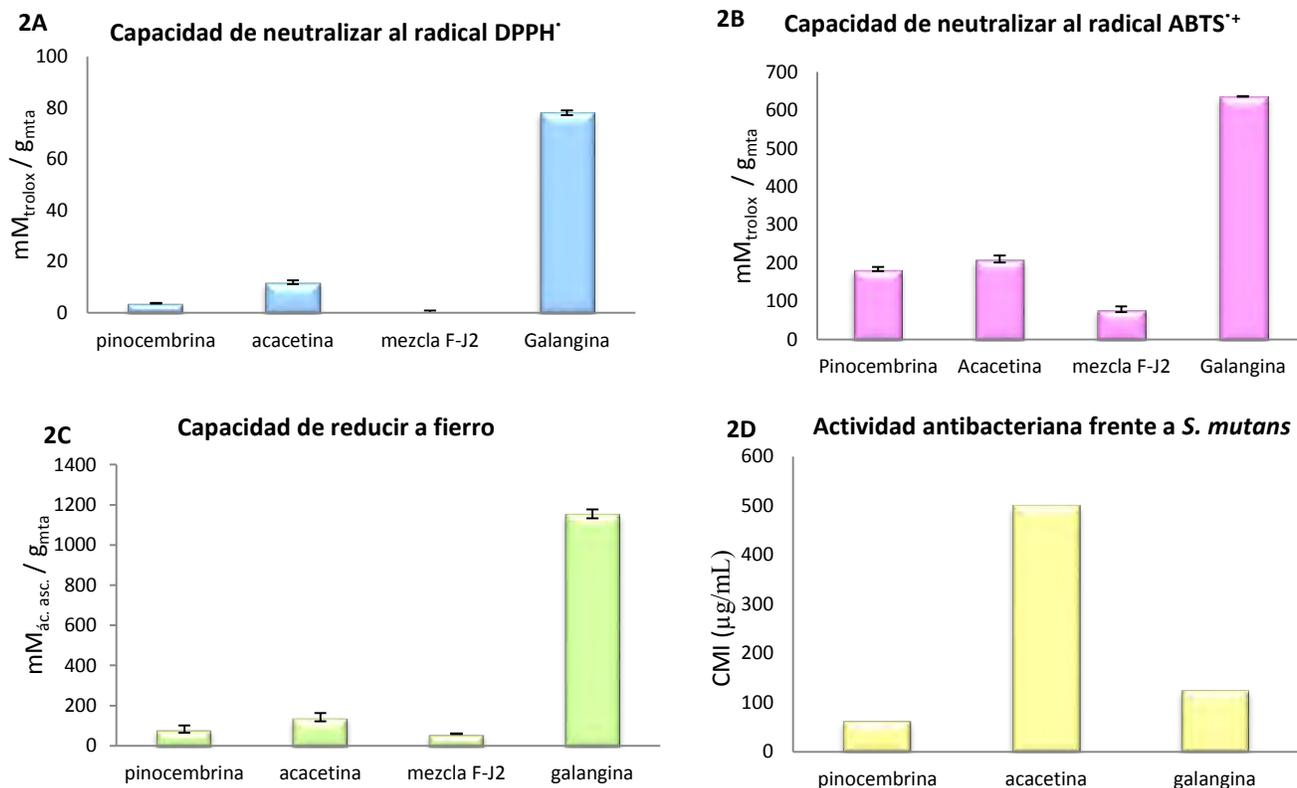
Figura 9. Estructuras químicas y rendimientos (%) de los seis compuestos aislados a partir del extracto etanólico del propóleo colectado en el apiario Acuexcomatl.

En las **Gráficas 2A** a **2C** se ilustran los resultados obtenidos de la evaluación biológica obtenida con los compuestos ensayados. Es importante mencionar que la 4',7-dimetilnaringenina (**5**) no fue ensayada debido a que la cantidad que se aisló no fue suficiente para realizar dichos ensayos.

Como se observa en las **Gráficas 2A a 2C**, la galangina (**4**) presentó la mejor actividad en los tres ensayos realizados. Este flavonoide presentó una capacidad de inhibición de los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] de 636 y 78 mM_{trolox}/g_{mta}, respectivamente, además de presentar una habilidad reductora de 1144 mM_{ác.asc}/g_{mta} en el ensayo de FRAP. Por otra parte, la acetina (**2**) mostró una buena capacidad antioxidante frente a los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} (17.3 y 219 mM_{trolox}/g_{mta}, respectivamente) y un poder reductor moderado con respecto a la galangina. Por último, la pinocembrina (**1**) y la mezcla de alpinetina (**3**) y 5-metileterpinobanksina (**6**) presentaron las menores actividades antioxidantes y reductoras en los ensayos realizados.

En este sentido, estudios previos realizados por Pieta (2000) sobre la relación entre la estructura y la actividad biológica demuestran que los flavonoides con mejor actividad antioxidante poseen las siguientes características estructurales:

- 1) Presencia de grupos hidroxilo en los carbonos C-3' y C-4' del anillo B. Esta característica le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- 2) Un doble enlace en los carbonos C-2 y C-3, así como un carbonilo en la posición C-4. Estas características permiten la deslocalización de electrones desde el anillo C.
- 3) La presencia de grupos hidroxilo en los carbonos C-3 y C-5 (Pieta, 2000).



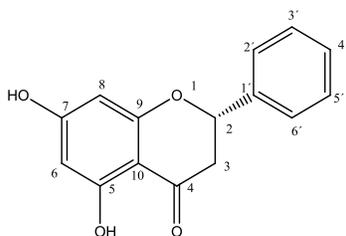
Gráfica 2. Actividad antioxidante y antibacteriana de pinocembrina (**1**), acacetina (**2**), galangina (**4**) y de la mezcla F-J2 (alpinetina (**3**) y 5-metileterpinobanksina (**6**) a una concentración de 1000 ppm. **2A.** Capacidad de neutralizar al radical DPPH'. **2B.** Capacidad de neutralizar al radical catiónico ABTS⁺. **2C.** Capacidad de reducir a hierro. **2D.** Capacidad inhibitoria frente a *S. mutans*.

En este sentido la galangina (**4**) que presentó la mejor capacidad antioxidante reúne dos de las tres características mencionadas anteriormente, ya que presenta un doble enlace entre los carbonos C-2 y C-3, un grupo carbonilo en C-4 y grupos hidroxilos en C-3 y C-5. Por otra parte, la acacetina (**2**), que presentó una actividad antioxidante moderada, presenta casi las mismas características que galangina (**4**) con excepción del hidroxilo en C-3. Por último, la pinocembrina (**1**), la alpinetina (**3**) y la 5-metileterpinonaksina (**6**) no presentan la doble ligadura en C-2 y C-3, ni el grupo hidroxilo en C-3 y C-5, lo cual explica su menor capacidad antioxidante.

5.1.1 Caracterización estructural de los metabolitos aislados.

La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. En esta sección, se discutirá a elucidación de las estructuras de los compuestos pinocembrina (**1**), alpinetina (**3**) y 5-metileterpinobanksina (**6**).

La pinocembrina (**1**) (**Figura 10**) ha sido previamente aislada de las especies vegetales *Boesenbergia pandurata* (rizoma) y *Flourensia oolepis* (partes aéreas), además de haber sido ampliamente aislada del propóleo. Esta flavona, se aisló como un sólido cristalino amarillo pálido. Su fórmula molecular se estableció como $C_{15}H_{12}O_4$ con base en su espectro de masas, que mostró un ión molecular con una relación masa carga de 256. Las características más importantes observadas en los espectros de RMN 1H y RMN ^{13}C del producto **1** se resumen a continuación:



EMIE m/z (pinocembrina): 256 (62), 255 (43), 179 (96), 153 (26), 152 (100), 124 (55), 104 (22), 103 (20), 77 (19), 69 (23), 51 (11).

Figura 10. Estructura química de la pinocembrina y sus datos de espectrometría de masas.

1. En la región aromática del espectro de RMN 1H se aprecia un doble de dobles en δ_H 7.48 (2H, dd, $J = 8.0$ y 4.0 Hz, H-2' y H-6') y un multiplete en δ_H 7.42 – 7.35 (3H, m, H-3' - H-5'). Estas señales correlacionan en el espectro de HSQC con las absorciones en δ_C 128.27 (C-2' y C-6'), 128.19 (C-4') y 125.91 (C-3' y C-5'). Las señales son asignables al anillo B de la flavona.

2. Por otra parte, en el espectro de RMN¹H se aprecian dos señales dobles en δ_H 5.93 (1H, d, $J= 4.0$ Hz, H-6) y en δ_H 5.90 (1H, d, $J= 4.0$ Hz, H-8), las cuales se correlacionan con las señales del espectro de HSQC δ_C 95.75 (C-6) y en δ_C 94.81 (C-8), respectivamente. Estas señales son asignables al anillo A de la flavona.

3. En la región alifática del espectro se aprecian tres dobles de dobles en δ_H 2.76 (1H, dd, $J = 16.0$ y 4.0 Hz, H-3b), 3.1 (1H, dd, $J= 16.0$ y 12.0 Hz, H-3a) y 5.44 (1H, dd, $J =16.0$ y 4.0 Hz, H-2), los dos primeros correlacionan en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 42.75 (C-3) y el tercero con la señal en δ_C 79.01 (C-2). Estas señales son asignables a las posiciones 2 y 3 del anillo C de la flavona. En las **Figuras 11** y **12** se muestran los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C obtenidos para la pinocembrina (**1**) y en la **Tabla 10** se resumen sus constantes espectroscópicas.

Las constantes descritas anteriormente, fueron comparadas con las descritas en la literatura por Wawer y Zielinska (2001).

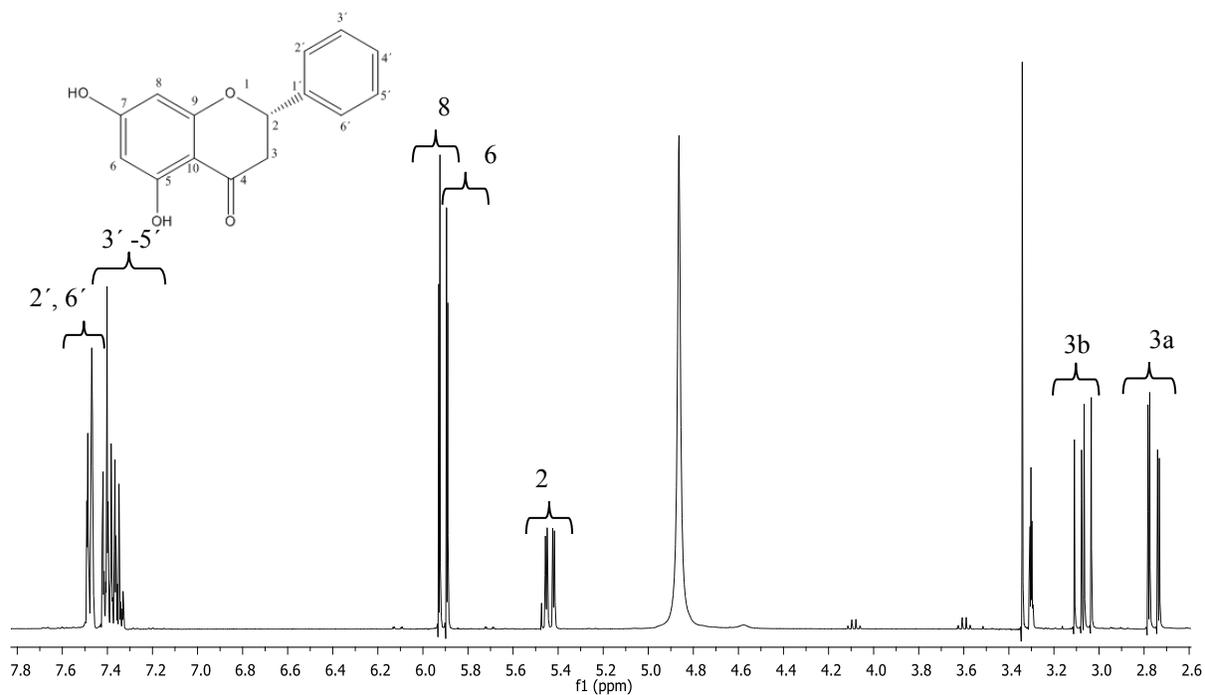


Figura 11. Espectro de RMN ¹H de la pinocembrina (1)

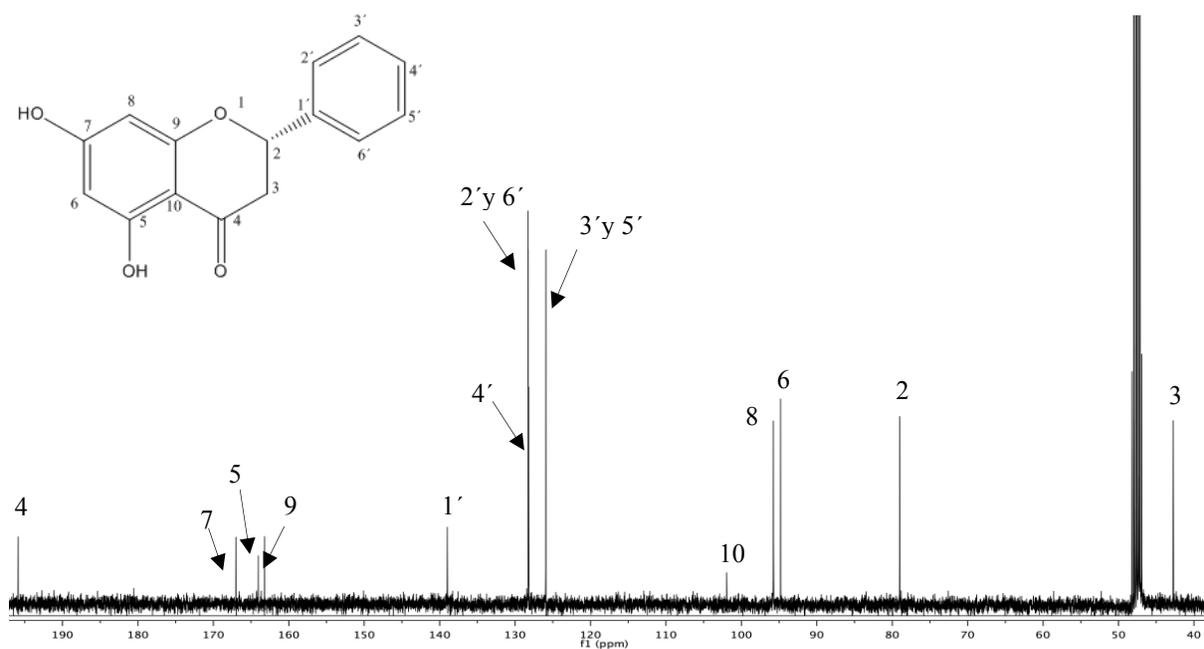


Figura 12. Espectro de RMN ¹³C de la pinocembrina (1)

La alpinetina (**3**) (**Figura 13A**) se separó en mezcla con la 5-metileterpinobanksina (**6**) (**Figura 13B**) como un sólido blanco. La alpinetina (**3**) ha sido previamente aislada de las especies vegetales del genero *Alpinia* y de la especie *Boesenbergia rotunda*. Sin embargo, sólo existe un reporte en el cual se describe el aislamiento de alpinetina (**3**) a partir de una muestra de propóleo argentino. Mientras tanto, la 5-metileterpinobanksina (**6**) ha sido aislada en muestras de propóleos brasileños y en la especie *Lychnophora staavioides* Mart (Takeara, 2003).

Las fórmulas moleculares de la alpinetina (**3**) y de la pinobanksina-5-metileter (**6**) se establecieron como $C_{16}H_{14}O_4$ y $C_{16}H_{14}O_5$ con base en el espectro de masas obtenido para la mezcla. Este espectro mostró iones moleculares en una relación masa carga de 270 y 286. La proporción de los compuestos en la mezcla se calculó como 4:1 utilizando el espectro de RMN^1H . Las características más importantes observadas en los espectros de RMN^1H y $RMN^{13}C$ de los productos **3** y **6** se resumen a continuación:

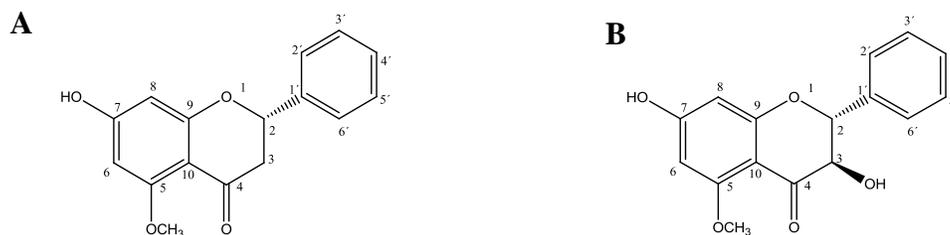


Figura 13. (A). Estructura química de la alpinetina (**3**). (B). Estructura química de la 5-metileterpinobanksina (**6**).

