



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

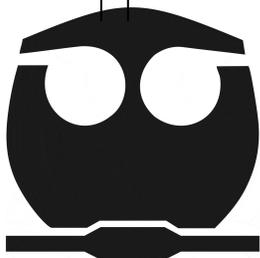
**ESTUDIO QUÍMICO Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE UN PROPÓLEO RECOLECTADO EN
LA DELEGACIÓN MILPA ALTA**

T E S I S

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

PRESENTA

MARLEN VALENZUELA LÓPEZ



México D. F.

2013

Jurado Asignado

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| Presidente: | M. en C. José Manuel Méndez Stivalet |
| Vocal: | Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci |
| Secretario: | Dr. José Fausto Rivero Cruz |
| 1er. suplente: | Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano |
| 2do. suplente: | M. en C. Abraham Madariaga Mazón |

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Marlen Valenzuela López

Agradecimientos

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su asesoría y apoyo para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

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

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

Al Instituto de Ciencias y Tecnología del Distrito Federal por el apoyo económico otorgado mediante el proyecto PICS10 10-27 para realizar el presente trabajo de tesis.

Dedicatorias

A mis padres los cuales con su infinito amor y esfuerzo lograron impulsar mis sueños para que estos se hicieran realidad.

Mi hermano por su apoyo, amor y confianza al transcurso de esta etapa.

Mis abuelos Jorge y Ana María los cuales se enorgullecían con cada evolución de mi aprendizaje. A Santa que no pudo llegar a ver esta etapa concluida, pero que agradezco su amor y cuidado desde el cielo.

A mis amigos uno de los pilares más fuertes en mi vida, Isabel, Jussara, Cindy, David, Roberto, Jorge, Pablo, Ricardo, Lucia, Baldemar, Miguel, Carlos, Marco, porque sin ustedes no hubiese disfrutado tanto esta etapa, por su apoyo, palabras de aliento, y su inmenso amor.

Índice

| | |
|--|------------|
| I. LISTA DE ABREVIATURAS..... | I |
| II. LISTA DE TABLAS Y DIAGRAMAS. | III |
| III LISTA DE FIGURAS..... | IV |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2.1. PROPÓLEO..... | 3 |
| 2.1.1 <i>Definición y generalidades.....</i> | 3 |
| 2.1.2 <i>Aspectos históricos.....</i> | 4 |
| 2.1.3 <i>Composición química.....</i> | 5 |
| 2.1.4 <i>Tipos de propóleos.....</i> | 11 |
| 2.1.5 <i>Propiedades biológicas y farmacológicas.....</i> | 12 |
| 2.2 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. | 14 |
| 2.3 MECANISMOS DE VASORRELAJACIÓN. | 15 |
| 2.3.1 <i>Relajación dependiente del endotelio.....</i> | 16 |
| 2.3.2 <i>Relajación independiente del endotelio.....</i> | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| 4. OBJETIVOS..... | 21 |
| 4.1 GENERALES..... | 21 |
| 4.2 ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL..... | 22 |
| 5.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES..... | 22 |
| 5.1.1 <i>Análisis cromatográficos.....</i> | 22 |
| 5.1.2 <i>Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.....</i> | 22 |
| 5.2 MATERIAL VEGETAL..... | 23 |
| 5.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PROPÓLEO. | 23 |
| 5.3.1 <i>Preparación del extracto del propóleo.....</i> | 23 |
| 5.3.2 <i>Fraccionamiento primario del extracto de propóleo.....</i> | 23 |
| 5.3.3 <i>Fraccionamiento secundario del extracto de propóleo a partir de F-AcOEt.....</i> | 23 |
| 5.3.4 <i>Fraccionamiento terciario a partir de P3.....</i> | 24 |
| 5.3.5 <i>Purificación de crisina a partir de S1.....</i> | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.6 Obtención y purificación de acacetina a partir de S2..... | 25 |
| 5.3.7 Obtención y purificación de pinocembrina a partir de S3..... | 26 |
| 5.4 ENSAYO BIOLÓGICO..... | 28 |
| 5.4.1 Ensayo de aorta aislada de rata..... | 28 |
| 5.4.2 Análisis de los datos obtenidos en la evaluación farmacológica..... | 28 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 30 |
| 6.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA 5,7-DIHIIDROXI-4'-METOXIFLAVONA (ACACETINA, C1)..... | 32 |
| 6.2 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE 5,7-DIHIIDROXIFLAVONA (CRISINA, FIII)..... | 41 |
| 6.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA 5,7-DIHIIDROXIFLAVANONA (PINOCEMBRINA, A8)..... | 43 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 48 |
| 9. PERSPECTIVAS..... | 49 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |

i. Lista de abreviaturas.

| Abreviatura | Significado |
|-------------------------------------|--|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| µg | Microgramo |
| AMP'c | Monofosfato de adenosina cíclico |
| AVC | Accidentes vasculares cerebrales |
| BK | Canales de potasio |
| Ca²⁺ | Calcio |
| CaCl₂ | Cloruro de calcio |
| CCA | Cromatografía en columna abierta |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| CCFP | Cromatografía en capa fina preparativa |
| CCR | Curva concentración respuesta |
| CE₅₀ | Concentración efectiva 50 |
| CH₂Cl₂ | Diclorometano |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| ECV | Enfermedades cardiovasculares |
| E_{max} | Efecto máximo |
| ENaC | Canal de sodio epitelial |
| g | Gramo |
| GMP'c | Monofosfato de guanosina cíclico |
| Hex | Hexano |
| IL | Interleucina |
| KCl | Cloruro de potasio |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramo |

| | |
|--------------------------------------|---|
| MgCl₂ | Cloruro de magnesio |
| MHz | Megahertz |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| Na⁺ | Sodio |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaH₂PO₄ | Fosfato monosódico |
| NaHCO₃ | Bicarbonato de sodio |
| nm | Nanómetro |
| NO | Óxido Nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| O₂ | Oxígeno |
| PDE | Fosfodiesterasa |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| Phe | Fenilefrina |
| PK C | Proteína sinasa C |
| RMN-¹³C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono |
| RMN-¹H | Resonancia Magnética Nuclear Protónica |
| SEM | Desviación estándar media |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UV | Ultravioleta |

ii. Lista de tablas y diagramas.

| Tabla | Descripción |
|-----------------|--|
| 1 | Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo. |
| 2 | Tipos de propóleos de acuerdo al origen vegetal y componentes principales. |
| 3 | Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F-AcOEt. |
| 4 | Fraccionamiento terciario por CCA a partir de P3. |
| 5 | Purificación por cromatografía en CA de la fracción S2. |
| 6 | E_{max} (%) y CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) del extracto etanólico de propóleo "Valentin". |
| 7 | Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del compuesto aislado acetina en RMN- 1H. |
| 8 | Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del compuesto aislado crisina en RMN- 1H. |
| 9 | Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del compuesto aislado pinocembrina en RMN- 1H. |
| 10 | E_{max} (%) y CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) del flavonoide mayoritario acetina. |
| Diagrama | Descripción |
| 1 | Proceso de extracción, fraccionamiento, separación y purificación de propóleo. |

iii Lista de Figuras.

| Figura | Descripción |
|---------------|---|
| 1 | Estructura base de un flavonoide |
| 2 | Mecanismos de relajación y contracción del musculo liso vascular y potenciales lugares de acción de los flavonoides |
| 3 | CCR del extracto etanolico de propóleo “Valentin”. |
| 4 | Espectro de masas de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, C1). |
| 5 | Estructura química acacetina. |
| 6 | Espectro de RMN- ¹ H de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina C1). |
| 7 | Espectro de RMN ¹³ C de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina C1). |
| 8 | Espectro de HMBC de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, C1) |
| 9 | Espectro de HSQC de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, C1). |
| 10 | Espectro de ¹ H- ¹ H COSY de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, C1). |
| 11 | Región del espectro de nOe de una dimensión comprendida entre 2.6-8.2 ppm de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, C1). |
| 12 | Estructura química crisina. |
| 13 | Espectro de RMN- ¹ H de la 5,7-dihidroxi flavona (crisina FIII). |
| 14 | Espectro de masas de la 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina A8). |
| 15 | Estructura química pinocembrina. |
| 16 | Espectro de RMN- ¹ H de la 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina A8). |
| 17 | CCR de acacetina flavonoides mayoritario. |