1. En la región aromática del espectro de RMN^1H (**Figura 14**) se aprecian dos multipletes en δ_H 7.47 – 7.49 (2H, m, H-2' y H-6') y en δ_H 7.35 – 7.46 (3H, m, H-3' - H-5'). Estas señales correlacionan en el espectro de HSQC con las absorciones en δ_C 128.75 (C-2' y C-6'), 128.60 (C-4) y 126.86 (C-3' y C-5') para el compuesto mayoritario alpinetina (**3**). Por otra parte, las señales de los protones H-2' - H-6' de la 5-metileterpinobaksina (**6**) se encuentran sobrepuestas con las

de los protones H-2'-H-6' de la alpinetina (**3**). Las señales correspondientes a la 5-metileterpinobanksina (**6**) presentan correlaciones en el espectro HSQC con las absorciones en δ_C 128.93 (C-2' y C-6'), 128.32 (C-4) y 126.86 (C-3' y C-5'). Además, se aprecian dos señales diles en δ_H 6.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8) y 5.98 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6). Estas señales correlacionan en el espectro de HSQC con las absorciones en δ_C 95.06 (C-8) y 93.90 (C-6). Este grupo de señales son asignables al anillo A de la alpinetina (**3**). Por último, se observan dos señales dobles en δ_H 6.08 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8) y 5.93 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6) que correlacionan con las señales en δ_C 93.70 (C-6) y en δ_C 95.91 (C-8), respectivamente. Estas señales son asignables a los protones del anillo A de la 5-metileterpinobanksina (**6**).

2. En la región comprendida en el intervalo de δ_H 5.46 a 2.60 del espectro de RMN¹H se aprecian tres dobles de dobles y una señal simple. Las señales en δ_H 5.46 (1H, dd, $J = 16.0$ y 4.0 Hz, H-2), 2.96 (1H, dd, $J = 16.0$ y 12.0 Hz, H-3a) y 2.60 (1H, dd, $J = 4.0$ y 16.0 Hz, H-3b) correlacionan en el espectro de HSQC con las absorciones δ_C 78.46 (C-2) y 45.28 (C-3). Por último, se aprecia un singulete en δ_H/δ_C 3.72/56.06 (3H, s) asignable a un grupo metoxilo. Este sustituyente fue ubicado en la posición C-5 con base en los resultados obtenidos en el espectro de NOE (**Figura 16**), en el cual se observa claramente que al irradiar el singulete en δ_H 3.72, se intensifica la señal en δ_H 6.05 (H-6). Esta observación es consistente con la ubicación del metoxilo en la posición 5.
3. Con respecto a las señales de la 5-metileterpinobanksina (**6**) en los espectros de RMN se observan en δ_H/δ_C 4.31 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2)/82.80 (C-2), 3.75 (3H, s)/ 56.17 y 5.06 (1H, dd, $J = 12$ Hz, H-

3)/72.99 (C-3). El grupo metoxilo se ubicó en C-5 utilizando una estrategia similar a la descrita para la alpinetina (**3**). En las **Figuras 14, 15 y 16** se muestran los espectros obtenidos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y NOE para la alpinetina (**3**) y la 5-metileterpinobanksina (**6**) y en la **Tabla 10** se resumen sus constantes espectroscópicas. Los datos espectroscópicos y espectrométricos son idénticos a los descritos previamente por Ching y colaboradores (2007).

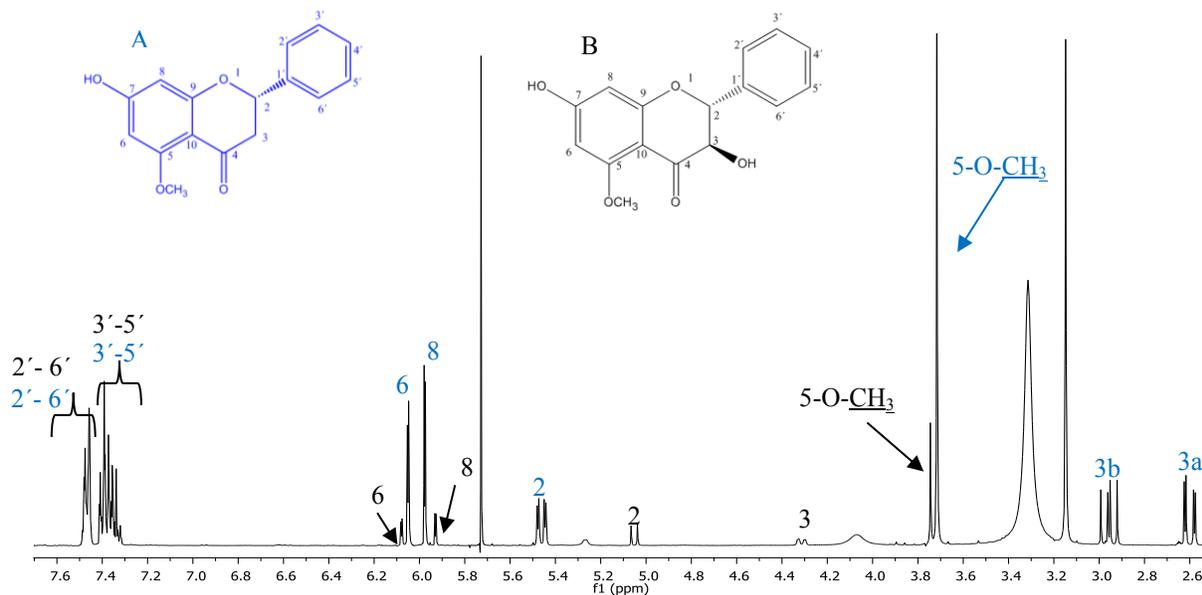


Figura 14. Espectro de RMN ^1H de la mezcla de alpinetina (**3**) y 5-metileterpinobanksina (**6**)

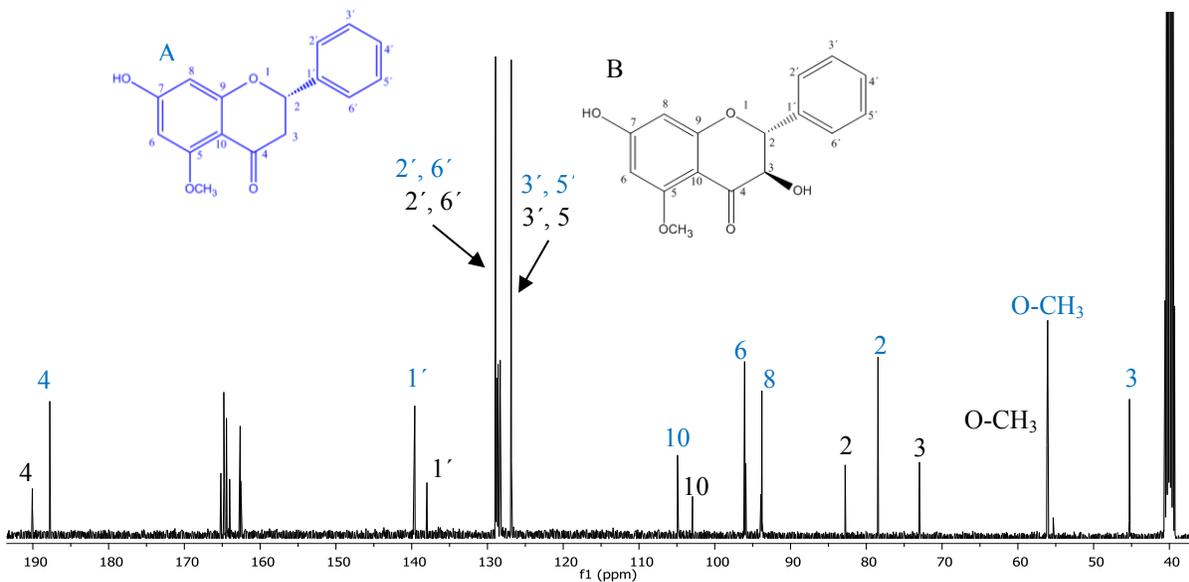


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C de la mezcla de alpinetina (**3**) y 5-metileterpinobanksina (**6**).

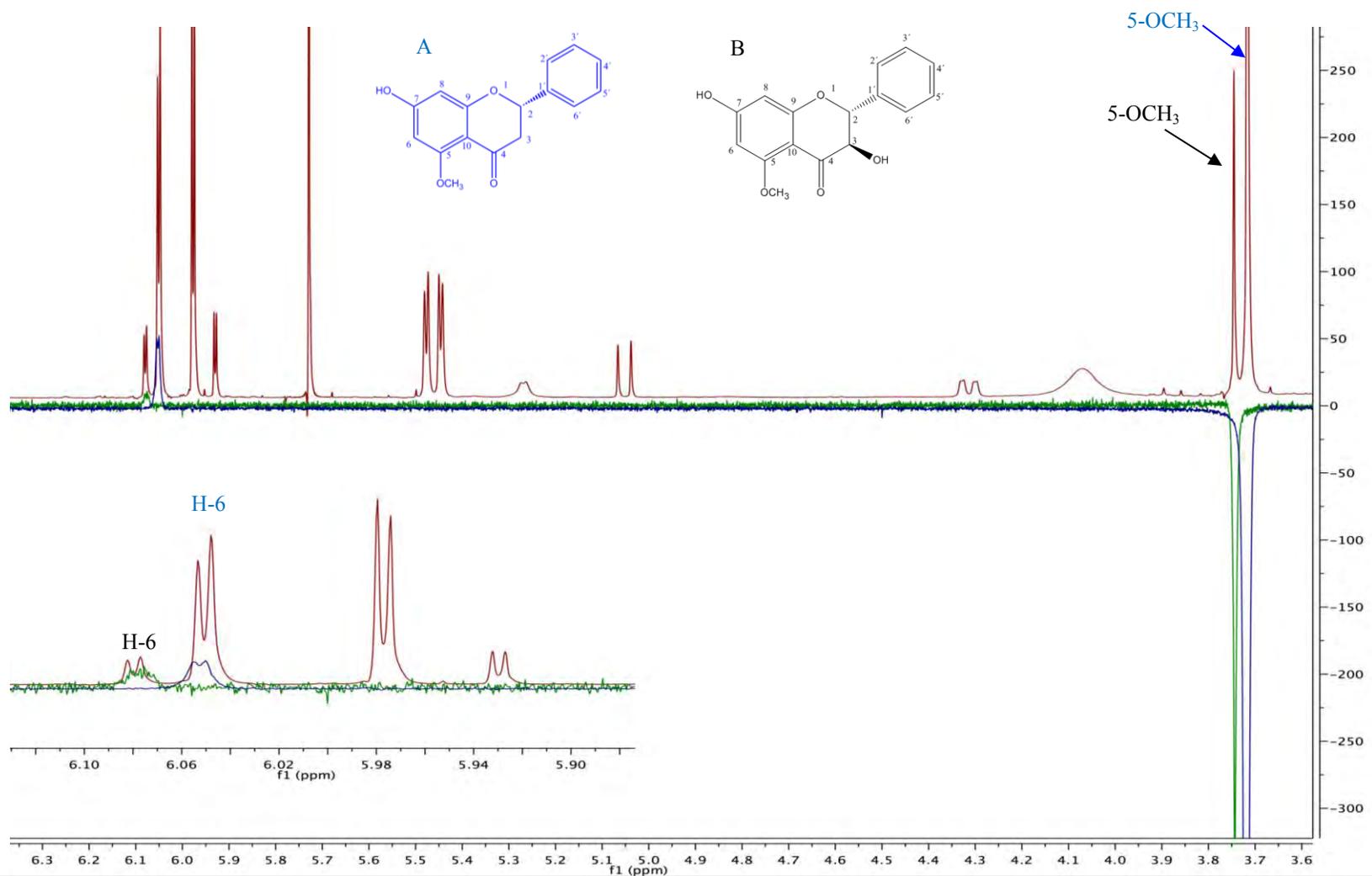


Figura 16. Espectro NOE de la mezcla de alpinetina (3) y 5-metileterpinobanksina (6).

La acacetina (**2**), la galangina (**4**) y la 4',7-dimetilnaringenina (**5**) se aislaron como sólidos y sus fórmulas moleculares se establecieron como $C_{16}H_{12}O_5$ (M^+284), $C_{16}H_{12}O_5$ (M^+282) y $C_{17}H_{16}O_5$ (M^+300), respectivamente mediante espectroscopia de masas. Las constantes espectroscópicas para cada producto se resumen en la **Tabla 10** y en la **Figura B** del **Anexo 1** se muestran los espectros de masas, RMN 1H y RMN ^{13}C . Todos los resultados espectroscópicos y espectrométricos son consistentes con los reportados en la literatura (Wawer y Zielinska, 2001; Medina, 2011; Pinzón, *et. al.*, 2011).

La acacetina (**2**), ha sido previamente aislada a partir de las hojas de *Robinia pseudacacia* y de muestras de propóleo de Sonora (Valencia, 2012) y de Brasil (Alencar, 2007). La galangina (**4**) ha sido aislada de la especie vegetal *Helichrysum aureonitens* (Meyer, 1997) y de algunas muestras de propóleos. Por último, a partir de la especie vegetal *Terminalia fagifolia* (Garcez, 2006) y de una muestra de propóleo mexicano (Tellez y Murillo, 2011) se ha aislado al flavonoide 4',7-dimetilnaringenina (**5**).

Tabla 10. Desplazamientos químicos y contantes de acoplamiento de los compuestos aislados en RMN ¹H.

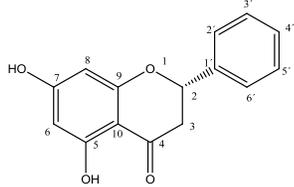
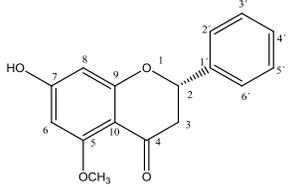
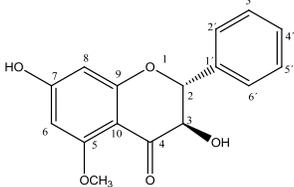
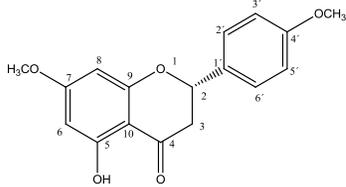
Posición	<i>Pinoembrina (1)</i>	<i>Alpinetina (3)</i>	<i>5-metileterpinobanksina (6)</i>	<i>4',7-dimetilnaringenina (5)</i>
				
	δ (J Hz)	δ (J Hz)	δ (J Hz)	δ (J Hz)
2	5.44 (1H, dd, $J=16.0, 4.0$)	5.46 (1H, dd, $J=16.0, 4.0$)	4.31(1H, d, $J= 8.0$)	5.37 (1H, dd, $J=16.0, 4.0$)
3a	2.76 (1H, dd, $J= 4.0, 16.0$)	2.60 (1H, dd, $J= 4.0, 16.0$)		2.79 (1H, dd, $J= 4.0, 16.0$)
3b	3.1 (1H, dd, $J=16.0, 12.0$)	2.96 (1H, dd, $J=16.0, 12.0$)	5.06 (1H, d, $J= 12$)	3.11 (1H, dd, $J=16.0, 12.0$)
4	---	---	---	---
5-OH	---	---	---	12.0 (1H)
5-OCH ₃	---	3.72 (3H, s)	3.75 (3H, s)	---
6	5.90 (1H, d, $J= 4.0$)	5.98 (1H, d, $J= 2.0$)	5.93 (1H, d, $J= 2.0$)	6.05 (1H, d, $J= 4.0$)
7	---	---	---	---
8	5.93 (1H, d, $J= 4.0$)	6.05 (1H, d, $J= 2.0$)	6.08 (1H, d, $J= 2.0$)	6.07 (1H, d, $J= 4.0$)
9	---	---	---	---
10	---	---	---	---
1'	---	---	---	---
2', 6'	7.48 (2H, dd, $J=8.0, 4.0$)	7.47–7.49 (2H, m)	7.47–7.49 (2H, m)	7.39 (2H, dd, $J=8.0, 4.0$)
3', 4', 5'	7.35 - 7.41 (3H, m)	7.32-7.46 (3H, m)	7.32-7.46 (3H, m)	---
3', 5'	---	---	---	6.96 (2H, dd, $J=8.0, 4.0$)
4'-OCH ₃	---	---	---	3.81 (3H, s)
7'-OCH ₃	---	---	---	3.83 (3H, s)
	400 MHz, CD ₃ OD	400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆	400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆	400 MHz, CDCl ₃

Tabla 10. Desplazamientos químicos de los compuestos aislados en RMN ^{13}C (Continuación).

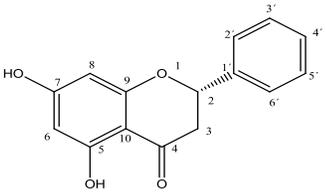
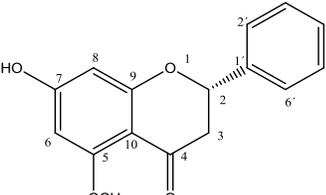
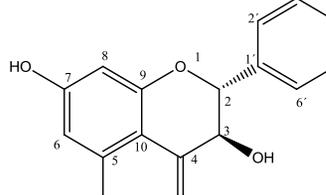
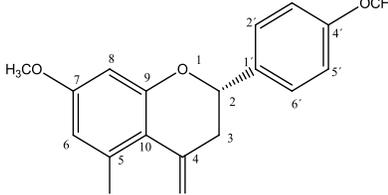
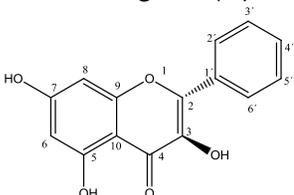
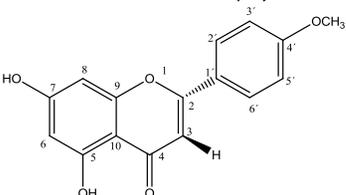
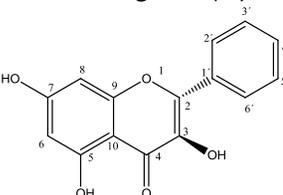
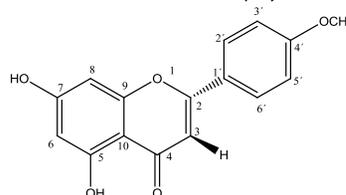
Posición	<i>Pinocembrina (1)</i> 	<i>Alpinetina (3)</i> 	<i>5-metileterpinobanksina (6)</i> 	<i>4',7-dimetilnaringenina (5)</i> 
	δ	δ	δ	δ
2	79.01	78.46	82.80	79.0
3	42.75	45.28	72.99	43.0
4	195.87	187.76	190.06	196.0
5	164.05	164.45	164.02	164.1
6	94.81	93.90	93.70	96.0
7	167.00	165.18	164.79	167.9
8	95.76	95.06	95.91	98.4
9	163.22	162.63	162.56	162.9
10	102.5	104.92	102.94	--
1'	138.98	137.99	139.59	130.0
2', 6'	128.27	128.75	128.93	128.5
4'	128.19	128.60	128.32	160.0
3', 5'	125.91	126.86	126.86	115.0
4'-OCH ₃	---	---	---	55.7
5-OCH ₃	---	56.07	56.17	---
7'-OCH ₃	---	---	---	55.4
	100 MHz, CD ₃ OD	100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆	100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆	100 MHz, CDCl ₃

Tabla 10. Desplazamientos químicos de los compuestos aislados en RMN ¹H y RMN ¹³C (Continuación).

Posición	Galangina (4)	Acacetina (2)	Galangina (4)	Acacetina (2)
				
	δ (JHz)	δ (JHz)	δ	δ
2	---	---	145.15	164.64
3	---	6.16 (1H, s)	136.99	103.92
4	---	---	175.87	182.69
5-OH	12.09 (1H)	12.88 (1H)	161.27	162.68
6	6.3 (1H, d, $J = 4.0$)	6.45 (1H, d, $J = 4.0$)	98.28	99.30
7	---	---	164.28	163.66
8	6.57 (1H, d, $J = 4.0$)	6.81 (1H, d, $J = 4.0$)	93.68	94.44
9	---	---	157.13	157.74
10	---	---	103.39	104.16
1'	---	---	131.18	123.21
2', 6'	8.26 (2H, dd, $J = 8.0, 4.0$)	7.98 (2H, dd, $J = 8.0, 4.0$)	129.08	128.69
3', 4', 5'	7.55 (3H, m, $J = 8.0, 4.0$)	---	---	---
4'	---	---	127.59	161.85
3', 5'	---	7.05 (2H, dd, $J = 8.0, 4.0$)	129.95	114.95
4'-OCH ₃	---	3.81 (3H, s)	---	55.95
	400 MHz, CD ₃ OD	400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆	100 MHz, CD ₃ OD	100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆

5.2 Comparación de la actividad biológica, del contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de los propóleos.

El efecto observado sobre el crecimiento de *S. mutans* de los cinco extractos etanólicos, se encontró dentro de un intervalo de 261 a 1200 $\mu\text{g/mL}$. Los extractos etanólicos de los propóleos provenientes de los apiarios Acuexcomatl y Búho fueron los que presentaron la mejor actividad con una CMI de 261 $\mu\text{g/mL}$ y 295 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El extracto del propóleo Valentín presento una CMI de 596 $\mu\text{g/mL}$ y es considerada como una actividad moderada, mientras que los extractos de los propóleos Don Nico y Trojes presentaron una actividad mayor a 1000 $\mu\text{g/mL}$, considerada como baja (Rivero, 2008; Rosas-Piñón. 2012).

Los resultados del contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos de los cinco propóleos recolectados, se resumen en la **Tabla 11**. Como se deduce de estos resultados el extracto derivado del apiario El Búho presenta la mayor concentración de fenoles y flavonoides totales. En contraste el extracto etanólico del propóleo de Acuexcomatl presentó las concentraciones más bajas. Sin embargo, los valores cumplen con las normas de calidad tomadas como referencia.

Tabla 11. Contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos de los propóleos colectados.

<i>Muestra</i>	<i>Fenoles totales</i> ($\text{mg}_{\text{ác.gálico}}/\text{g}_{\text{mta.}} \pm \text{DE}$)	<i>Flavonoides totales</i> ($\text{mg}_{\text{quercetina}}/\text{g}_{\text{mta.}} \pm \text{DE}$)
Búho	115.04 \pm 0.14	43.64 \pm 0.08
Don Nico	83.69 \pm 0.03	43.09 \pm 0.05
Trojes	60.19 \pm 0.01	23.08 \pm 0.04
Valentín	69.55 \pm 0.07	17.40 \pm 0.05
Acuexcomatl	44.53 \pm 0.04	16.65 \pm 0.01

La capacidad antioxidante mostrada por los extractos en los ensayos de DPPH y ABTS se encuentra en los intervalos de 62-78 mM_{Trolox}/g_{mta} y 184-450 mM_{Trolox}/g_{mta}, respectivamente (**Tabla 12**). Las diferencias obtenidas en el ensayo de DPPH para los diferentes extractos, no resultan tan evidentes como las observadas en el ensayo de ABTS. Estos resultados indican que los extractos de los propóleos de los apiarios Búho, Don Nico y Acuexcomatl poseen la mejor habilidad para neutralizar al radical ABTS^{•+} (336.78 mM_{Trolox}/g_{mta}, 450.94 mM_{Trolox}/g_{mta} y 344.83 mM_{Trolox}/g_{mta}, respectivamente), mientras que los propóleos de los apiarios Trojes y Valentín presentaron la menor capacidad de neutralización de estos radicales (184 mM_{Trolox}/g_{mta}).

Por otra parte, la capacidad de los extractos para reducir a hierro en el ensayo de FRAP se encuentra en un rango de 348 y 1258 mM_{ác.asc.}/g_{mta} (**Tabla 12**). Los resultados obtenidos indican que el extracto del propóleo recolectado en el apiario de Don Nico presentó la mejor habilidad reductora del Hierro (1258 mM_{ác.asc.}/g_{mta}).

Tabla 12. Actividad inhibidora de los extractos etanolicos de los propoleos en estudio frente a los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} y habilidad reductora por el ensayo de FRAP.

<i>Muestra</i>	<i>TEAC_{DPPH}</i> (mM _{Trolox} /g _{mta} . ± DE)	<i>TEAC_{ABTS}</i> (mM _{Trolox} /g _{mta} . ± DE)	<i>AEAC_{FRAP}</i> (mM _{ác.asc.} /g _{mta} . ± DE)
Búho	78.33 ± 0.003	336.78 ± 0.032	680.22 ± 0.040
Don Nico	76.54 ± 0.001	450.94 ± 0.039	1258.56 ± 0.037
Trojes	77.94 ± 0.001	184.00 ± 0.016	460.22 ± 0.082
Valentín	77.01 ± 0.003	184.72 ± 0.038	560.22 ± 0.090
Acuexcomatl	62.21 ± 0.008	344.83 ± 0.017	348.83 ± 0.029

5.3 Cuantificación por HPLC del flavonoide pinocembrina (1).

Considerando que la pinocembrina (**1**) es el metabolito secundario aislado en mayor abundancia en el extracto estudiado. Se decidió cuantificar a la pinocembrina (**1**) en las cinco muestras de propóleos recolectados en la zona melífera del Altiplano de México, además de que esta flavona se considera como un marcador de los propóleos poplares. Esta cuantificación se realizó a partir de los extractos etanólicos de cada uno de los propóleos recolectados. Como estándar de trabajo, se utilizó la pinocembrina (**1**) aislada y caracterizada en este estudio.

La identificación de la presencia de la pinocembrina (**1**) en los extractos se realizó mediante la comparación del tiempo de retención y la absorbancia presentada por la pinocembrina (**1**) con las señales presentes en los cromatogramas obtenidos con los extractos.

Utilizando un sistema de elución MeOH-(H₂O:TFA al 0.1%) en proporción 55:45, la pinocembrina (**1**) presentó un tiempo de retención de 9.0 minutos y una absorbancia de 290 nm. Por su parte, la pinocembrina (**1**) presente en el extracto de los propóleos Acuexcomatl, Búho y Trojes registró un tiempo de retención de 8.7 minutos.

Por otro lado, con el sistema MeOH-ACN-(H₂O:TFA al 0.1%) en proporción 3:2:5 la pinocembrina (**1**) presentó un tiempo de retención de 18.9 minutos y en el extracto de los propóleos de Valentín y Don Nico un tiempo de retención de 19.2 minutos. En la **Figuras 17A a 17D** se ilustran los cromatogramas obtenidos durante la determinación de la presencia de pinocembrina (**1**) presente en los extractos para cada sistema utilizado.

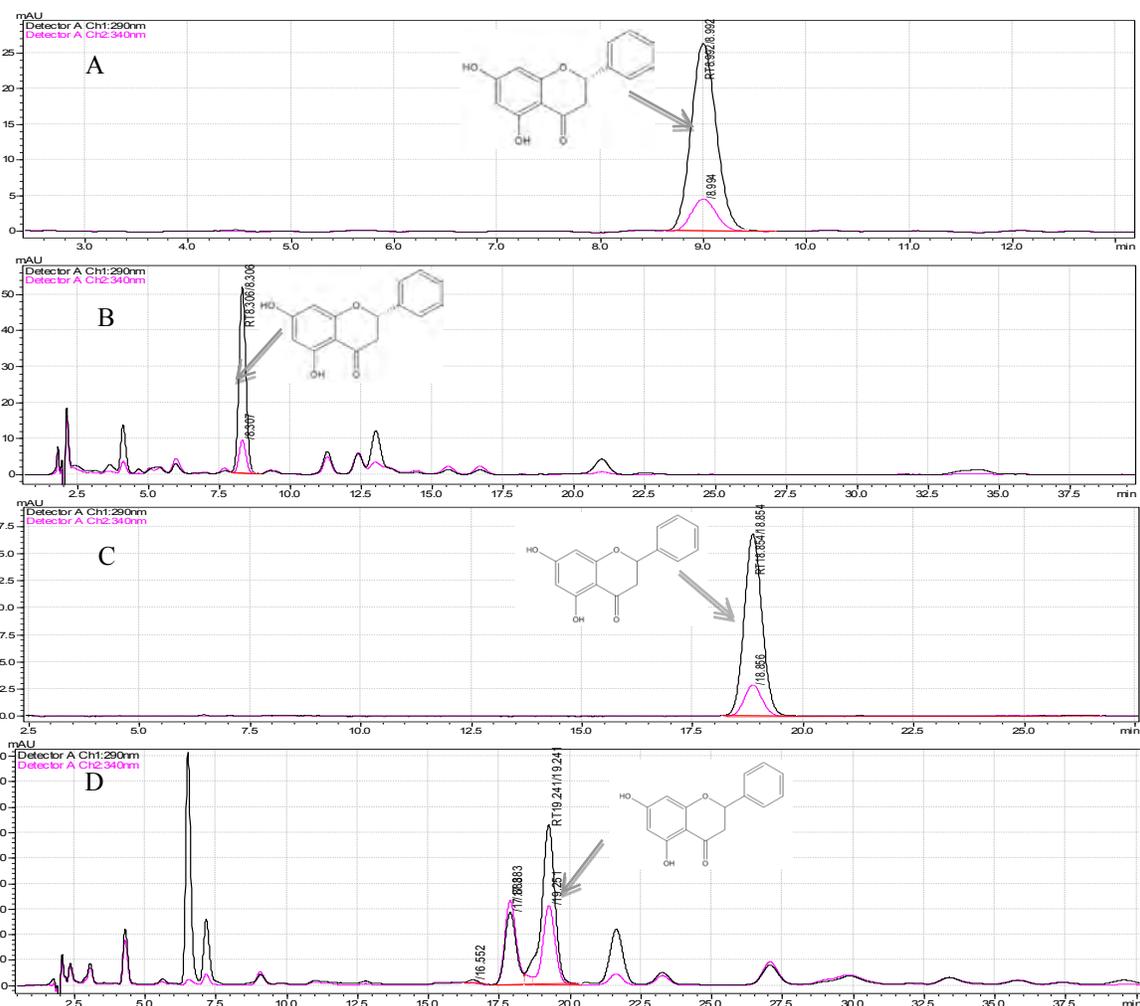


Figura 17. Identificación por HPLC de pinocembrina en los extractos etanólicos. **A.** Cromatograma obtenido con una solución etanólica de 10 $\mu\text{g/mL}$ de pinocembrina utilizando como fase móvil $\text{MeOH}-(\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$ al 0.1%). **B.** Perfil cromatográfico del extracto etanólico del propóleo de Acuexccomatl utilizando como fase móvil $\text{MeOH}-(\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$ al 0.1%). **C.** Cromatograma obtenido con una solución etanólica de 10 $\mu\text{g/mL}$ de pinocembrina utilizando como fase móvil $\text{MeOH}-\text{ACN}-(\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$ al 0.1%) en proporción 55:45. **D.** Perfil cromatográfico del extracto etanólico del propóleo de Valentin. utilizando como fase móvil $\text{MeOH}-(\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$ al 0.1%) en proporción 30:20:50.

Una vez realizada la identificación de la pinocembrina (**1**) en los diferentes extractos, se procedió a cuantificar su contenido en las matrices seleccionadas. Para ello, se realizó una curva de calibración con seis niveles de concentración (5, 10, 25, 50, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$) en dos sistemas de elución diferentes. Los resultados obtenidos para este ensayo de valoración se resumen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Ecuaciones de las curvas de calibración de pinocembrina realizadas para los dos sistemas cromatográficos.

<i>Fase móvil</i>	<i>Ecuación de la recta</i>	<i>Coefficiente de correlación (R²)</i>
MeOH-(H ₂ O:TFA al 0.1%)	A = 67.619*C _{pinocembrina} 97.348	0.9944
MeOH-ACN-(H ₂ O:TFA al 0.1%)	A = 67.162*C _{pinocembrina} 94.689	0.9944

Como se observa en la **Tabla 14** el mayor contenido de pinocembrina se concentra en la muestra del apiario Búho, mientras que el menor contenido del flavonoide se encontró en el propóleo de Trojes. Cabe señalar que el contenido de pinocembrina (**1**) en el extracto del propóleo Don Nico no pudo cuantificarse debido a la escasa resolución del pico correspondiente. Los cromatogramas obtenidos para cada matriz se ilustran en la **Figura 18**.