1. INTRODUCCIÓN

El término propóleo se identifica como una sustancia de la defensa de la colmena. El propóleo es una resina de composición compleja, propia de las abejas, recolectada de las grietas en las cortezas de los árboles como: abedul, álamo, pino, aliso, sauce y palma, así como brotes de hojas, flores y exudados de plantas. Esta resina es procesada por las abejas mediante enzimas salivales y mezclada con cera de la colmena (Castaldo *et al.*, 2002)

El propóleo tiene un olor característico, su color varía desde el verde, rojo, café y hasta el negro dependiendo de la fuente y su edad donde es recolectado (Lotti *et al.*, 2010). La función principal del propóleo al ser depositado sobre las grietas de la colmena es evitar la pérdida de calor durante el invierno.

Esta resina se ha utilizado en la medicina popular desde tiempos antiguos, debido a sus propiedades biológicas como: antisépticas, antitumorales, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, y vasorrelajantes. Las múltiples y variadas propiedades benéficas de esta resina justifican la necesidad de medir su actividad biológica (Peña, 2008).

La composición general del propóleo es de 50% de resinas y bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias (Sforcin *et al.*, 2011). Estudios previos han permitido el aislamiento de más de 300 compuestos. La composición química de esta resina, varía por factores como la flora local, la época del año, la cantidad de resina disponible en las hojas y cortezas, la región donde los insectos hacen sus colectas, e incluso de los contaminantes como: cera, polen y sustancias secretadas por las abejas (Ashraf *et al.*, 2009).

Los flavonoides son compuestos de importancia en el campo cardiovascular, se ha demostrado que hay una asociación inversa entre la ingesta diaria de flavonoides y la mortalidad a causa de una enfermedad coronaria. Este efecto cardioprotector podría explicarse por la combinación de propiedades antioxidantes, antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores (Carroll *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 2001).

Recientemente se ha reportado que ejercen efectos antihipertensivos y reducen la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la disfunción endotelial y mejoran el estatus oxidativo, plasmático y hepático (Duarte *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002).

Existen varios flavonoides con acción vasorrelajante cuyos mecanismos de acción no están claros; la activación de canales de potasio se ha indicado como una posible vía (Khalil, 2006).

La activación de muchos tipos de canales de potasio, expresado en el músculo liso vascular, representa una acción vasorrelajante, pequeñas moléculas sintéticas o naturales, actúan como potasio abridores de canales, herramientas prometedoras para el tratamiento terapéutico de varios trastornos para los padecimientos coronarios y vasculares (Calderone *et al.*, 2004).

En resumen, los flavonoides, ejercen mayoritariamente un efecto vasodilatador en el músculo liso vascular aislado. El principal mecanismo de esta acción parece estar relacionado con la inhibición de la PKC o con alguno de los procesos activados por ésta, aunque la inhibición de otras cinasas, de las PDE de nucleótidos cíclicos y el bloqueo de la entrada de calcio, puede contribuir al efecto en mayor o menor medida.

Por lo que es importante el estudio de productos naturales como un posible tratamiento de enfermedades cardiovasculares siendo esta la principal causa de muerte en todo el mundo. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad vasorrelajante en el modelo de aorta aislada de rata, los flavonoides aislados a partir de un extracto etanólico de un propóleo recolectado en el apiario "Valentín" en la Delegación Milpa Alta.

2. ANTECEDENTES

2.1. Propóleo

2.1.1 Definición y generalidades

El término propóleo deriva de los vocablos griegos *pro* (“por delante de”) y *polis* (“comunidad” o “ciudad”) y se identifica como una sustancia de la defensa de la colmena. El propóleo es una resina de composición compleja, propia de las abejas, recolectada de las grietas en las cortezas de los árboles como: abedul, álamo, pino, aliso, sauce y palma, así como brotes de hojas, flores y exudados de plantas. Esta resina es procesada por las abejas mediante enzimas salivales y mezclada con cera de la colmena (Castaldo, 2002).

La función principal del propóleo al ser depositado sobre las grietas de la colmena es evitar la pérdida de calor durante el invierno. Por otra parte, reduce la piqueta y aísla de las partículas extrañas que se depositan dentro de la colonia para evitar su descomposición (Peña, 2008).

El propóleo es de carácter lipofílico, duro y quebradizo a bajas temperaturas, con un leve calentamiento se torna maleable y viscoso; su coloración varía del amarillo-verdoso a marrón oscuro, lo cual se debe básicamente a su hábitat y a su antigüedad (Burdock, 1998). Por lo general, posee un sabor acre aunque a veces es amargo y tiene un aroma semejante al de la miel debido a los aceites aromáticos presentes en el mismo (Nirardo, 2005). Su punto de fusión oscila entre 60-70 °C aunque en algunos casos puede llegar hasta 100 °C (Marcucci, 1995).

Para la recolección del propóleo a partir de las colmenas el apicultor puede emplear el método de trampa o raspado, siendo el primero el que ofrece mejor calidad y menor contaminación. En las zonas templadas la recolección 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 medio de recolección son aspectos prácticos a considerar, ya que la recolección podría llevarse a cabo en las épocas del año donde se obtengan las más altas concentraciones de los compuestos que posean la mayor actividad biológica (Sforcin, 2007).

2.1.2 Aspectos históricos

Desde tiempos antiguos se han reconocido las propiedades terapéuticas del propóleo. Los egipcios conocían sus propiedades antiputrefactivas y lo usaban para embalsamar cadáveres; los Incas lo utilizaban como agente antipirético; En Grecia y Roma se empleaba como antiséptico, cicatrizante, en el tratamiento de heridas (Castaldo *et al.*, 2007).

En los siglos XII–XV se utilizó como antiinflamatorio bucal y en el tratamiento de las caries dentales, resfriados y forúnculos (Castaldo y Capasso, 2002).

Europa entre los siglos XVII–XIX se destacó por sus propiedades antibacterianas y finalmente, a partir de 1900 el propóleo fue utilizado como desinfectante (Nirardo, 2005) y cicatrizante, esta última propiedad fue aprovechada en África, hace más de 90 años, combinando esta resina con la vaselina para confeccionar pomadas antibacterianas (Marcucci, 1996).

Algunos años atrás, famosos fabricantes de violines usaban todavía el propóleo como un ingrediente en la composición de barnices y pulidores, cuya coloración especial se observa en algunos violines hechos por antiguos maestros de Cremona (Marcucci, 1996).

Adicionalmente, la farmacopea Inglesa en el siglo XVII, incluyó el propóleos en el listado de medicamentos oficiales (Castaldo y Capasso, 2002).

Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse, aunque recientemente, se observa un resurgimiento en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en diversos campos (Farré *et al.*, 2004).

2.1.3 Composición química

La composición general del propóleo es de 50% de resinas y bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias (Sforcin, 2012). Cabe decir que las ceras pueden ser removidas por medio de extracciones etanólicas las cuales contendrán los constituyentes bioactivos (Papotti, 2012).

Estudios previos han permitido el aislamiento de más de 300 compuestos, entre los cuales podemos destacar los polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres, aldehídos fenólicos, alcoholes y cetonas), terpenos (principalmente sesquiterpenos), esteroides, aminoácidos, y compuestos inorgánicos (Viuda *et al.*, 2008). Dentro de los ácidos aromáticos identificados se encuentran el caféico, ferúlico, isoferúrico, benzoico y sinápico. Los cumaratos de bencilo son los ésteres aromáticos más abundantes y los flavonoides de mayor actividad son la galangina, pinocembrina, quercetina y miricetina (Coneac *et al.*, 2008). La composición química de esta resina, varía por factores como la flora local, la época del año, la cantidad de resina disponible en las hojas y cortezas, la región donde los insectos hacen sus colectas, e incluso de los contaminantes como: cera, polen y sustancias secretadas por las abejas (Ashraf *et al.*, 2009).

Los flavonoides son el grupo de compuestos mayoritariamente aislados del propóleo. Se les denomina flavonoides ya que los primeros aislados tenían un color amarillo (del latín *flavus* "amarillo"), pero en la actualidad se han encontrado flavonoides de colores rojos, violetas y azules. Son químicamente clasificados de acuerdo a la presencia o no del anillo C, la doble ligadura entre los carbonos C-2 y C-3 en el anillo y de un grupo hidroxilo en C-3 (Niraldo, 2005) (Figura 1).

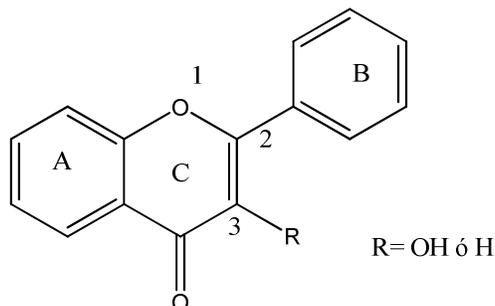


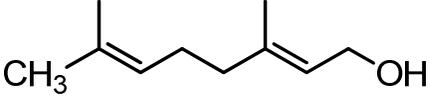
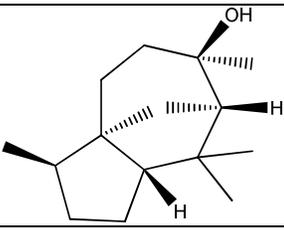
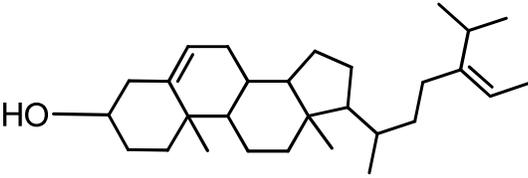
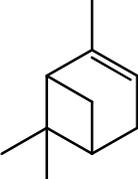
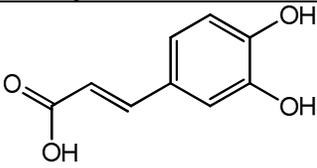
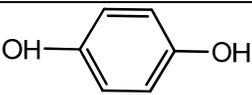
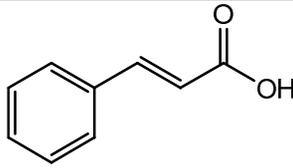
Figura 1. Estructura base de un flavonoide.

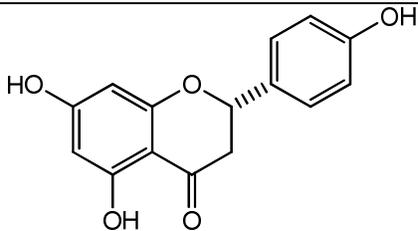
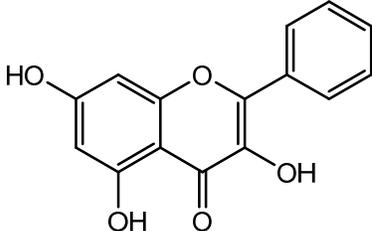
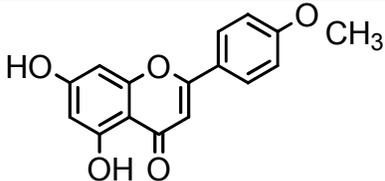
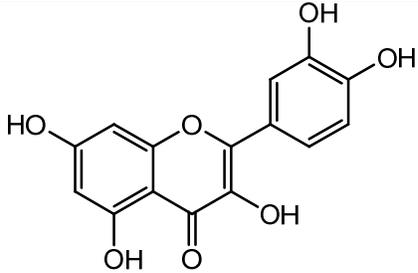
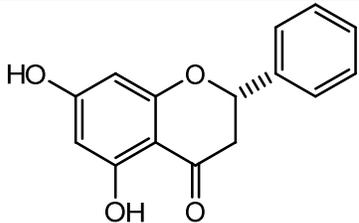
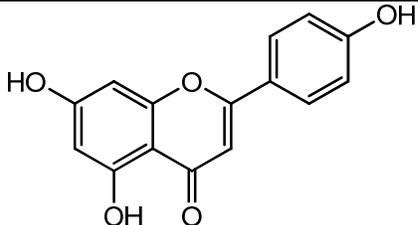
Los flavonoides son ubicuos en el reino de las plantas. Por lo anterior, no es sorprendente que de diferentes muestras de propóleo se hayan aislado el mismo tipo de flavonoides (Burdok, 1998). Se cree que los flavonoides son responsables de la mayoría de las actividades biológicas (Ataç-Uzel *et al.*, 2005).

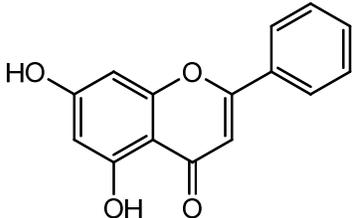
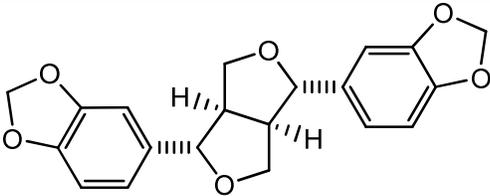
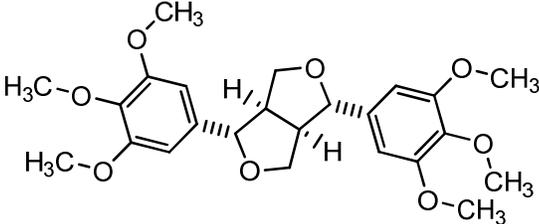
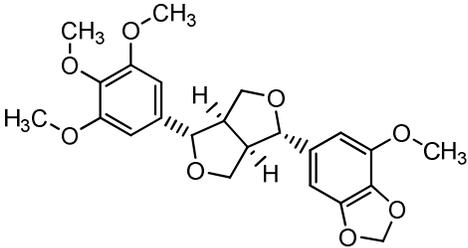
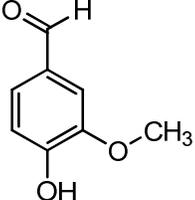
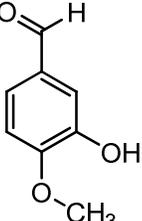
Además de los flavonoides, los compuestos fenólicos y aromáticos representan un grupo de productos activos farmacológicamente importantes presentes en el propóleo. Estudios realizados a propóleos europeos han demostrado que tanto los compuestos fenólicos como los aromáticos, son compuestos ampliamente encontrados en las plantas de manera natural (Ataç-Uzel *et al.*, 2005), representan más de la mitad de los 160 compuestos identificados en esta resina (Farré *et al.*, 2004).