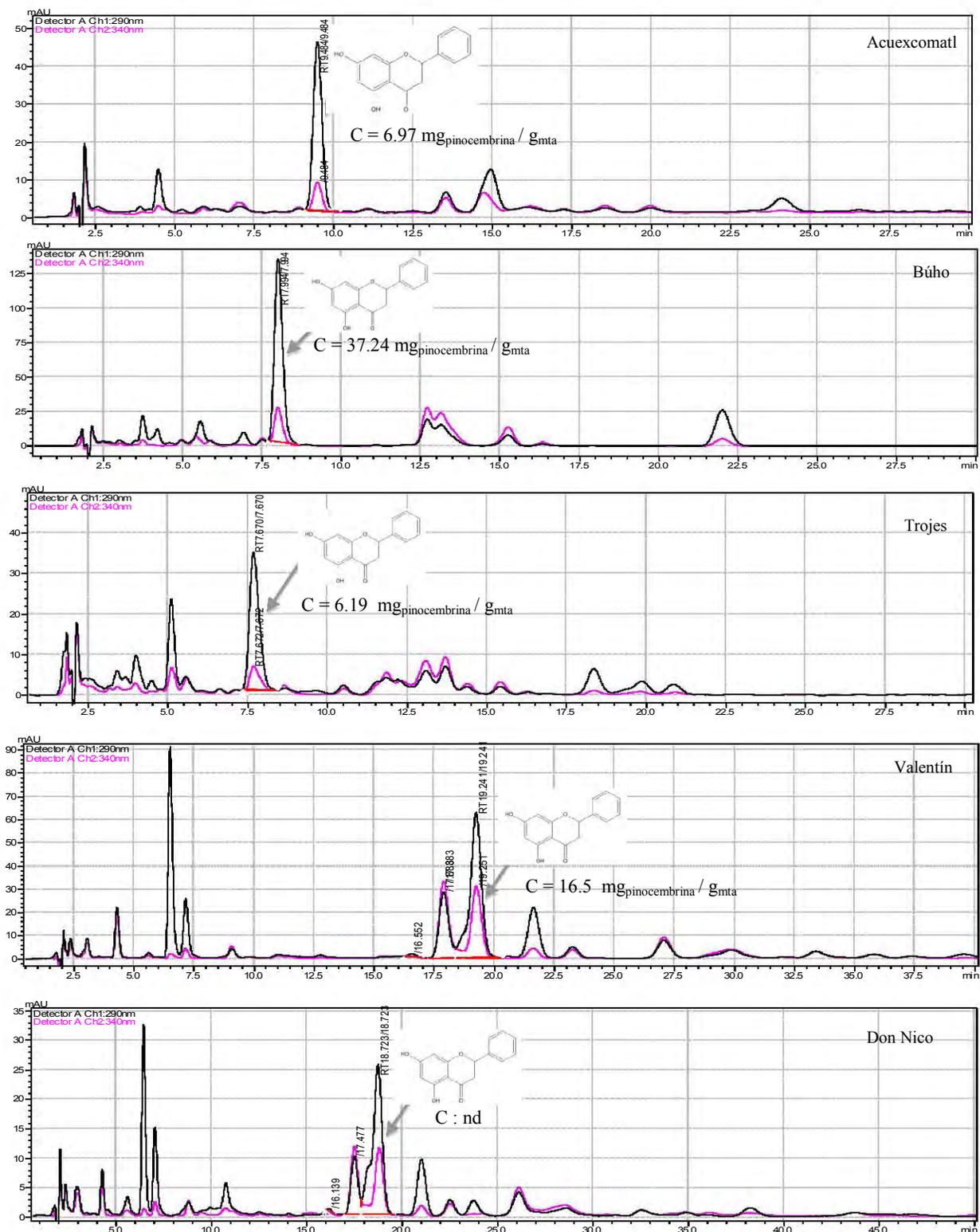
Tabla 14. Contenido de pinocembrina en los extractos.

<i>Extracto etanólico</i>	<i>Contenido de pinocembrina (mg_{pinocembrina}/g_{mta} ± DE)</i>
Búho	37.24 ± 4.3
Valentín	16.5 ± 1.9
Trojes	6.19 ± 3.2
Don Nico	ND
Acuexcomatl	6.97 ± 4.2

ND: no determinado

El contenido de pinocembrina (**1**) en los extractos es congruente con la actividad antibacteriana presentada por los mismos, ya que estudios previos han demostrado que la pinocembrina (**1**) posee la mayor potencia antibacteriana con respecto a otros flavonoides. Con base a ello, el propóleo de Búho que posee el mayor contenido de pinocembrina (**1**) también presenta la mejor actividad antibacteriana. Sin embargo, la actividad antibacteriana mostrada por el propóleo de Acuexcomatl, puede ser debido a un efecto sinérgico de los compuestos presentes en el mismo.

Figura 18. Perfiles cromatográficos obtenidos para los extractos etanólicos de los propóleos evaluados a una concentración de 2.0 mg/mL



5.4 Análisis de la composición de volátiles.

Con el objetivo de determinar la composición de los compuestos volátiles presentes en las muestras recolectadas se realizó el análisis independiente de cada una de las muestras utilizando la técnica acoplada de HS-SPME-CG-EM-TOF. Como primer paso de este análisis se determinaron las condiciones óptimas de análisis, mismas que se obtuvieron variando el tiempo de exposición de las fibras, la agitación, la temperatura de extracción y el tipo de fibra utilizada. Las fibras utilizadas fueron la DVB/CAR/PDMS, DVB/PDMS y PDMS. La selección de la fibra con la mejor capacidad de adsorción se determinó utilizando el coeficiente de concentración (F_{ij}) para cada fibra.

Utilizando las áreas totales obtenidas para cada fibra se calculó el índice de capacidad de concentración (F_{ij}) para las fibras utilizadas. La fibra de DVB/CAR/PDMS presentó el mayor F_{ij} con respecto a las otras dos fibras probadas. Los valores obtenidos de F_{ij} se resumen en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Valores del índice de capacidad de concentración F_{ij} del propóleo colectado en el apiario Acuexcomatl para las tres fibras empleadas.

<i>Composición</i>	<i>Acrónimo</i>	<i>Color de fibra</i>	<i>Superficie (μm)</i>	F_{ij}
Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano	DVB / CAR/PDMS	Gris	50/30	8.7
Divinilbencen- polidimetilsiloxano	DVB/PDMS	Negra	75	5.7
Polidimetilsiloxano	PDMS	Roja	100	3.6

En la **Figura 19** se ilustran los cromatogramas iónicos totales y en la **Tabla 16** los componentes volátiles obtenidos utilizando las tres fibras diferentes para el propóleo colectado en Acuexcomatl.

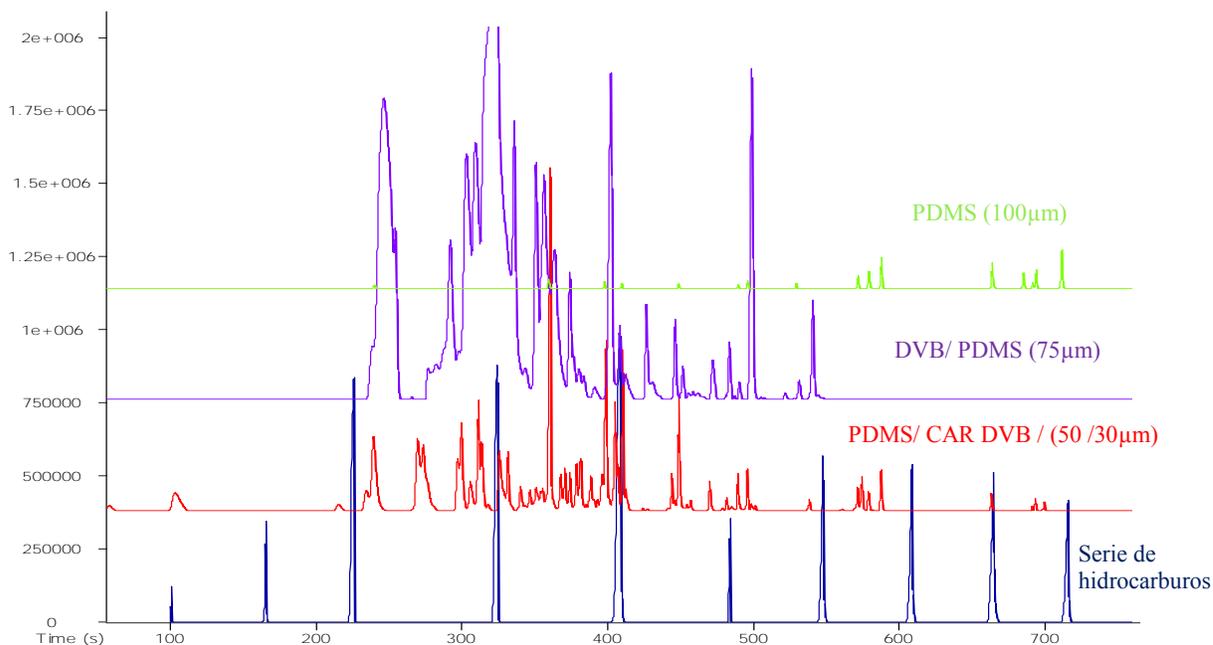


Figura 19. Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en el propóleo colectado en el apiario Acuexcomatl obtenido por la técnica HS-SPME-CG-EM-TOF utilizando tres fibras diferentes.

Tabla 16. Compuestos volátiles obtenidos para las 3 fibras empleadas en el propóleo “Acuexcomatl”.

<i>Fibra</i>	<i>Nombre del compuesto</i>	<i>Área</i>
PDMS (100µm)	α-pineno	1018257
	β-pineno	571224
	Alcanfor	1005526
	(R)- 4-metil-1-(1-metiletil)-3-Ciclohexen-1-ol	496373
	Acetato de bornilo	415457
	[1S-(1α,3α,4α,8α)]-decahidro-4,8,8-trimetil-9-metileno-	261149
	1,4-Metanoazuleno	989696
	1,2,3,4-tetraidro-1,1,6-trimetil- Naftaleno	736712
	4-Heptin-3-ol	

Tabla 16. Compuestos volátiles obtenidos para las tres fibras empleadas en el propóleo colectado en el apiario Acuexcomatl (Continuación).

Fibra	Nombre del compuesto	Área
DVB/CAR/PDMS (50/30)	Heptanal	25577920
	α -Tujeno	6348425
	α -Pino	23377514
	Benzaldehído	15541415
	<i>m</i> -Cimeno	22974539
	Sabeno	22556670
	E,E-2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	6411251
	3-Careno	13117753
	Octanal	13007609
	α -Terpineno	5857455
	<i>o</i> -Cimeno	12316513
	2-Etil-1-hexanol	606428
	α -felandreno	7863700
	cis- α -Terpineol	3156630
	Terpinoleno	1189452
	Dehidro- <i>p</i> -Cimeno	2680941
	Nonanal	38780087
	feniletil Alcohol	3554235
	β -pino	3888560
	L-trans-Pinocarveol	4484474
	Alcanfor	9719501
	6,6-dimetil-2-metilen- Biciclo[2.2.1]heptan-3-ona	3067017
	2-Metoxi-1-propanol	4231258
	4-Terpinenol	17895646
	<i>p</i> -Cimen-8-ol	10231040
	5-Metilguaiacol	707647
	<i>p</i> -menth-1-en-8-ol	4416175
	Decanal	12488423
	cis-Verbenona	2733313
	O-Metiltimol	652604
L- acetato de bornilo	2843341	

Tabla 16. Compuestos volátiles obtenidos para las 3 fibras empleadas en el propóleo “Acuexcomatl” (Continuación).

<i>Fibra</i>	<i>Nombre del compuesto</i>	<i>Área</i>
DVB/CAR/PDMS (50/30)	Etil nonanoato	17481523
	2,6,10,10-Tetrametil-1-oxa-spiro[4.5]dec-6-ena	2555373
	Cadina-1,4-dieno	3207703
	Acetato de terpinilo	3207703
	Germacreno D	1454301
	Etil decanoato	2520469
	Aromadendreno	4747202
	L-calameneno	849663
	4-propil-1,6-Heptadien-4-ol	540037
	Epicedrol	3597873
	1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro- $\alpha,\alpha,3,8$ -tetrametil-5-Azulenemetanol,	1850774
	α -Eudesmol	3839776
	Eicosano	2287469
Etil pentadecanoato	895241	
Isopropil Palmitato	1910441	
DVB /PDMS (75μm)	α -Pino	1014022
	β -Pino	837627
	α -Terpino	903719
	<i>o</i> -Cimeno	2293316
	β -cis-Ocimeno	4386542
	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	4386211
	Terpinen-4-ol	1395187
	Anisol	2736287
	Formiato de Geranilo	4032451
	Cipereno	7466458
	(-)- β -Bourboneno	4708090
	Calareno	4885495
	Germacreno D	2508127

La identificación de los compuestos se realizó en primera instancia mediante la comparación de sus espectros de masas experimentales con los que se encuentran descritos en la base de datos NIST 2.0. A manera de ejemplo se ilustra en la **Figuras 20 (A y B)** los espectros de masas de la base de datos NIST 2.0 y los obtenidos para el α -pineno y el 3-careno. Como se observa, los espectros de masas de ambos compuestos presentan un patrón de fragmentación similar, lo cual no permite la adecuada identificación de los componentes utilizando el tiempo de retención y el patrón de fragmentación. Como paso siguiente, se decidió implementar la metodología de Kovats para realizar la identificación de los compuestos utilizando sus índices de retención para identificar sin ambigüedad compuestos isoméricos.

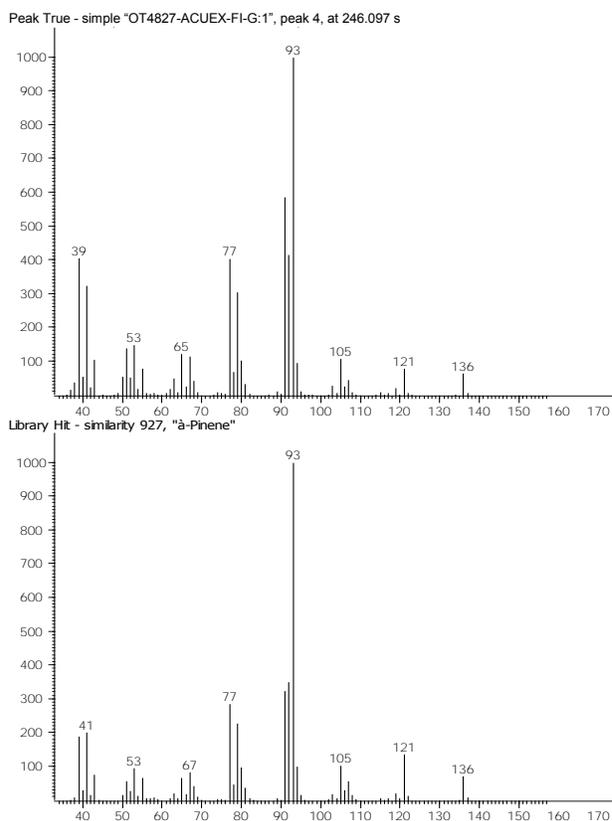


Figura 20A. En la parte superior se ilustra el espectro de masas experimental y en la parte inferior el espectro control para el α -pineno.

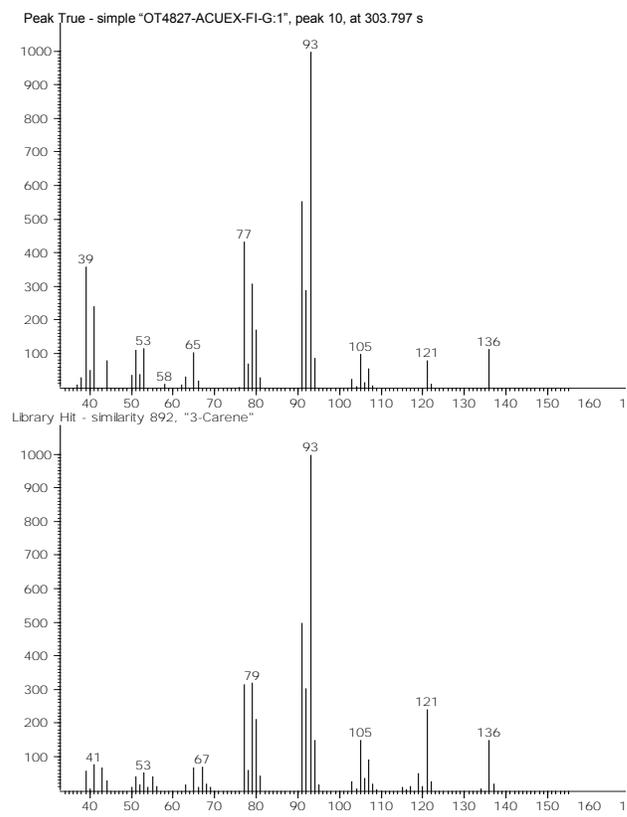


Figura 20B. En la parte superior se ilustra el espectro de masas experimental y en la parte inferior el espectro control para el 3-careno.

Para utilizar la metodología de Kovats en primer lugar se inyectó una serie de estándares de *n*-alcanos (C₈-C₂₄), de tal forma que la separación de los compuestos se realizó con base en el número de átomos de carbono que contienen cada uno de ellos y al tiempo de retención de cada componente. Enseguida, se inyectaron cada una de las muestras en las mismas condiciones de separación utilizadas para la mezcla de alcanos y posteriormente, se realizó el cálculo de los índices de retención (Kovats) utilizando el algoritmo disponible en el programa ChromaTOF LECO 3.34. Por último, se compararon los índices de Kovats obtenidos experimentalmente con aquellos almacenados en las bases de datos electrónicas (NIST) y descritos por Adams (2007). En la **Figura 21** se ilustra la sobreposición de los cromatogramas obtenidos para la serie de alcanos y la muestra de propóleo de Acuexcomatl.