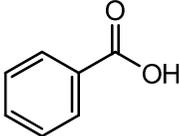
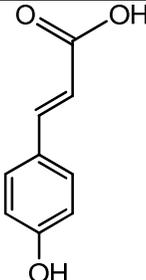
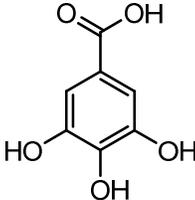
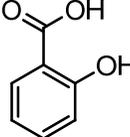
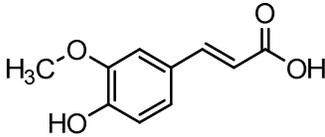
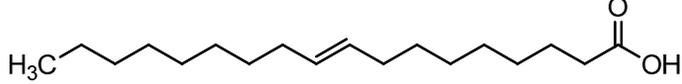
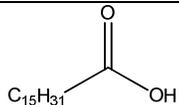
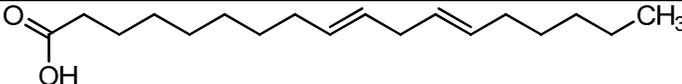
Tabla 1. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo.

| Compuesto Químico | Estructuras | Referencia |
|-------------------|-------------|-------------------------------|
| Terpenos | | |
| Totarol | | Popova, <i>et al.</i> , 2009. |

| | | |
|----------------------------|---|---|
| Geraniol |  | Marcucci, 1996. Bankova, <i>et al.</i> , 2000. |
| Cedrol |  | Silici, <i>et al.</i> , 2005. |
| Fucosterol |  | Popova, <i>et al.</i> , 2009. |
| Pineno |  | Bankova, <i>et al.</i> , 2000. |
| Compuesto Fenólicos | | |
| Ácido caféico |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Gardana, <i>et al.</i> , 2005 |
| Hidroquinona |  | Popova, <i>et al.</i> , 2009. |
| Ácido cinámico |  | Gardana, <i>et al.</i> , 2005. |

| Flavonoides | | |
|--------------|--|--|
| Naringenina |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Silici, <i>et al.</i> , 2005. |
| Galangina |  | Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005. Gardana, <i>et al.</i> , 2005. |
| Acacetina |  | Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005. |
| Quercetina |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Silici, <i>et al.</i> , 2005. |
| Pinocembrina |  | Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005. Gardana, <i>et al.</i> , 2005. |
| Apigenina |  | Marcucci, 1996. Gardana, <i>et al.</i> , 2005 |

| | | |
|------------------|--|---|
| Crisina |  | Gardana, <i>et al.</i> , 2005 |
| Lignanós | | |
| Sesamina |  | Bankova, <i>et al.</i> , 2000. Silici, <i>et al.</i> , 2005. |
| Yangambina |  | Bankova, <i>et al.</i> , 2000. |
| Sesartenina |  | Bankova, <i>et al.</i> , 2000. |
| Aldehídos | | |
| Vainillina |  | Marcucci, 1996. Mohammadzadeh, <i>et al.</i> , 2007. |
| Isovainillina |  | Marcucci, 1996. |

| Compuestos aromáticos | | |
|------------------------------|--|--|
| Ácido Benzoico |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996. Silici, <i>et al.</i> , 2005. Mohammadzadeh, <i>et al.</i> , 2007. |
| Ácido p-cumárico |  | Marcucci, 1996. |
| Ácido gálico |  | Marcucci, 1996. |
| Ácido salicílico |  | Marcucci, 1996. |
| Ácido ferúlico |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Silici, <i>et al.</i> , 2005 |
| Ácidos Grasos | | |
| Ácido oléico |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996. |
| Ácido palmítico |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996. |
| Ácido linoléico |  | Ataç-Uzel, <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996. |

2.1.4 Tipos de propóleos

De acuerdo al origen vegetal y componentes principales

Tabla 2. (Sforcin *et al.* 2011)

| Tipo de Propóleo | Origen Geográfico | Origen Vegetal | Componentes mayoritarios | Autores |
|-------------------------|--|---|--|--|
| Álamo | Europa, Norte America, Nueva Zelanda, Brasil. | <i>Populus spp.</i> de la sección Aigeiros, mas a menudo <i>P. nigra L.</i> | Flavonas, flavononas, ácidos cinámicos y sus ésteres | Nagy <i>et al.</i> , 1986, Greenaway <i>et al.</i> , 1988, Markham <i>et al.</i> , 1996, Bankova <i>et al.</i> , 2000. |
| Verde Brasileño | Brasil | <i>Baccharis spp.</i> , Predominantemente <i>B. dracunculifolia</i> DC. | Ácido p-cumárico prenilado, ácidos diterpénicos | Salatino <i>et al.</i> , 2005. |
| Abedul | Rusia | <i>Betula verrucosa Ehrh</i> | Flavonas y flavononas (diferentes al de álamo) | Popravko, 1978. |
| Rojo | Cuba, Brasil, México | <i>Dalbergia spp.</i> | Isoflavonoides (isoflavonas, pterocarpanos) | Campo Fernandez <i>et al.</i> , 2008, Dausch <i>et al.</i> , 2008, Lotti <i>et al.</i> , 2010. |
| Mediterráneo | Sicilia, Grecia, Creta, Malta | <i>Cupressaceae</i> (especies no identificadas) | Diterpenos (principalmente ácidos de tipo labdano) | Trusheva <i>et al.</i> 2003, Melliou y Chinou 2004, Popova <i>et al.</i> , 2010 |
| Clusia | Cuba, Venezuela | <i>Clusia spp.</i> | Benzofenonas polipreniladas | Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2002, Trusheva <i>et al.</i> , 2004. |
| Pacífico | Regiones del Pacífico (Okinawa, Taiwan, Indonesia) | <i>Macaranga tanarius</i> | C-prenil-flavanonas | Chen <i>et al.</i> , 2008, Kumazawa <i>et al.</i> , 2008. |

2.1.5 Propiedades biológicas y farmacológicas

2.1.5.1 Actividad inmunomoduladora

En los modelos de inmunosupresión, la administración de propóleo a ratones previene los efectos de la ciclofosfamida y mejora la tasa de supervivencia de los animales (Dimov *et al.*, 1991). También se sugiere que el propóleo modula la inmunidad no específica a través de la activación de macrófagos.

Ensayos *in vitro* mostraron que el propóleo inhibe las vías clásica y alterna del sistema del complemento (Ivanovska *et al.*, 1995a). C3 era uno de los objetivos de la acción propóleos, los flavonoides y los compuestos fenólicos fueron señalados como los principales compuestos anticomplementarios (Georgieva *et al.*, 1997).

2.1.5.2 Actividad antitumoral

Extractos de propóleo han sido examinados *in vivo* sobre diferentes líneas celulares. Se ha determinado que extractos etanólicos de propóleo poseen la mayor actividad citotóxica contra el carcinoma cervical humano (Castaldo *et al.*, 2007; Marcucci, 1996).

2.1.5.3 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de propóleos se ha observado en bacterias como *Helicobacter pylori* (Ata-Uzel *et al.*, 2005), bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus* (Marcucci, 1996); bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (Castaldo *et al.*, 2007), *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella bronchiseptica* y *Serratia marcescens* (Marcucci, 1996).

Actividad atribuida a sus contenidos en ésteres y ácidos fenólicos, aunque los componentes cinámicos y flavónicos del propóleo, que alteran las membranas e

inhiben la motilidad bacteriana, probablemente también contribuyen a esta acción (Farré *et al.*, 2004).

2.1.5.4 Actividad antioxidante

Desde el punto de vista químico, un antioxidante es un compuesto químico que previene la oxidación de otra especie química. Bajo una consideración biológica, un antioxidante puede definirse como aquella sustancia que cuando se encuentra presente a concentraciones mucho menores que las de un sustrato oxidable, disminuye o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato, por lo que los antioxidantes desempeñan un papel fundamental en la protección de estructuras celulares que pudiesen ser dañadas en reacciones que involucren radicales libres (Atoui AK *et al.*, 2005).

El propóleo en estudios previos a demostrado ser capaz de estabilizar o desactivar a los radicales libres antes de que ejerzan un daño a un órgano blanco, al parecer también son capaces de regular la síntesis de glutatión, importante antioxidante celular endógeno(Moskaug *et al.*, 2005).

2.1.5.5 Actividad cardioprotectora

El consumo de propóleos como un suplemento nutricional ha mostrado una disminución de la peroxidación de lípidos libres inducida por radicales, así como un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa (Jasprica I *et al.*, 2007).

Los efectos cardioprotectores de los extractos de propóleos han sido informados, pero el mecanismo de acción de los polifenoles no es bien definido (Hu F *et al.*, 2005; Rocha KK *et al.*, 2009).