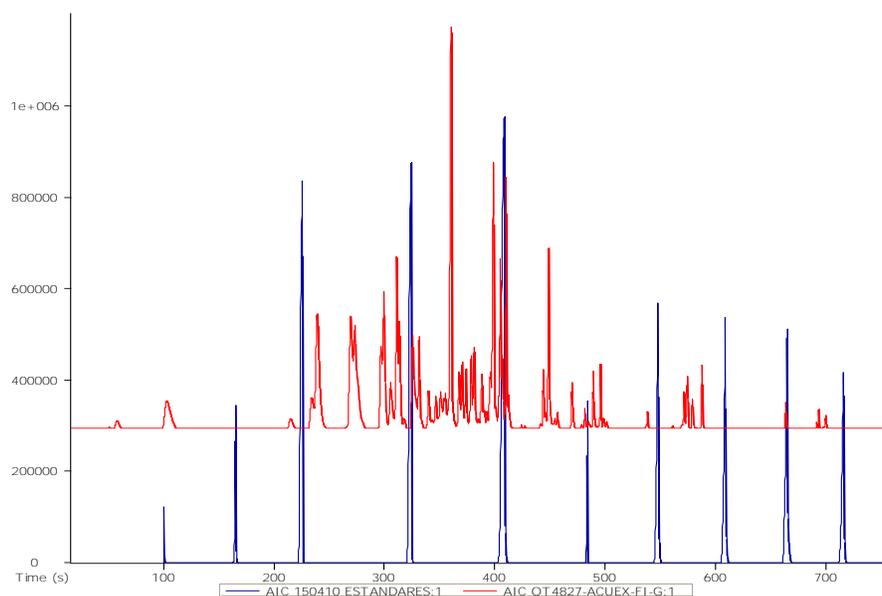


Figura 21. Comparación del cromatograma iónico total de los estándares empleados (color azul) con el cromatograma iónico total obtenido de la muestra del propóleo proveniente del apiario Acuexcomatl (color rojo) para la obtención de los índices de Kovats.

Una vez establecidas las mejores condiciones de trabajo, una porción de cada propóleo recolectado en los diferentes apiarios (Acuexcomatl, Ecosur, Choy, Don Nico y Valentín) ubicados dentro de la zona rural del Distrito Federal fueron analizadas independientemente y por triplicado.

El análisis del propóleo del apiario Acuexcomatl, permitió la detección de cuarenta y cuatro compuestos volátiles, entre los cuales se destacan como componentes mayoritarios al α -pineno, el 4-terpineol, el (1 α ,2 α ,5 α)-2-metil-5-(1-metiletil)-biciclo [3.1.0]hex-3-en-2-ol, el 3-careno, al limoneno, el β -pineno y el *p*-menta-2,4(8)-dieno.

En el propóleo recolectado en el apiario Búho se identificaron ochenta compuestos, entre los que se destacan como compuestos más afines a la fibra el α -dimetiletilbenceno, al β -pineno, al *o*-cimeno, al β -felandreno, el benzaldehído, al D-limoneno y a la 6-metil-5-Hepten-2-ona, por tan sólo mencionar algunos.

Por otra parte, el análisis de volátiles del propóleo obtenido del apiario Don Nico permitió la identificación de cincuenta y ocho compuestos, entre los que se destacan como compuestos más afines a la fibra el *o*-cimeno, el D-limoneno, el β -felandreno, el α -dimetiletilbenceno, el β -pineno, el benzaldehído, el α -terpineol y el linalol.

En el propóleo proveniente del apiario Valentín, se identificaron cuarenta y seis compuestos de los cuales el α y β -pineno, el *p*-menten-8-ol, el *m*-menta-6,8-dieno, el camfor y el 1-(2-hidroxifenil)-etanona, se encuentran en mayor proporción en comparación con el resto.

Finalmente, en el propóleo colectado en el apiario Trojes se identificaron veintisiete compuestos, destacándose la 6-metil-5-hepten-2-ona, al citronelol, al octanal, el 2,4-octadienal, la *trans*-geranilacetona y el α -copaeno.

Al sobreponer el cromatograma iónico total de cada uno de los propóleos estudiados es posible observar que la composición de estos es

muy similar (**Figura 22**), ya que los cromatogramas obtenidos presentan múltiples coincidencias como puede observarse en la **Tabla 17** en la que se comparan los compuestos presentes en cada caso.

Es importante destacar que los terpenos α y β -pineno se encuentran presentes en mayor proporción en cuatro de las cinco muestras analizadas. Estos compuestos han sido previamente reportados en los compuestos volátiles de diversos propóleos provenientes de Europa y de climas tropicales (Melliou, 2007). Por otra parte el octanal, el nonanal, el decanal y el α -copaeno son compuestos que coinciden en la composición de al menos cuatro de los propóleos analizados, mientras que el 4-terpinol fue el único compuesto que está presente en los cinco propóleos.

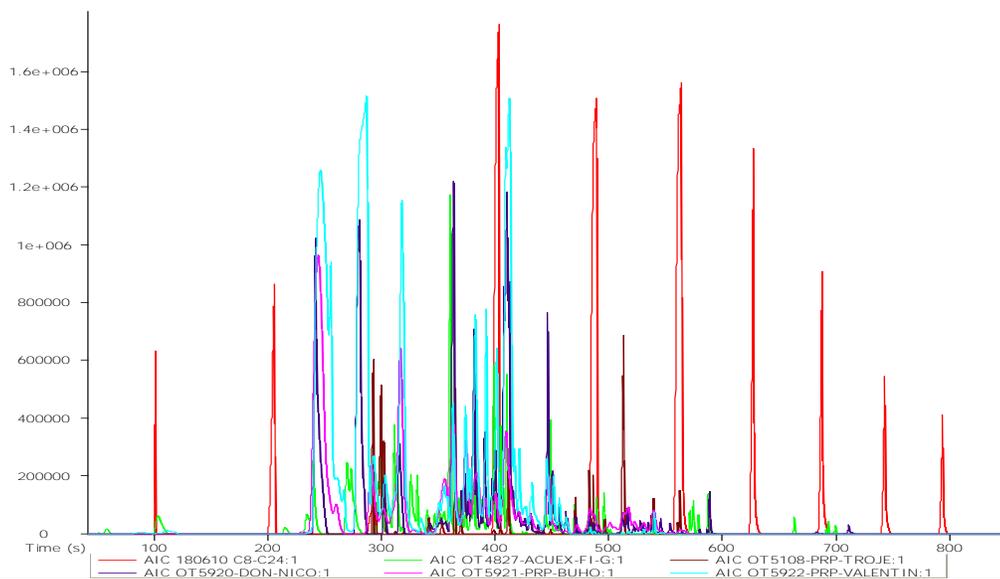


Figura 22. Comparación de los cromatogramas iónicos totales de los propóleos estudiados.

Los resultados muestran que existe una gran similitud entre las diversas muestras de propóleo provenientes de la zona del altiplano y que los compuestos que predominan en las muestras analizadas son los terpenoides. Estos resultados son similares a los reportados previamente en la literatura por Melliou (2007) para propóleos poplares.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas.

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Don Nico	Búho	Acuexcomatl	^b R _{It}	^a R _{I_e}	^c Método de identificación
		27	46	58	80	44			
% Área									
1	Metilbenceno		0.01				787.4	787.94	IR/EM
2	hexanal		0.06		0.16		804	804.97	IR/EM
3	cara-2,4-dieno					0.08	900	891.66	IR/EM
4	Heptanal				0.28		901	902.66	IR/EM
5	1,7,7-trimetil-triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano					0.26	930.3	929.14	IR/EM
6	2-metil-5-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hex-2-eno,					1.44	935	936.98	IR/EM
7	α-pineno		20.84	8.05	3.74	35.23	944	945.49	IR/EM
8	Camfeno		0.13			1.77	953	956.48	IR/EM
9	Artemiseol					0.71	970	962.4	IR/EM
10	Benzaldehído				6.02		978	977.13	IR/EM
11	α-dimetiletilbenceno				5.16		979.6	979.1	IR/EM
12	<u>Verbeneno</u>					1.83	980	979.2	IR/EM
13	β-pineno		27.95	12.18	5.16	2.13	981	982.09	IR/EM
14	2,6,10,10-tetrametil-1-Oxaspiro[4.5]deca-3,6-dieno			12.13			--	984.48	EM
15	6-metil-5-Hepten-2-ona,	21.40			3.73		994	996.52	IR/EM
16	1,2,3-trimetil-Benceno				4.14		996	998.72	IR/EM
17	2,2,5-trimetil-Hexano				0.02		--	1006.7	EM
18	ácido etil éster Hexanoico			0.04			1005	1008.1	IR/EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b R _{It}	^a R _{I_e}	^c Método de identificación
		% área							
19	<i>m</i> -cimeno				1.71		1012	1009.5	IR/EM
20	3-Careno		0.80		2.23	8.77	1013	1013.6	IR/EM
21	Octanal	14.27		1.27	1.71	8.77	1014	1014.3	IR/EM
22	3-Nonin-2-ol		0.39				1021	1016.7	IR/EM
23	<i>m</i> -Menta-6,8-dieno		3.85			1.88	1027	1026	IR/EM
24	<i>p</i> -cimeno		1.11	0.29	0.91		1029	1028.3	IR/EM
25	<i>o</i> -Cimeno	0.49			5.45	3.90	1033	1032.8	IR/EM
26	D-Limoneno			2.51	5.34	3.10	1039	1038.9	IR/EM
27	β-felandreno				5.34		1044	1042.4	IR/EM
28	3-metil-6-(1-metiletil)-, (1á,2á,3á,6á)-1,2-Ciclohexanediol				5.34		--	1043.3	EM
29	2-Etilhexan-1-ol	0.03					1045	1046.1	IR/EM
30	cis-β-Ocimeno					0.18	1048	1051.7	IR/EM
31	Butilbenceno		0.01	0.03		0.06	1055.9	1056.7	IR/EM
32	3,3,6-trimetil-1,5-Heptadieno				0.19		--	1069	EM
33	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno		0.15		0.19	2.06	1077	1074.2	IR/EM
34	Linalool oxido	1.68		0.97	0.20		1087	1087.1	IR/EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b RI _t	^a RI _e	^c Método de identificación
		% área							
35	cis-4-Tujanol					0.70	1093	1092.3	IR/EM
36	1-Octanol			0.11			1094	1097.8	IR/EM
37	α- Terpinolen		0.28		0.16	0.80	1098	1100.6	IR/EM
38	Fenchona		0.28	0.28			1100	1104.3	IR/EM
39	2,6,6-trimetil-2-Ciclohexen-1-carboxaldehído					0.36	1103	1107.3	IR/EM
40	o-Guayacol	1.30					1106	1108	IR/EM
41	Nonanal	1.30			2.05		1108	1108.3	IR/EM
42	2-Metil-5-propionilfurano				2.05	1.24	1109	1110.6	IR/EM
43	trans-Verbenol		0.56		1.54		1114	1114	IR/EM
44	linalol				2.73		1122	1123.9	IR/EM
45	cis-4-Isopropil-1-metil-2-ciclohexen-1-ol					0.44	1121	1124.8	IR/EM
46	Nonanal		0.81	12.51	2.40	0.44	1128	1127.5	IR/EM
47	4,5-dimethyl-1-Hexene			6.32			--	1126.9	EM
48	6-Metil-3,5-heptadien-2-ona			6.21	2.42		--	1127.7	IR/EM
49	3-Metil-3-butenil isovalerato	6.13					1123	1129.4	IR/EM
50	2,4-octadienal	7.01					1125	1129.9	IR/EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojés	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b RI _t	^a RI _e	^c Método de identificación
		% área							
51	1-Acetilciclohexen oxido	0.25					--	1131	EM
52	ácido Pentanoico			0.59			--	1138.7	EM
53	feniletil Alcohol	0.71					1140	1139.1	IR/EM
54	exo-Fenchol			0.47			1122	1140.2	IR/EM
55	Allo-Ocimeno		0.77	0.58	1.34		1142	1144.9	IR/EM
56	cis-verbenol				1.34		1144	1145.7	IR/EM
57	tuj-4(10)-en-3-ol					0.77	1146	1147.4	IR/EM
58	L-trans-Pinocarveol		2.08	2.39	0.77		1157	1159.9	IR/EM
59	(1R)-(+)-Nopinona		2.28				1158	1161.2	IR/EM
60	R-pinocamfona					1.19	1162	1162.8	IR/EM
61	camfor		2.18		1.05		1163	1163.8	IR/EM
62	cis-crisanteol					0.82	1164	1166	IR/EM
63	Bencil isopentil eter				1.05		--	1167.3	EM
64	3-Metilcamfenilol			0.10			1169	1171.6	IR/EM
65	2,6-Dimetil-3,7-octadien-2,6-diol					0.16	1173	1173.7	IR/EM
66	cis-3-Pinanona		1.03	2.20	0.61	0.19	1176	1176.1	IR/EM
67	Pinocarvona		1.03	1.02	0.59		1177	1177.9	IR/EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b RI _t	^a RI _e	^c Método de identificación
		% área							
68	p-Cimen-8-ol			0.06	0.59	0.19	1183	1180.3	IR/EM
69	1-metil-1,4-Ciclohexadieno				0.44	0.09	1186	1188.4	IR/EM
70	borneol		1.24	1.31	0.44		1191	1190	IR/EM
71	2-Isopropenil-5-metilhex-4-enal				0.70		--	1193.7	EM
72	4-Terpinenol	0.56	1.24	1.83	0.70	9.30	1194	1195.5	IR/EM
73	Mirtenol		6.81	3.87		0.90	1196	1197.2	IR/EM
74	p-Cimen-8-ol				0.04		1198	1201.9	IR/EM
75	Creosol	0.54					1207	1204	IR/EM
76	3-(1-metil-2-propenil)-1,5-Ciclooctadieno			0.04			--	1205.9	EM
77	1,8- <i>p</i> -mentenol		6.87		1.35		1201	1205.9	IR/EM
78	Mirtenal		2.18	3.07	1.35		1209	1210.9	IR/EM
79	1,2-Epoxiundecano					0.32	--	1211.5	EM
80	α-terpineol			10.14	2.99	1.49	1210	1214.8	IR/EM
81	Verbenona		0.39	0.56	0.65	1.49	1214	1215.3	IR/EM
82	Citronelol	15.83					1228	1221.5	IR/EM
83	Decanal		2.31	1.92	0.98	0.34	1219	1221.9	IR/EM
84	3,3,5,5-Tetrametilciclopenteno				0.98		--	1222.7	EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Resultados y discusión

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b RI _t	^a RI _e	^c Método de identificación
85	1-(3-hidroxifenil)-Etanona		6.87				--	1225	EM
86	2-metil-cis-Ciclohexanol-acetato				0.61		--	1230.9	EM
87	Ácido nonanoico metil éster			0.02			1237	1237.3	IR/EM
88	cis-Carveol			0.15	0.54		1241	1240.1	IR/EM
89	1-(2,5-dimetilfenil)-Etanona		0.24				NE	1242.9	IR/EM
90	Anisol		0.24	0.15	0.18		1245	1246.3	IR/EM
91	ácido 2,3-bis(acetoxi)propil éster (Z,Z,Z)- 9,12,15-Octadecatrienoico		0.16				--	1252.4	EM
92	(-)-trans-Pinocarvil acetato			0.09			1297	1254	IR/EM
93	2-metoxi-4-metil-1-(1-metiletil)-Benceno					0.60	1245	1257.1	IR/EM
94	Metil veratrol		0.16				1230	1257.9	IR/EM
95	Cumaldehído				0.46		1256	1262	IR/EM
96	Carvona		0.46		0.46		1254	1262.8	IR/EM
97	1,5-Decadino		0.46	0.25			--	1266.5	EM
98	<i>p</i> -1,3-mentenona		0.46				1270	1275.6	IR/EM
99	2,5,5-Trimethyl-3-hexyn-2-ol	0.21					NE	1278.9	IR/EM
100	(Z)-2-Decenal			0.06			1279	1280.2	IR/EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b RI _t	^a RI _e	^c Método de identificación
		% área							
101	<i>p</i> -Etilguayacol	0.34	0.51				1288	1291.2	IR/EM
102	Perillal		1.02				1294	1298	IR/EM
103	bornil acetato		0.51	1.84	0.39		1296	1299.4	IR/EM
104	Geraniol formiato					0.61	1301	1302.7	IR/EM
105	2-metil- Undecanal	0.30					1306	1306.1	IR/EM
106	3-Etenilheptan-2,6-diona				0.42		--	1308.4	EM
107	2-metil-3-(1-metiletil)-Ciclopentanona		0.40				--	1309.2	EM
108	ácido etil ester Nonanoico			1.07	0.42		1320	1309.3	IR/EM
109	Timol				0.03		1290	1320.2	IR/EM
110	metil ester (Z,Z,Z)-8,11,14-Eicosatrienoico acido			0.21			--	1323	EM
111	(S)-(-)-(4-Isopropenil-1-ciclohexenil)metanol		0.24				--	1323.9	EM
112	ácido Acético butoxihidroxi-butil éster					0.83	1331	1335.7	IR/EM
113	(-)-Mirtenil acetato			0.36			--	1337	EM
114	ácido Tridecanoico metil ester				0.12		1335	1337.1	IR/EM
115	α -Cubebeno		0.06	0.18	0.61	0.18	1355	1358	IR/EM
116	α -Longipineno				0.30	2.35	1358	1362.3	IR/EM
117	b-elemento				0.18		1375	1376	IR/EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b R _{It}	^a R _{I_e}	^c Método de identificación
		% área							
118	(+)-Cicloisovativeno						1378	1379.7	IR/EM
119	α-Copaeno	3.10	0.17	0.25	0.62	0.24	1383	1385.1	IR/EM
120	Cariofileno	1.88			0.18		1395	1392.9	IR/EM
121	(-)-β-Bourboneno		0.11	0.22	0.22		1393	1393.5	IR/EM
122	etil ester decanoico acido,			0.11	0.05		1398	1403.9	IR/EM
123	Tetradecano				0.02		--	1407.4	EM
124	Dodecanal	0.67					1420	1419.2	IR/EM
125	Longifoleno				1.02	1.46	1421	1422.1	IR/EM
126	germacreno D				0.12		1450	1441.4	IR/EM
127	Geranil acetona	16.63		0.43	0.31		1461	1461	IR/EM
128	1-(2,4,5-trietilfenil)-Etanona				0.32		--	1466.3	EM
129	γ-Muroleno			0.10	0.29		1486	1487.6	IR/EM
130	α-Selineno			0.20	0.26		1501	1503.4	IR/EM
131	[1S-(1α,4β,7α)]-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metileténil)-Azuleno			0.09			--	1509.7	EM
132	α-Murolene	0.68	0.11		0.22	0.11	1503	1510.2	IR/EM
133	δ-Cadineno	0.94			0.62		1530	1531	IR/EM
134	5-Metil-2-fenil-2-hexenal	1.47					1535	1534.5	IR/EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

Tabla 17. Comparación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de propóleos analizadas (Continuación).

#	Compuestos identificados	Trojes	Valentín	Nico	Búho	Acuexcomatl	^b RI _t	^a RI _e	^c Método de identificación
135	Calameneno		0.16	0.20	0.62	0.21	1532	1535.1	IR/EM
136	Triciclo[4.4.0.0(2,7)]dec-8-ene-3-metanol, $\alpha,\alpha,6,8$ -tetrametil-, estereoisomer			0.21			--	1550.9	EM
137	Calacoreno	0.35			0.02		1546	1553.8	IR/EM
138	Nerolidol			0.19			1574	1573.4	IR/EM
139	oxido Cariofileno	1.95					1588	1591	IR/EM
140	trans-Z- α -Bisaboleno epoxido				0.41		--	1596.3	IR/EM
141	Decanoico acido, etil ester			0.03	0.41		1405	1603	IR/EM
142	8-(2-Acetiloxiran-2-il)-6,6-dimetilocta-3,4-dien-2-ona				0.11		--	1607.9	EM
143	1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro- $\alpha,\beta,3,8$ -tetramethyl-5-Azulenemethanol,			0.09			--	1650.6	EM
144	β -Selinol			0.41	0.29		1674	1677.9	IR/EM
145	Cadalenol				0.12		1680	1696.6	IR/EM
146	Butil ciclohexil ftalato			0.05	0.14		--	1985.3	EM

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos.

(a): Índice de retención experimental.

(b): Índice de retención teórico.

(c): EM= Espectrometría de masas y IR= Índice de retención.

--: no encontrado.

6 Conclusiones.

- ✓ El análisis químico del propóleo recolectado en el apiario Acuexcomatl permitió el aislamiento y la caracterización de los siguientes flavonoides: pinocembrina (**1**), acacetina (**2**), galangina (**4**), 4',7-dimetilnaringenina (**5**) y una mezcla de alpinetina (**3**) y pinobanksina 5-metileter (**6**) como sus principales componentes activos.
- ✓ La galangina (**4**) presentó la mayor actividad antioxidante y la pinocembrina (**1**) el mejor efecto de inhibición sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans*.
- ✓ El extracto etanólico del apiario Buhó posee el mayor contenido de pinocembrina (**1**) y la mejor actividad antibacteriana, estos resultados se encuentran en armonía con los resultados reportados en la literatura.
- ✓ Los cinco propóleos colectados cumplen con el contenido de fenoles y flavonoides totales establecidos en las normas de calidad emitidas por Argentina y Brasil. El método desarrollado por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar flavonoides, reveló que la pinocembrina es uno de los compuestos mayoritarios y su contenido podría ser de utilidad para propósitos de control de calidad.
- ✓ El análisis de los compuestos volátiles en las diferentes muestras permitió establecer que los terpenoides son sus principales constituyentes. Los perfiles cromatográficos obtenidos con la técnica HS-SPME-CG-EM-TOF, presentan gran similitud y representan una valiosa herramienta para identificar propóleos colectados en la zona poplar de México.

7 Perspectivas.

- ✓ Cuantificar el contenido de galangina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- ✓ Identificar y cuantificar los flavonoides mayoritarios presentes en los extractos etanólicos de diversas muestras de propóleos colectadas en las diversas regiones apícolas de México con la finalidad de estandarizar su contenido químico.
- ✓ Una vez estandarizados, evaluar su efecto sobre el crecimiento de otros patógenos de la cavidad oral como *P. gingivalis*.

8. Anexo 1

Figura A. Curvas de calibración utilizadas para la determinación de la capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales.

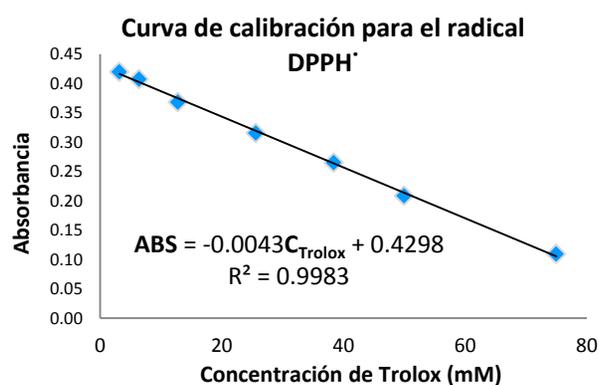


Gráfico 1. Curva de calibración para determinar la capacidad inhibitoria del radical DPPH'.

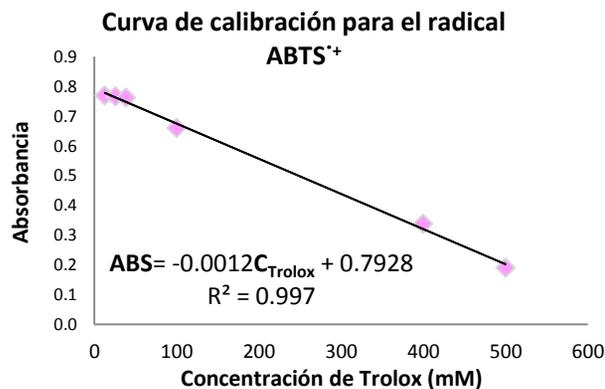


Gráfico 2. Curva de calibración para determinar la capacidad inhibitoria del radical catiónico ABTS^{•+}.

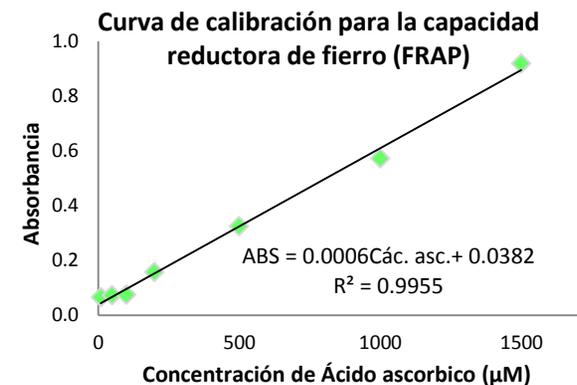


Gráfico 3. Curva de calibración para determinar la capacidad reductora de hierro (FRAP).

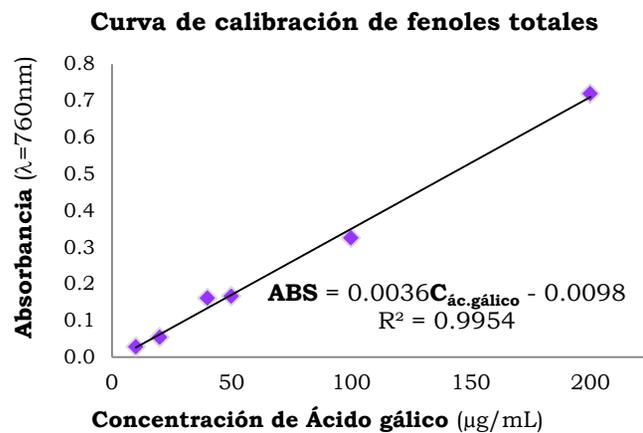


Gráfico 15. Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales de acuerdo al compuesto fenólico ácido gálico.

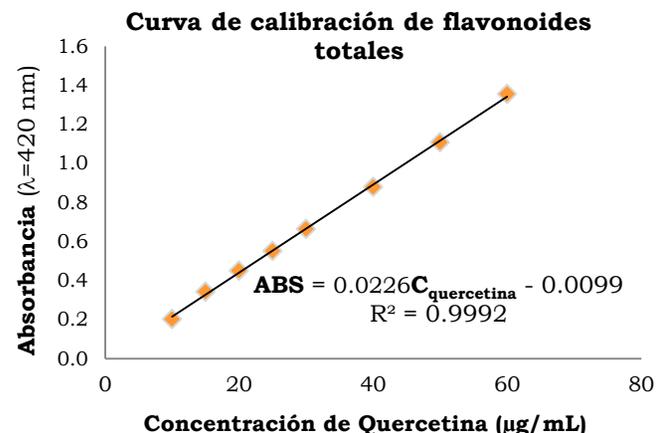


Gráfico 17. Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales de acuerdo al flavonoide quercetina.

Tabla A. Resumen de los valores obtenidos en la actividad antibacteriana y antioxidante para los cinco propóleos evaluados, así como para el fraccionamiento biodirigido del propóleo seleccionado.

		<i>Muestra</i>	<i>Fenoles totales</i> (mg _{ác.galico} /g _{mta} ± DE)	<i>Flavonoides totales</i> mg _{quercetina} /g _{mta} ± DE)	<i>TEAC_{DPPH}</i> (mM _{trolox.} /g _{mta} ± DE)	<i>TEAC_{ABTS}</i> (mM _{trolox.} /g _{mta} ± DE)	<i>AEAC_{FRAP}</i> (mM _{ác.asc.} /g _{mta} ± DE)	<i>CMI frente a S. mutans</i> (µg/mL)	<i>Peso (g)</i>
Extractos etanólico de los propóleos		Búho	115.04 ± 6.24	43.64 ± 0.08	78.326 ± 0.003	336.778 ± 0.03	680.222 ± 0.04	295	nd
		Don Nico	83.69 ± 4.83	43.09 ± 0.05	76.543 ± 0.001	450.944 ± 0.04	1258.556 ± 0.04	>1000	nd
		Trojes	60.19 ± 2.59	23.08 ± 0.04	77.938 ± 0.001	184.000 ± 0.02	460.222 ± 0.08	>1000	nd
		Valentín	69.55 ± 1.14	17.40 ± 0.05	77.008 ± 0.003	183.722 ± 0.04	560.222 ± 0.90	596	nd
		Acuexcomatl	44.53 ± 2.18	16.65 ± 0.01	62.202 ± 0.008	344.833 ± 0.02	348.833 ± 0.30	260	85.40
Fraccionamiento del propóleo "Acuexcomatl"	Primario	F-Hex	21.61 ± 0.08	5.98 ± 0.01	26.775 ± 0.003	247.750 ± 0.01	318.0 ± 0.12	1200	14.494
		F-AcOEt	57.74 ± 2.34	33.36 ± 0.02	76.000 ± 0.004	356.500 ± 0.03	1202.167 ± 0.01	275	61.260
		F-MeOH	72.12 ± 1.28	7.96 ± 0.02	70.729 ± 0.004	341.500 ± 0.05	1243.000 ± 0.04	1000	6.8290
	Secundario	F-A	96.74 ± 3.75	2.09 ± 0.03	57.008 ± 0.026	614.000 ± 0.01	87.444 ± 0.01	4.26	0.2173
		F-B	100.16 ± 5.36	1.53 ± 0.02	52.357 ± 0.002	610.111 ± 0.01	269.111 ± 0.02	6.92	0.1211
		F-C	138.88 ± 0.59	9.58 ± 0.02	32.667 ± 0.016	249.833 ± 0.02	258.000 ± 0.01	1022	0.8943
		F-D	55.05 ± 5.69	10.22 ± 0.02	17.705 ± 0.003	121.778 ± 0.01	233.000 ± 0.05	579.5	4.2739
		F-E	109.54 ± 5.21	21.46 ± 0.13	27.008 ± 0.005	130.111 ± 0.01	226.333 ± 0.01	255.6	2.5943
		F-F	109.38 ± 5.69	47.49 ± 0.07	48.093 ± 0.011	242.333 ± 0.02	184.111 ± 0.02	465.9	5.3855
		F-G	45.78 ± 1.81	9.05 ± 0.02	16.698 ± 0.003	0	28.000 ± 0.01	522.7	7.7569
		F-H	16.70 ± 1.28	2.46 ± 0.01	5.147 ± 0.006	13.444 ± 0.01	0	1227	8.6424

Nd: no determinado

Tabla A. Resumen de los valores obtenidos en la actividad antibacteriana y antioxidante para los cinco propóleos evaluados, así como para el fraccionamiento biodirigido del propóleo seleccionado (continuación).

		<i>Muestra</i>	<i>Fenoles totales</i>	<i>Flavonoides totales</i>	<i>TEAC_{DPPH}</i> (mM _{trolox.} /g <i>mta</i>)	<i>TEAC_{ABTS}</i> (mM _{trolox.} /g <i>mta</i>)	<i>AEAC_{FRAP}</i> (mM _{ác.asc.} /g <i>muestra</i>)	<i>CMI frente a S. mutans</i> (μ g/mL)	<i>Peso (g)</i>
Fraccionamiento del propóleo "Acuexcomatl"	Secundario	F-I	19.10 \pm 1.77	3.93 \pm 0.01	8.558 \pm 0.005	30.389 \pm 0.01	0	1113	4.830
		F-J	33.20 \pm 0.20	17.15 \pm 0.02	17.860 \pm 0.004	0	71.889 \pm 0.01	647.7	2.040
		F-K	44.40 \pm 0.41	19.29 \pm 0.03	43.364 \pm 0.009	117.056 \pm 0.01	100.778 \pm 0.01	1000	2.438
		F-L	28.27 \pm 2.24	9.11 \pm 0.01	41.659 \pm 0.013	157.333 \pm 0.02	82.444 \pm 0.01	1227	1.746
		F-M	29.64 \pm 2.76	6.74 \pm 0.01	38.326 \pm 0.004	145.944 \pm 0.03	163.000 \pm 0.01	1075	2.010
		F-N	55.14 \pm 1.48	6.82 \pm 0.02	25.845 \pm 0.006	73.167 \pm 0.01	40.778 \pm 0.01	1075	2.570
	Compuestos aislados	Pinocembrina (1)	na	na	3.752 \pm 0.001	175.944 \pm 0.02	65.778 \pm 0.03	67.5	0.576
		Acacetina (2)	na	na	17.318 \pm 0.043	219.000 \pm 0.02	59.667 \pm 0.01	525	0.0796
		4',7-dimetilnaringenina (5)	na	na	nd	nd	nd	Nd	0.0240
		Galangina (4)	na	na	78.093 \pm 0.93	636.222 \pm 0.71	1144.11 \pm 0.18	125	0.2600
		Alpinetina (3) y 5-metilnaringenina (6)	na	na	0	173.444 \pm 0.02	875.222 \pm 0.17	Nd	0.0436

Na: no aplica

Nd: no determinado

Figura B. Espectros de RMN¹H y RMN¹³C de la 4',7-dimetilnaringenina (**5**).