Estudios han demostrado que los polifenoles de propóleos inhibe la progresión de la aterosclerosis, mejorando el perfil lipídico y regulando citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y factores angiogénicos (Beltrame *et al.*, 2010).

Es bien sabido que la modificación del perfil lipídico es altamente asociado con enfermedades cardiovasculares (González *et al.*, 2006). Estudios previos han

corroborado la regulación del metabolismo de lípidos por propóleos de diferentes fuentes (Koya-Miyata *et al.*, 2009).

En conjunto, se ha demostrado el potencial de los polifenoles de propóleos no sólo como agentes preventivos sino también como componentes terapéuticos nutricionales contra el avance de aterosclerosis. Los polifenoles del propóleo, puede tener acciones benéficas para prevenir o reducir lesiones ateroscleróticas a través de la modulación de la inflamación y factores angiogénicos (Beltrame *et al.*, 2010).

2.1.5.6 Actividad antidiabética

El grupo de trabajo de Matsushige (1996) demostró 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.

A su vez estudios anteriores demostraron que la administración del extracto acuoso o etanólico, por un periodo de 7 días en ratas diabetizadas controla la glicemia y modula los niveles de glucosa (Sforzin, 2011).

2.2 Enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares se refieren a las enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos, unas de las más comunes son:

- La cardiopatía coronaria: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco (miocardio).
- Las enfermedades cerebrovasculares: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Las arteriopatías periféricas: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.

Los ataques al corazón y los accidentes vasculares cerebrales (AVC) suelen ser fenómenos agudos que se deben sobre todo a obstrucciones que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro (OMS, 2007).

Los principales factores de riesgo son una dieta malsana, la inactividad física, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol. Los principales factores de riesgo modificables son responsables de aproximadamente un 80% de los casos de cardiopatía coronaria y enfermedad cerebrovascular (OMS, 2007).

Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos, y más del 80% se producen en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2007).

Se calcula que en 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y AVC, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte (OMS, 2007).

2.3 Mecanismos de vasorrelajación.

Varios flavonoides tienen propiedades vasorrelajante, debido a diferentes mecanismos de acción aún no aclarado por completo. Por ejemplo, una flavona apigenina vasodilatador, que muestra tanto un mecanismo de acción dependiente del endotelio debido a la liberación de óxido nítrico endotelial (NO), y una actividad independiente de endotelio, probablemente mediada por la proteína cinasa vía C (Zhang *et al.* 2002). También crisina, otra flavona estrechamente relacionado con apigenina, posee tanto acción dependiente como independiente de endotelio, pero al igual presentando efectos vasorrelajante (Duarte *et al.*, 1993; Herrera *et al.*, 1996).

La activación de muchos tipos de canales de potasio, expresado en el músculo liso vascular, representa un mecanismo de acción vasorrelajante, lo que hizo pequeñas moléculas sintéticas o naturales, en calidad de potasio abridores de

canal, prometiendo herramientas para el abordaje terapéutico de varios trastornos. Realmente, esta clase de fármacos se pueden unir a las otras clases de vasodilatadores disponibles, con el fin de ofrecer una mayor variedad de enfoques terapéuticos para el tratamiento clínico de la hipertensión.

En cuanto al mecanismo mediante el cual los flavonoides disminuyen la presión arterial, se ha propuesto que el canal de sodio epitelial (EnaC) tiene un papel crucial en la regulación de la presión sanguínea, contribuyendo además al mecanismo de reabsorción de sodio (Na⁺) en los túbulos renales.

Además, se ha observado que a una edad las arterias coronarias tanto de los seres humanos como de las ratas muestran una expresión media reducida de gran conductancia activados por calcio en los canales de potasio (BK) y una disminución significativa de su modulación fisiológica (Marijic *et al.* 2001). Por lo tanto, la activación de los canales BK residuales por fármacos específicos podría ser visto como una estrategia terapéutica para compensar el deterioro de la capacidad vasodilatadora, que representa una causa del vaso espasmo coronario.

2.3.1 Relajación dependiente del endotelio

El endotelio vascular ejerce un importante control en la homeostasis cardiovascular. El equilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores, factores protrombóticos y antitrombóticos, y factores proliferativos y antiproliferativos esta desplazado en las enfermedades cardiovasculares, lo cual conduce a hipertensión, aterosclerosis, agregación plaquetaria e isquemia. La difusión endotelial está caracterizada por un deterioro en la vasodilatación dependiente del endotelio, la reducción de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) y un estado protrombotico y proinflamatorio de las células endoteliales. (Schachinger *et al.*, 2000; Widlansky *et al.*, 2003).

Algunos flavonoides ejercen directamente efectos vasodilatadores agudos en aorta de rata (Duarte *et al.*, 1993a; Duarte *et al.*, 1993b). En vasos sanos, estos efectos son independientes del endotelio y se producen de manera similar, aunque

con diferente potencia, en aortas contraídas con diferentes estímulos (noradrenalina, cloruro potásico (KCl), altas concentraciones de Ca^{2+} , etc). Curiosamente los metabolitos metilados son más potentes en las arterias coronarias (Ibarra *et al.*, 2002) y en las arterias de resistencia, que en los vasos de conductancia (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002). Estos efectos dependientes del endotelio están relacionados con un efecto prooxidante, ya que pueden ser inhibidos por las enzimas SOD y catalasa, que elevaría los niveles intracelulares del O^{2-} , con el consiguiente aumento en los niveles de Ca^{2+} endotelial citosólico (Andriambeloson *et al.*, 1998).

2.3.2 Relajación independiente del endotelio

Los mecanismos que pueden explicar estos efectos son varios y engloban la acción sobre la proteína cinasa C (PKC) y otras cinasas, la entrada de calcio en la célula y la actividad fosfodiesterasa (PDE). Los canales de potasio de la membrana no parecen intervenir en la respuesta vasodilatadora de los flavonoides.

La actividad de determinadas cinasas está relacionada con la función contráctil de las células musculares y los flavonoides pueden modificar el funcionamiento de estas enzimas. Tanto los requerimientos estructurales para la inhibición como la potencia de esta inhibición (Ferriola *et al.*, 1989), sobre la PKC de cerebro de rata, se correlacionan bastante bien con los requerimientos y la potencia de la acción vasodilatadora. Los flavonoles y flavonas son los inhibidores más activos. Las chalconas se comportan como inhibidores más débiles y las flavanonas son generalmente inactivas. Sin embargo, no disponemos de información sobre los efectos de los flavonoides en las diversas isoenzimas de la PKC presentes en el tejido vascular (Álvarez y Orallo, 2003).

La cinasa, de la cadena ligera de miosina, es otra enzima esencial en el desarrollo de la contracción en el músculo liso.

Parte del efecto vasodilatador de los flavonoides se puede atribuir al bloqueo de los canales de calcio activados por voltaje.

La inhibición de la respuesta a la liberación del calcio intracelular que se observa con algunos flavonoides puede deberse a la disminución de la sensibilidad a este ion como resultado de la inhibición de la PKC más que al vaciamiento de los depósitos intracelulares.

El incremento en los valores celulares de nucleótidos cíclicos participa en la relajación del músculo liso vascular. Algunos flavonoides son capaces de inhibir la actividad de las PDE de 3',5' monofosfato de guanosina cíclico (GMP'c) y de 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMP'c), enzimas responsables de la degradación de estos nucleótidos que incrementan de ese modo su concentración, lo que puede contribuir a la acción relajante. Parece, además, que existe una relación entre la estructura del flavonoide y su acción sobre las distintas isoformas de este tipo de enzimas (Álvarez y Orallo, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las ECV son la principal causa de muerte a nivel mundial según la OMS, afectan por igual a ambos sexos, y más del 80% se producen en países de ingresos bajos y medios. Se calcula que en 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte.

La modificación de los factores de riesgo puede reducir los episodios cardiovasculares y la muerte prematura tanto en las personas con enfermedad cardiovascular establecida como en aquellas con alto riesgo cardiovascular debido a uno o más factores de riesgo. Los principales factores de riesgo son una dieta malsana, la inactividad física, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol.

En nuestro país en particular no hay una cultura de prevención para este tipo de padecimientos, ya que aun habiendo campañas contra la obesidad, estas no sirven de mucho si no se inculca desde pequeños una alimentación sana, actividades físicas, y bajo consumo en sustancias de abuso.

Por lo antes mencionado se ha intensificado la búsqueda de diferentes alternativas a los tratamientos ya existentes, debido a los efectos adversos que presentan algunos de ellos, una de estas alternativas es el empleo de productos derivados de plantas. En este sentido los productos derivados de la colmena como el propóleo tienen gran relevancia en la medicina tradicional en el tratamiento de diversos padecimientos debido a sus múltiples actividades biológicas.

Con base en los antecedentes descritos previamente, este proyecto de investigación se enfocó en determinar la composición química y la actividad vasorrelajante del extracto etanólico derivado de un propóleo recolectado en la zona rural del Distrito Federal y del compuesto mayoritario aislado.

Los posibles hallazgos, en conjunto con la gran diversidad de propóleos en México, prácticamente inexplorados como fuentes de compuestos activos, constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de compuestos con actividad vasorrelajante.

4. OBJETIVOS

4.1 Generales.

El objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en evaluar la actividad vasorrelajante y determinar la composición química de un extracto etanólico de propóleo recolectado en el apiario “Valentín” de la Delegación de Milpa Alta.

4.2 Específicos.

- Preparar el extracto etanólico a partir de la muestra recolectada de propóleo del apiario “Valentín” en la Delegación Milpa Alta.
- Determinar el efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el tono del musculo liso vascular de la aorta aislada de rata, intacta y sin endotelio.
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto, empleando procesos de partición. Esta actividad conducirá a la obtención de una serie de fracciones de menor complejidad que el extracto original.
- Aislar los compuestos activos a partir de las fracciones primarias. Esta actividad permitirá obtener los compuestos en forma pura.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.
- Evaluar la actividad vasorrelajante de los compuestos aislados en un modelo de aorta aislada de rata.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Procedimientos generales

5.1.1 Análisis cromatográficos.

Se utilizaron dos tipos de cromatografía en columna abierta (CCA) y tres diferentes adsorbentes para cada una:

- Cromatografía en columna (12 cm × 9 cm) sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula de 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM.
- Cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 (Merck) empacado en una columna de vidrio (4.77×37 cm).

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 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm). Posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica al 1%, seguido de calentamiento (aproximadamente 110 °C) hasta la visualización completa.

5.1.2 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) en el edificio B de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) se determinaron en un 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 realizaron

utilizando DMSO- d_6 y MeOH- d_4 ; los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

5.2 Material vegetal.

La muestra de propóleo se recolectó del apiario “Valentín” ubicado en la zona rural del Distrito Federal en la Delegación Milpa Alta. La colecta fue realizada por Ángel Ramírez López y Adriana Correa Benítez de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria. Una muestra de referencia de este material vegetal se guarda en el laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, Ciudad Universitaria.

5.3 Estudio fitoquímico de propóleo.

5.3.1 Preparación del extracto del propóleo.

El material vegetal (140 g) se sometió a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente utilizando 400 ml de etanol por un período de 48 horas. Se filtró al vacío el extracto obtenido y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose así un extracto total de consistencia cerosa de color marrón (60.4 g).

5.3.2 Fraccionamiento primario del extracto de propóleo

El extracto obtenido se suspendió en 200 ml metanol-agua (90:10) y fue sometida a diferentes particiones con Hexano y AcOEt, utilizando 300 mL de cada disolvente y por triplicado. De este procedimiento se obtuvieron tres fracciones (F-Hex, F-AcOEt y F-MeOH), respectivamente.

5.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto de propóleo a partir de F-AcOEt .

La fracción F-AcOEt (15.1176 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento por CCA utilizando 325 g de gel de sílice como adsorbente y como fase móvil mezclas de CH_2Cl_2 y MeOH en diferentes proporciones.

Se colectaron 25 fracciones de 500 mL cada uno, los cuales se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica obteniéndose un total de siete fracciones combinadas.

Tabla 3. Fraccionamiento secundario por CCA a partir de F-AcOEt.

| Sistema de elución | Proporción | Fracciones Obtenidas | Fracciones Combinadas |
|--|------------|----------------------|-----------------------|
| CH ₂ Cl ₂ | 100 | 1-2 | P1 |
| CH ₂ Cl ₂ - MeOH | 95:5 | 3-4 | P2 |
| CH ₂ Cl ₂ - MeOH | 90:10 | 5-6 | P3 |
| CH ₂ Cl ₂ - MeOH | 85:15 | 7-9 | |
| CH ₂ Cl ₂ - MeOH | 80:20 | 10-13 | P4 |
| CH ₂ Cl ₂ - MeOH | 70:30 | 14-16 | |
| CH ₂ Cl ₂ - MeOH | 50:50 | 17-19 | P5 |
| CH ₂ Cl ₂ - MeOH | 30:70 | 20-22 | P6 |
| MeOH | 100 | 23-25 | P7 |

5.3.4 Fraccionamiento terciario a partir de P3.

La fracción P3 (5.094 g de peso) fue sometida a un fraccionamiento en CCA utilizando como fase estacionaria gel de sílice como adsorbente y como fase móvil mezclas de CH₂Cl₂ y acetona en diferentes proporciones.

Se colectaron 56 fracciones de 250 mL cada uno, las cuales se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica obteniéndose un total de siete fracciones combinadas.

Tabla 4. Fraccionamiento terciario por CCA a partir de P3.

| Sistema de elución | Proporción | Fracciones Obtenidas | Fracciones Combinadas |
|---|------------|----------------------|-----------------------|
| CH ₂ Cl ₂ | 100 | 1-5 | S1 |
| CH ₂ Cl ₂ - Acetona | 98:2 | 6-16 | S2 |
| CH ₂ Cl ₂ - Acetona | 95:5 | 17-27 | |
| CH ₂ Cl ₂ - Acetona | 90:10 | 28-32 | S3 |
| CH ₂ Cl ₂ - Acetona | 85:15 | 33-38 | S4 |
| CH ₂ Cl ₂ - Acetona | 80:20 | 39-43 | |
| CH ₂ Cl ₂ - Acetona | 70:30 | 44-48 | S5 |
| CH ₂ Cl ₂ - Acetona | 1:1 | 49-53 | S6 |
| Acetona | 100 | 54-56 | S7 |

5.3.5 Purificación de crisina a partir de S1.

A partir de la fracción S1 precipitó un sólido de color amarillo el cual se purificó mediante sucesivas recrystalizaciones de hexano-acetona. Este proceso permitió la obtención de 15.3 mg de un compuesto. El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como el flavonoide crisina (FIII).

5.3.6 Obtención y purificación de acacetina a partir de S2.

La fracción S2 (0.1224 g de peso) fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil se utilizó MeOH. Mediante este proceso se obtuvieron 18 fracciones que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniendo cinco fracciones combinadas (T1-T5).

A partir de la fracción T2 cristalizó un sólido de color amarillo con un peso de 30.8 mg. El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como el flavonoide acacetina (C1).