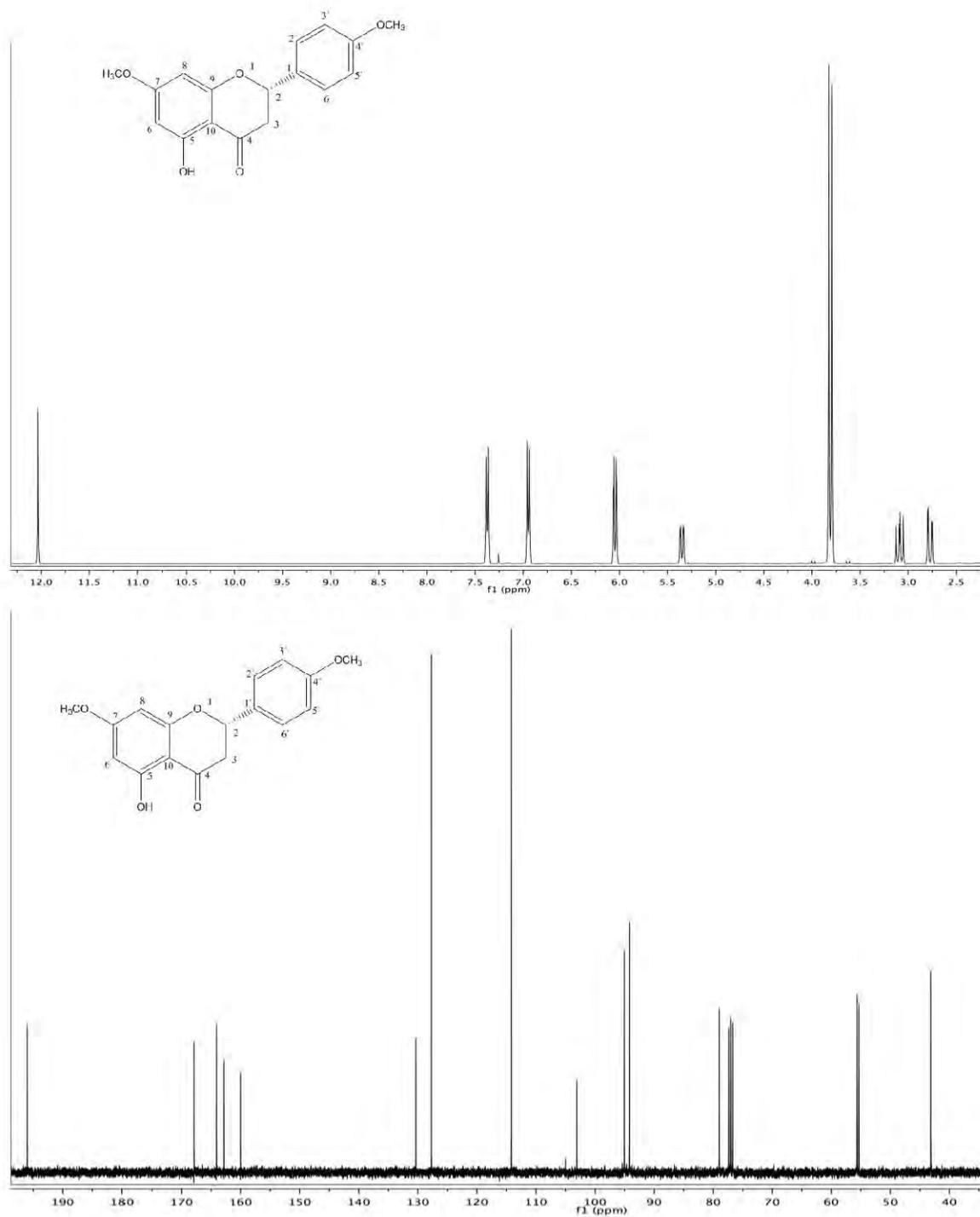


Figura Ba. Espectro NOE de la 4',7-dimetilnaringenina (**5**).

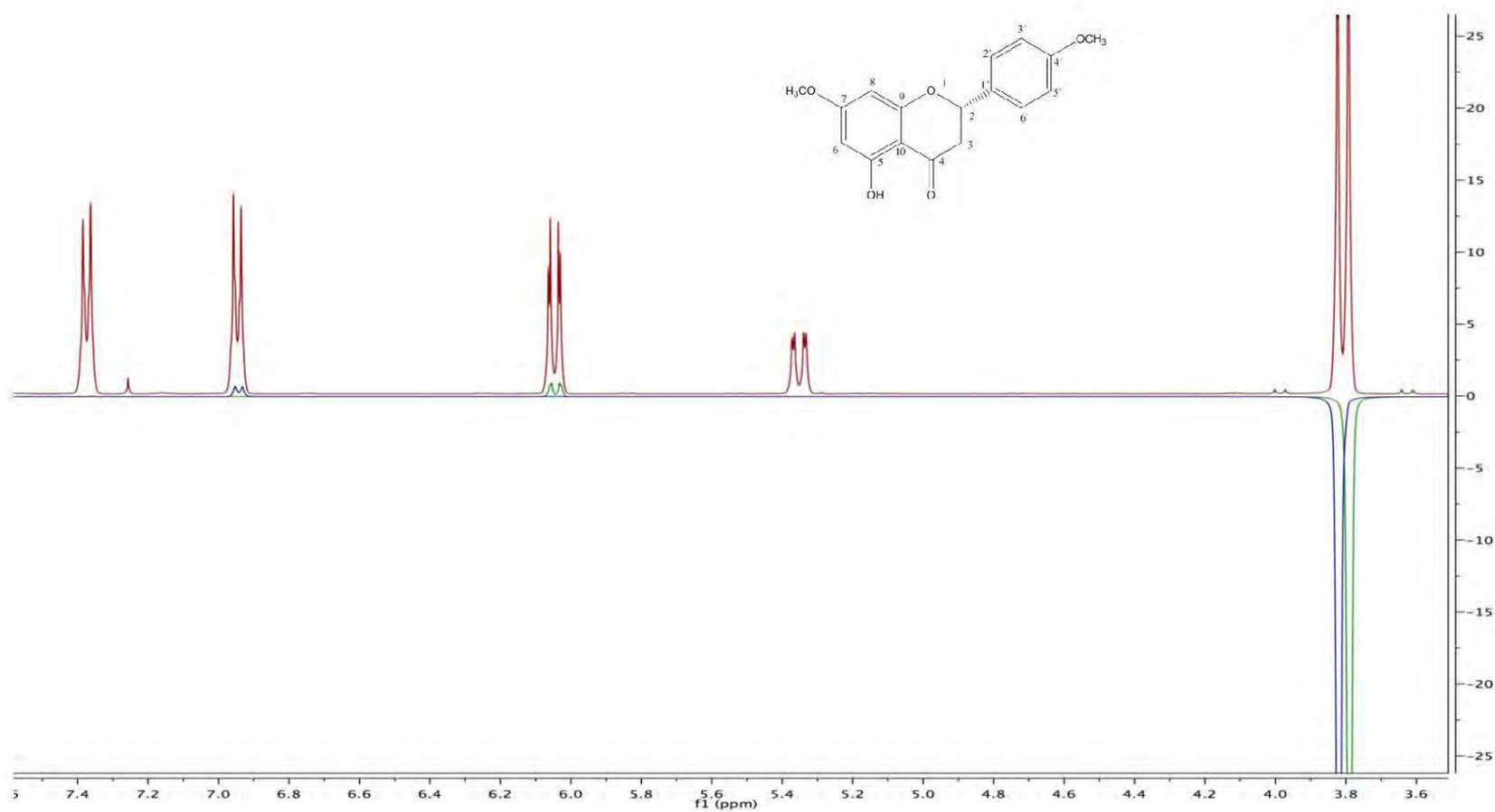


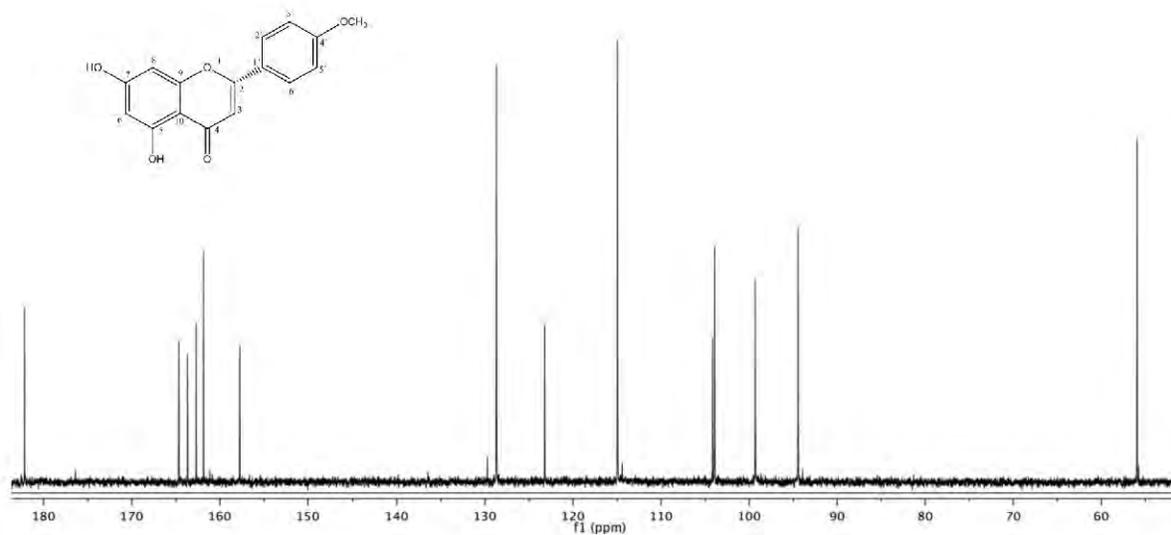
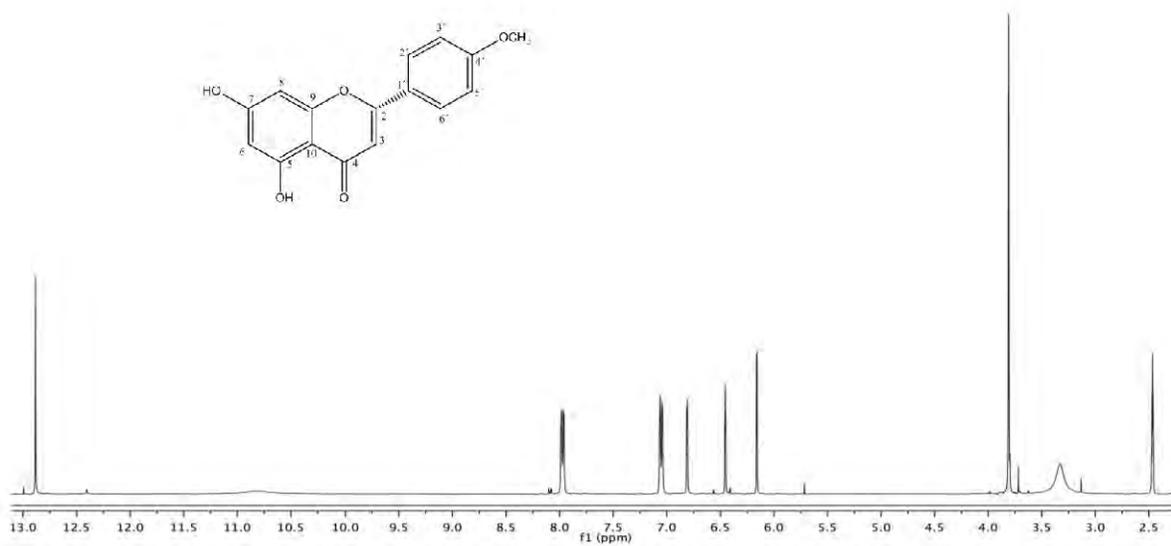
Figura C. Espectros de RMN¹H y RMN¹³C de la acetina (2).

Figura Cb. Espectro NOE de la acetina (2).