Tabla 5. Purificación por cromatografía en CA de la fracción S2.

| Sistema de elución | Proporción | Fracciones Obtenidas | Fracciones Combinadas |
|--------------------|------------|----------------------|-----------------------|
| CH ₃ OH | 100 | 1-3 | C1 |
| | | 4-6 | |
| | | 7-11 | C2 |
| | | 13-14 | C3 |
| | | 15-17 | C4 |
| | | 18 | C5 |

5.3.7 Obtención y purificación de pinocembrina a partir de S3.

La fracción S3 (28.5 mg) se sometió a una cromatografía en capa fina preparativa, utilizando gel de sílice como adsorbente y como fase móvil CH₂Cl₂-acetona (95:5). La placa se eluyó tres veces, una vez seca la placa se observó al UV observando tres bandas definidas, las cuales se rasparon y se dejaron macerando con acetona, se filtró y se concentró, obteniendo de la segunda banda cristales de color amarillo con un peso de 16.3 mg. El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como el flavonoide pinocembrina (A8).

Desarrollo Experimental

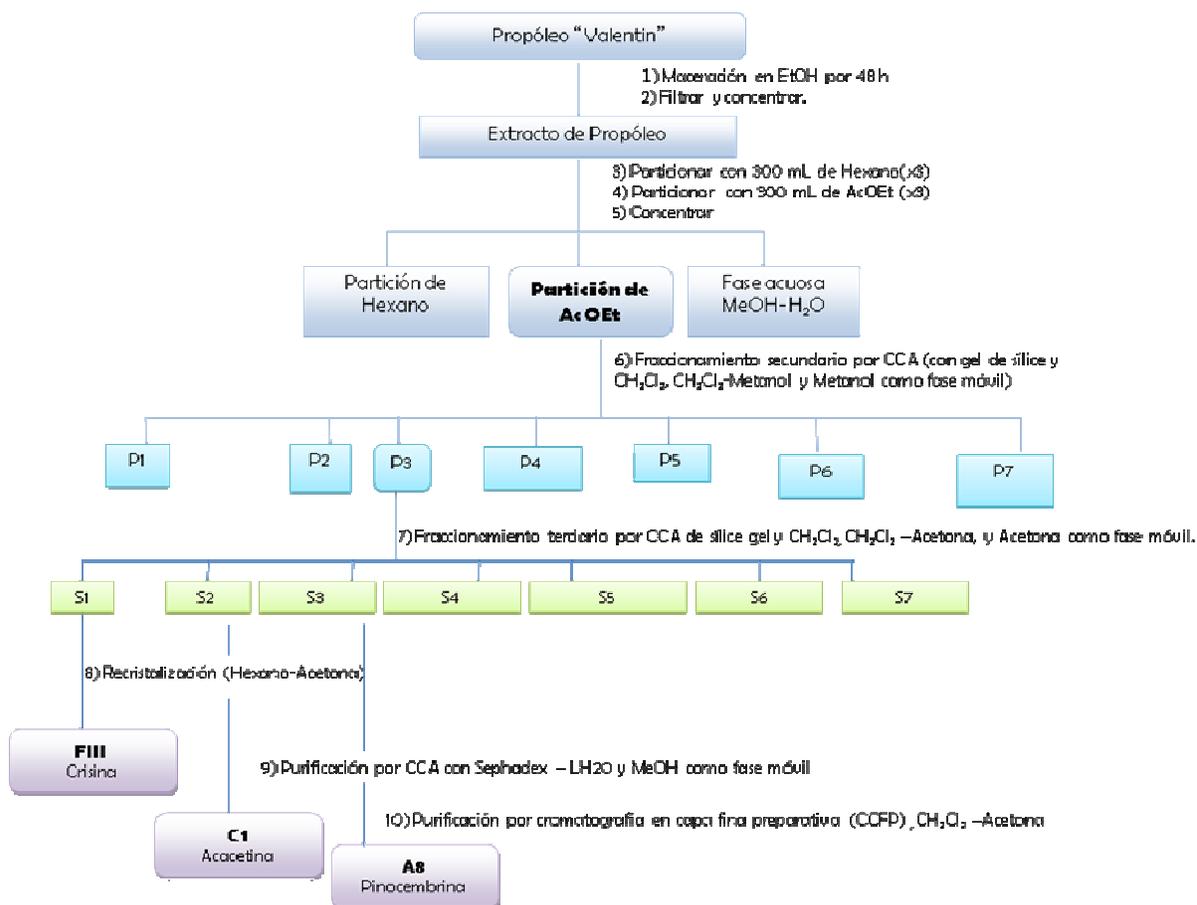


Diagrama 1. Proceso de extracción, fraccionamiento, separación y purificación de propóleo.

5.4 Ensayo biológico.

5.4.1 Ensayo de aorta aislada de rata.

Se emplearon ratas de la cepa Wistar (ambos sexos), las cuales fueron anestesiadas con cloroformo y sacrificadas por decapitación. Se removió la aorta torácica y ésta se colocó en una solución fría de Krebs-Heinseleit (pH 7.4, 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 30 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 5 mM D- glucosa). Se eliminó el tejido adiposo y conectivo de la aorta y se cortaron anillos de 4-5 mm (Feelisch y col., 1999; Forstermann y col., 1994). Los anillos de aorta se montaron en cámaras de incubación de 7 ml conteniendo solución de Krebs-Heinseleit a 37°C, las cuáles se burbujearon constantemente con una mezcla de oxígeno-dióxido de carbono 95:5.

Las contracciones mecánicas se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza Grass modelo FTO3 acoplados a un polígrafo Grass de 6 canales modelo 7-8 P.

El extracto etanólico de propóleo y el flavonoide mayoritario acacetina se evaluaron en un rango de concentraciones de 1 µg/ml a 1000 µg/ml. Las diferentes concentraciones se disolvieron en agua tridestilada y se adicionaron a las cámaras de tejido aislado, 20 min después de haber inducido la contracción de la aorta con la fenilefrina (Phe) 1 µM. La respuesta inducida por cada una de las concentraciones del extracto en la aorta se registró durante 10 minutos y los cambios en la tensión producida por el extracto de prueba se detectaron, mediante transductores de fuerza (FTO3 Grass), acoplados a un polígrafo Grass. La información obtenida fue procesada por el programa PolyView (Grass). Las respuestas se expresaron como el porcentaje de contracción alcanzada al adicionar la Phe (Feelisch y col., 1999).

5.4.2 Análisis de los datos obtenidos en la evaluación farmacológica.

Se realizaron 4-6 evaluaciones para cada una de las concentraciones de las sustancias de prueba. En cada caso se calcularon los promedios ± S. E. M.

(Standard Error of the Mean; error estándar del promedio). La construcción de las curvas concentración respuesta (CCR) se realizaron, mediante un programa de ajuste no lineal (PRISMA 3.0). En algunas CCR, se calculó la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección del propóleo se realizó con base en el amplio uso de esta resina en la medicina tradicional y los resultados obtenidos en los ensayos de selección. El bioensayo consistió en medir el efecto sobre la musculatura lisa vascular del extracto etanólico de una muestra de propóleo recolectada en la zona rural del Distrito Federal en el modelo de aorta aislada de rata siguiendo la metodología descrita por Ibarra y colaboradores (2002).

Los resultados obtenidos indican que el extracto etanólico del propóleo presenta un efecto vasorrelajante en el modelo de aorta aislada de rata obteniendo un E_{max} de 79.3 ± 5.1 (%) y una CE_{50} de 150.4 ± 12.3 $\mu\text{g/ml}$. Cabe mencionar que en México los estudios sobre los efectos del propóleo como agentes vasorrelajantes son nulos, motivo por el cual, la resina fue seleccionada para su estudio.

Una porción de 140 g del material vegetal se extrajo con etanol mediante un proceso de maceración con agitación magnética por un período de 72 horas. Posteriormente, el material vegetal se separó por filtración y el extracto resultante se concentró al vacío. El proceso de extracción se repitió tres veces.

La determinación de la acción vasorrelajante del extracto etanólico de propóleo, se realizó utilizando el modelo de aorta aislada de rata. Este modelo es ampliamente utilizado para evaluar el efecto, *in vitro*, de extractos crudos o compuestos puros obtenidos de plantas sobre el tono del músculo liso vascular de segmentos de aorta de rata (Ibarra *et al.*, 2002). La relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en la aorta, hacen que este modelo sea muy apropiado para la evaluación preliminar del efecto farmacológico de extractos de prueba.