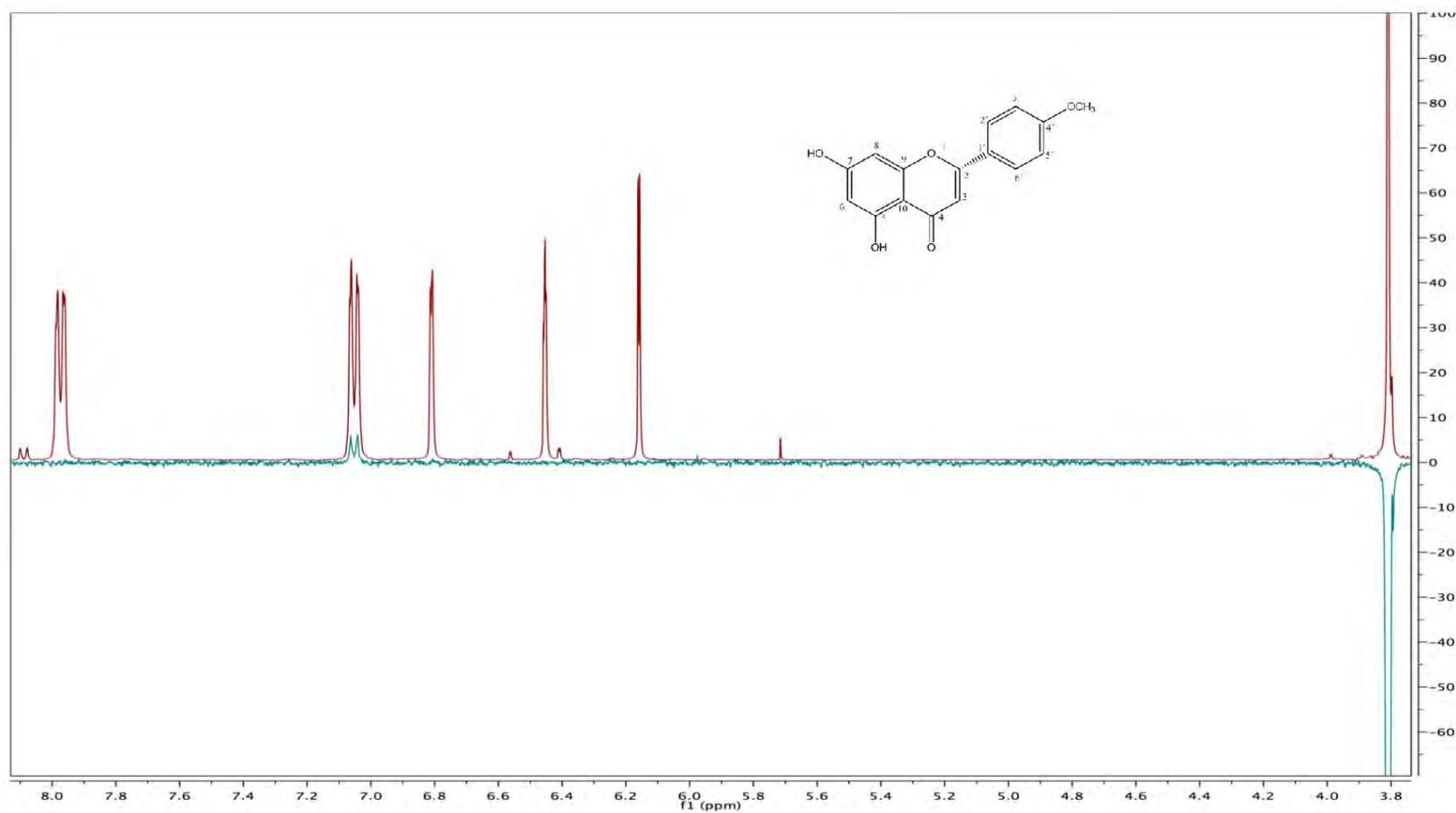


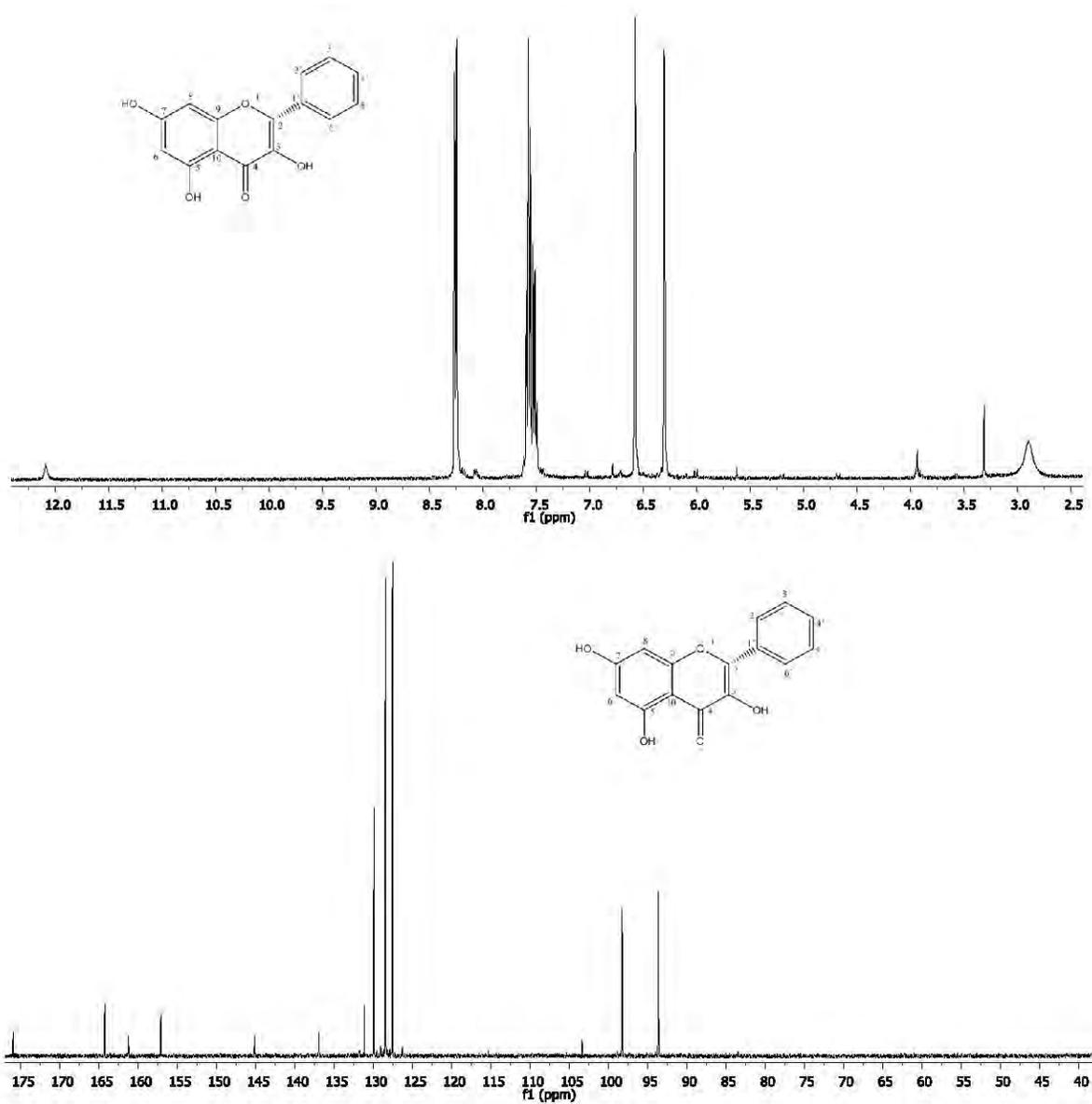
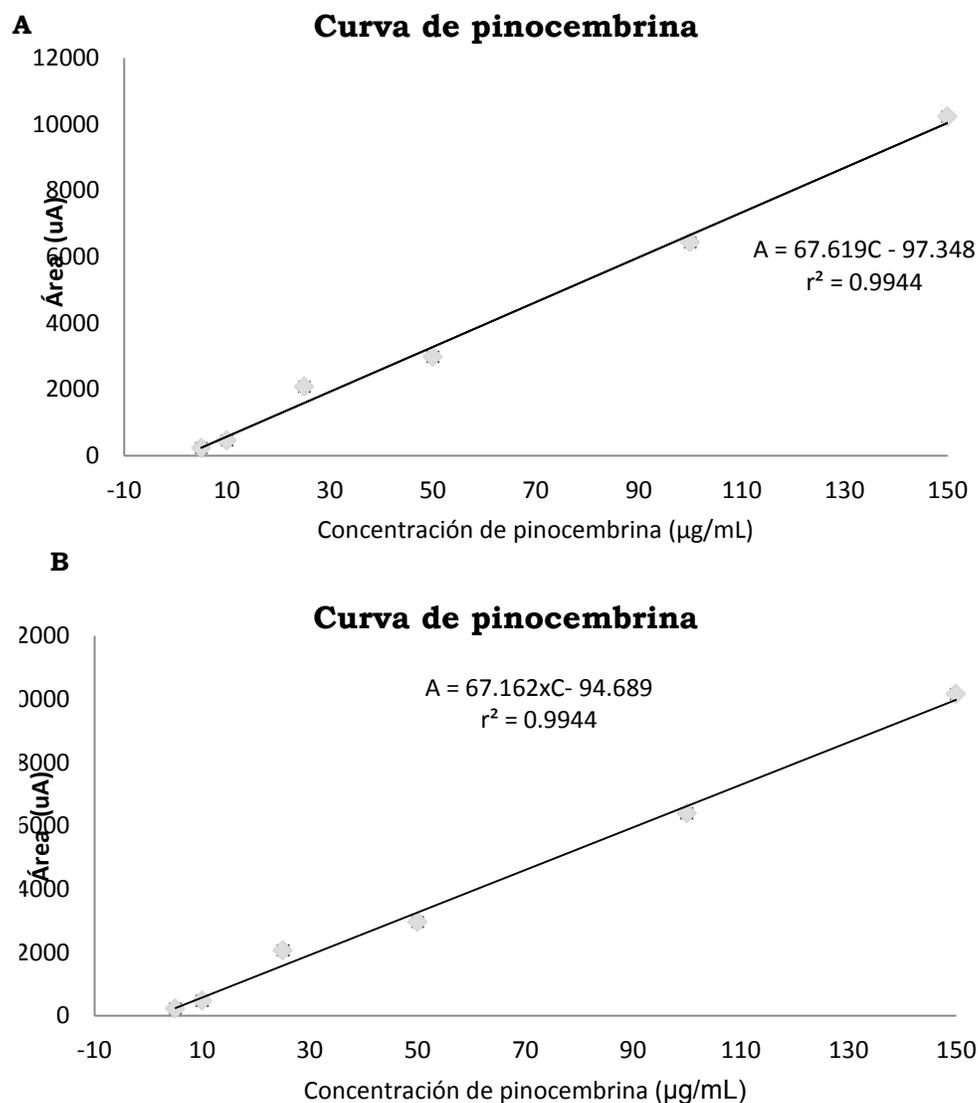
Figura D. Espectros de RMN¹H y RMN¹³C de la galangina (**4**).

Figura E. Rectas utilizadas para la determinación del contenido de pinocembrina en los extractos etanólicos de los propóleos recolectados.



A. Curva de pinocembrina utilizando como fase móvil MeOH-(H₂O:TFA al 0.1%) en proporción 55:45. **B.** Curva de pinocembrina utilizando como fase móvil MeOH-ACN-(H₂O:TFA al 0.1%) en proporción 30:20:50.

9. Referencias.

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., **2007**, Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 278-283.
- Allende, P., **2012**. El propóleo: usos. Información disponible en la página web:
www.apicultura.entupc.com/portal/productos/propoleos/usos.htm,
consultada el lunes 16 de abril de 2012.
- Alzaga-Ruiz, N., **2011**. El propóleo: su aplicación en la medicina humana, disponible en la página web:
<http://www.slideshare.net/aloverasantander/el-propleo> consultada el domingo 10 de junio de 2012.
- Ataç-Uzel, K., Özant-Önçağ, **2005**. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research*, 160, 189-195.
- Bankova, Popova, S.S., Marekov N-L., **1983**. A study on flavonoids of propolis. *Journal of Natural Products*, 46, 471-474.
- Bancova, V., Melikova, M., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C., **2000**. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*, 71, 693-299.
- Bankova, **2005**. Chemical diversity of Propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117.
- Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioja, L.Y., **2002**. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 67-73.
- Basim, E., Basim, H., Özcan, M., **2006**. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77, 992-996.

- Bedascarrasbure, E.L., Maldonado, L., Alvarez, A., **2001**. El Propóleos: un valioso producto de la colmena, información disponible en la página web: <http://www.apinetla.com.ar/ar/divulgacion/06/pplsnoa.htm>, consultada el día 30 mayo de 2012.
- Borek, C., **2004**. Dietary antioxidants and human cancer. Integrative. Cancer Therapies. 3, 333-341.
- Burdock y Asociados, **1998**. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). Food and Chemical Toxicology, 36, 347-363.
- Bruschi, M., L., Franco S., L., y Gremião, M., P., **2003**. Application of an HPLC method for Analysis of Propolis extract. Journal of Liquid Chromatography and related Technologies, 26, 2399-2409.
- Castaldo, S., Capasso, F., **2002**. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 73, S1-S6.
- Chaillou, L., Nazareno, M., A., **2009**. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. Food Science and Technology, 42, 1422-1427.
- Ching, A., Sook W., T., Sukari M., A., **2007**. Characterization of flavonoide derivates from *Boesenbergia rotunda* (L). The Malaysian Journal of Analytical Sciences, 11, 154-159.
- Claridades Agropecuarias, Marzo de **2010**. Apicultura en México, Publicación mensual No.199, Gobierno de México, Sagarpa.
- Dobrowalski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., **1991**. Antibacterial, anti-fungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on Propolis bee products. Journal of Ethnopharmacology, 35, 77-82.
- Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A., **2004**. Propolis and human, Ars. Pharmaceutica, 45, 21-43.
- Finley John W., Ah-Ng Kong, Korry j Hintze, **2011**. Antioxidants in Foods: State of Science Import to the Food Industry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 6837-6846.

- Fletcher, A. E., **2010**. Free Radicals, Antioxidants and Eye Diseases: Evidence from Epidemiological Studies on Cataract and Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Reserch*, 44, 191-198.
- Floegel, A., Dae-Ok K., Chung, S.J., **2011**. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043–1048.
- Florez-Martinez, J., González-Gallego, J., M., **2002**. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 8, 271-278.
- Fuliang-Hu, H., R., Hepburn, Li Yinghua, M., Chen, S.E., **2005**. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 276–283.
- Gardana, C., Scaglianti M., Pieta P., **2007**. Analysis of the polyphenolic fraction of Propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 390-399.
- Ghisalberti, E., L., **1979**. Propolis: a review. *Bee World*, 60, 59-84.
- Guerra Elejade, **2001**. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Servicio de Medicina Interna del Hospital de Navarra*, 18, 326-335.
- Havsteen B., **1983**. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemistry Pharmacology*, 32, 1141-1148.
- Hegazi, A.G., Hazzaa, M., Abd El Aziz, A., **1996**. Antifungal activity of Egyptian propolis. *Journal of Union Arab. Biology*. 3B, 67– 75.
- Hegazi, A.G., Abdel Hady, F.K., **2000**. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Naturforsch.* 55c, 70–75.
- Hernandez, D., M., Díaz-Ruiz G., Rivero-Cruz, B., E., **2012**. Ent-trachyloban-19-oic acid isolated from iostephane heterophylla as a

- promising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. *Fitoterapia*, 83, 527-531.
- Hernández, N.M.R., Bernal, K.C., **1990**. Efecto antibiótico del propóleo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* origen clínico humano. *Revista Cubana de Farmacia*. 24, 45– 50.
 - Hroboňová K., Lehotay, J., **2009**. Determination of Organic Acids in Propolis by HPLC Using Two columns with an On-Line SPE System. *Journal of Liquid Chromatography and related technologies*, 32, 125-135.
 - Kalogeropoulos, N., Konteles, S., J., Troullidou, E., **2009**. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.
 - Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., **1999**. Antimicrobial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 235–240.
 - Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T., **2004**. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
 - Kriengsak T., Unaroj B., Crosby K., **2006**. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675
 - Li-Chang, L., Yue-Wen Chen, **2005**. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 213– 220.
 - Matsushige, K., Basnet, P., Hasa, K., Kadota, S., Tanaka, K., Namba, T., **1996**. Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine* 3, 203–209.
 - Marcucci, M.C., **1995**. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.

- Marcucci, M.A., **1996**. Propiedades biológicas y terapéuticas dos constituyentes químicos de propóleo. *Química nova*, 19, 529-536.
- Mathews, C., K., Holde, K., E., **2002**. *Bioquímica*, Editorial pearson, Tercera edición, 15, pp. 618-621.
- McLennan Susan V., Bonner James, **2008**. The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 706-713.
- Medina Ramos, M., **2011**. Compuestos derivados del extracto etanólico del propóleo con actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Tesis de Licenciatura.
- Melliou E., Stratis E., Chinou I., **2007**. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103, 275-380.
- Meyer, J.J.M., Afolayan, A.J., Taylor, M.B., Erasmus, D., **1997**, Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 165-169.
- Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamedi, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N., Ostad, S. N., **2007**. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis, *Food Chemistry*, 103, 1097-1103.
- Niraldo, P., Avaliação, **2005**. Da actividade antiinflamatória do extracto padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin C. Tesis de Doctorado, Florianópolis, Universidad Federal de Santa Catarina. Brasil, 137 p.
- Oberley, T.D., Oberley, LW., **1997**. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol*, 12, 525-535.
- Orsatti, C.L., Missima, F., **2010**. Propolis Immunomodulatory Action *In Vivo* on Toll-Like Receptors 2 and 4 Expression and on Pro-Inflammatory Cytokines Production in Mice. *Phytotherapy research*, 24, 1141-1146.

- Peña, C. Raul, **2008**. Propolis standardization: a Chemical and biological review. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35, 11-20.
- Pinzon, L., C., Hong-Sze K., Wang M., **2011**. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, pp. 2729-2735.
- Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankova V., **2005**. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12, 221-228.
- Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., **2009**. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, 70, 1262-1271.
- Primon de Barros, M., Barreto Sousa, J., P., Kenupp Bastos Jairo, Faloni de Andrade Sérgio, **2007**. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 567-571.
- Prior R-L., WU, X., Schaich, **2005**. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rivero-Cruz, J.F., **2008**. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 99-103
- Rivett, A. J., **2000**. Regulation of intracellular protein turnover. Covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation. *Current Topics Cellular Regulation*, 28, 291-337.
- Roja, R., Nikfar S., Larijani B., **2005**. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59, 365-373.
- Rojano, B., Saez J., Schinella G., **2008**. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-

- isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). Journal of Molecular Structure, 877, 1–6.
- Rosas-Piñon Y., Mejia A., Díaz-Ruiz G., Aguilar Ma. I., **2012**. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. Journal of Ethnopharmacology, 141, 860– 865.
 - Ruddock PS, Charland M, Ramirez S, **2011**. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Sexually Transmitted Diseases, 38, 82-8.
 - Saikat Sen and Raja Chakraborty, **2011**. The role of Antioxidants in Human Health, American Chemical Society, Capítulo 1, disponible en 10.1021/bk-2011-1083.ch001.
 - Salatino, A., Fernández-Silva, C., Abbud Righi, A., Salatino, L., F., **2011**. Propolis research and the chemistry of plant products. Natural Products Report, 28, 925-936.
 - Serra, J., Escola, R., **1995**. Studies of the bacteriostatic activity of propolis. Dtsch. Lebensm. Rundsch, 91, 242–246.
 - Sforcin, J.M., **2007**. Propolis and the immune system: a review. Journal of Ethnopharmacology, 113, 1-14.
 - Sforcin J.M., Bankova V., **2011**. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. Journal of Ethnopharmacology, 133, 253-260.
 - Sforcin, J.M., Fernandez Jr., A., Lopes, C.A.M., **2000**. Seasonal effect on Brazilian Propolis antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 73, 243– 249.
 - Silici, S., Kutluca, S., **2005**. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of Ethnopharmacol, 99, 69-73.

- Singleton, V-L., Rossi J-A., **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16,144-58.
- Soleo de Funari Cristiano, Oliveira Ferro Vicente de, **2007**. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 206–212.
- Takeara, R., Albuquerque, S., Lopes, N.P., Lopes, J.L.C., **2003**, Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae, Asteraceae). *Phytomedicine*, 10, 490-493.
- Tellez Vargas, B. A. y Murillo Ortega, F., **2011**. Influencia de compuestos derivados del propóleo en la formación de biocapas mono especie por *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura.
- Usia T., Banskota A., Tezuka Y., Midorikawa K., **2002**. Constituents of chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of Natural Products*, 65, 673-676.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., **2012**. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131, 645–651.
- Veiga, E., Aguilar, J., A., Clavo, B., Llanes, L., **1997**. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*, 22, 201-216.
- Velazquez C, Navarro M, Acosta A, **2007**. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. **103**, 1747-56.
- Volpi Nicola, Bergonzini Gianluca, **2006**. Analysis of flavonoids from Propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 354-361.
- Walgrave, S., E., Warshaw, E., M., Glesne, L., A., **2005**. Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis*, 16, 209-215.

- Wawer, I., y Zielinska, A., **2001**. ^{13}C CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39, 374-380.
- Zhou Jinhui, Li Yi, Zhao Jing, **2008**. Geographical traceability of Propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints. *Food Chemistry*, 108, 749-759.