El extracto etanólico resultante (60.4 g) se evaluó con la finalidad de corroborar la actividad biológica. Como resultado del proceso se obtuvo que el extracto

Resultados y Discusión

presentaba un E_{max} de 79.3 ± 5.1 (%) y una CE_{50} de 150.4 ± 12.3 $\mu\text{g/ml}$ los cuales se resumen en la Tabla 6, donde se puede observar que el porcentaje en el efecto máximo es similar al del control ACh, sin embargo en la concentración efectiva media es considerablemente mayor.

Tabla 6. E_{max} (%) y CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) del extracto etanólico de propóleo “Valentin”.

| Muestra | E_{max} (%) | CE_{50} $\mu\text{g/ml}$ |
|--|----------------|----------------------------|
| Extracto etanólico propóleo “Valentin” | 79.3 ± 5.1 | 150.4 ± 12.3 |
| ACh | $67.6 \pm 3.$ | 8.6 ± 1.4 |

En la Figura 3 se muestran las curvas obtenidas para el propóleo elegido para su estudio y otros propóleos de la zona rural del Distrito Federal evaluados. Los resultados indican que todos ellos poseen una notable actividad vasorrelajante.

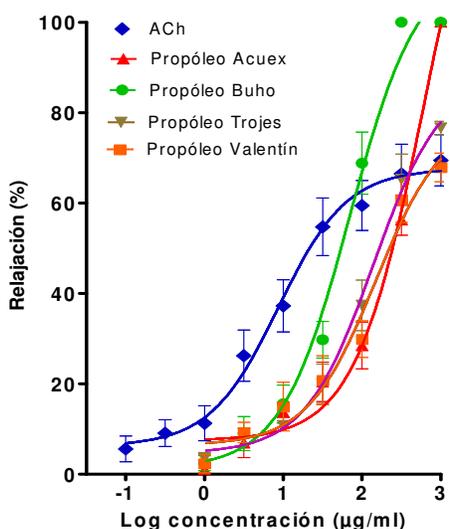


Figura 3. CCR del extracto etanólico del propóleo “Valentin”.

Con base en estos resultados, se decidió continuar con un estudio biodirigido del extracto etanólico del propóleo (EEP) con la finalidad de aislar los compuestos

responsables de la actividad vasorrelajante encontrada. El extracto etanólico de propóleo se sometió a un fraccionamiento primario mediante una partición con AcOEt, un fraccionamiento secundario y terciario por CCA utilizando como adsorbente gel de sílice, y como métodos de purificación CCA por Sephadex LH-20 y recristalización utilizando Hex-acetona. Logrando aislar tres flavonoides que fueron caracterizados como crisina, acacetina y pinocembrina mediante la utilización de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

6.1 Elucidación estructural de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, C1).

El compuesto **C1** se aisló como un sólido amarillo soluble en una mezcla de diclorometano-acetona. La fórmula molecular del compuesto se estableció como $C_{16}H_{12}O_5$ con un P.M. de 284, con base en los espectros de RMN (Figura 6 y 7) y espectrometría de masas (Figura 5) generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE). El ión molecular se encuentra en una relación masa carga de m/z 284 (8% abundancia relativa).

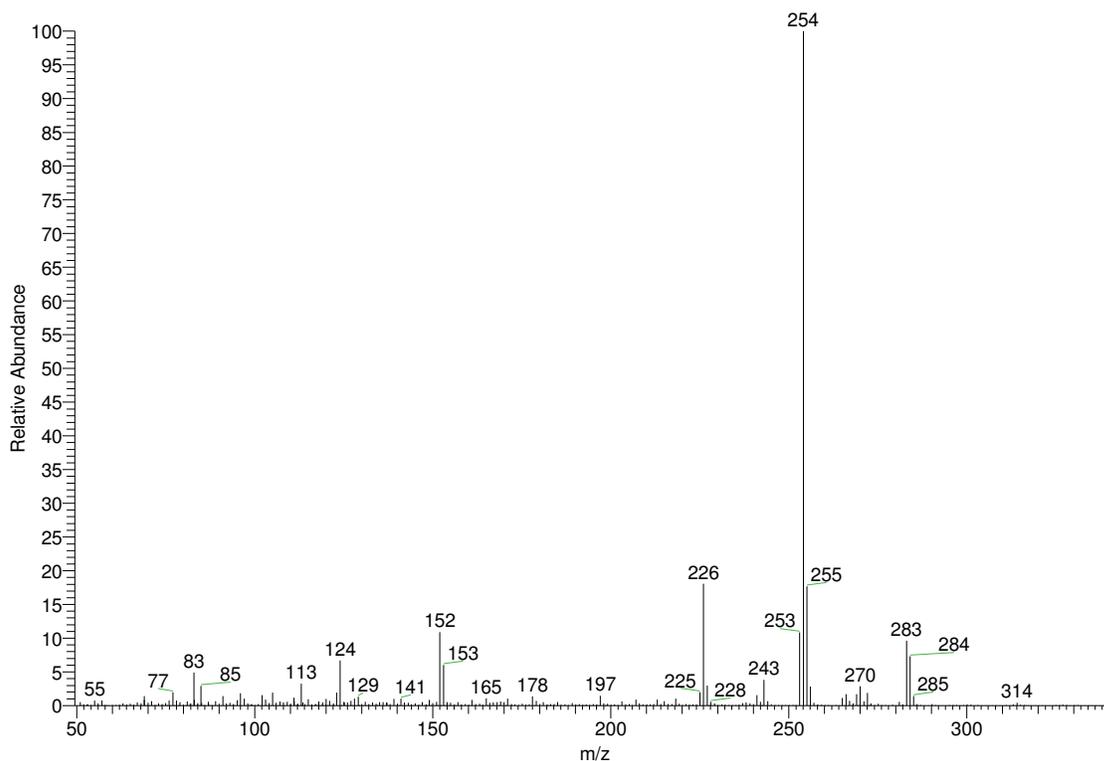


Figura 4. Espectro de masas de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, C1).

Los espectros de RMN- ^1H (Tabla 7 y Figura 6) presentan el perfil típico para compuestos de tipo flavona (Duddeck *et al.*, 1978; Lago *et al.*, 2007). Las características más importantes para el espectro son:

- a) En la región aromática del espectro de RMN- ^1H , se observa un sistema A_2B_2 [δ_{H} 7.99 (2H, d, $J= 8.0$ Hz, H-2' y H-6'), 7.09 (2H, d, $J= 8.0$ Hz, H-3' y H-5'), dos singuletes en δ_{H} 6.17 (1H, s, H-6) y δ_{H} 6.48 (1H, s, H-8). Estas señales son asignables a los anillos C y A del flavonoide. Las señales del sistema A_2B_2 correlacionan con las absorciones en δ_{C} 128.7 (C-2' y C-6') y 115.0 (C-3' y C-5') en el espectro de HSQC, en tanto que los singuletes correlacionaron con las señales en δ_{C} 99.3 (C-6) y 94.5 (C-8) (Figura 6).
- b) En δ_{H} 6.83 aparece un singulete que se asigna a H-3. Este singulete correlaciona con la señal en δ_{C} 103.9 en el espectro de HSQC (Figura 9).

c) En δ_H 3.82 se aprecia un singulete asignable a un grupo metoxilo. Este singulete correlaciona con la señal en δ_C 56.0 en el espectro HSQC. El grupo metoxilo se ubicó en la posición C-4' con base en los resultados obtenidos en el espectro de nOe de una dimensión (Figura 11). En el espectro se observa claramente que al irradiar el singulete centrado en δ_H 3.82, se intensifica el doblete asignable a los hidrógenos H-3' y H-5' consistente con la ubicación del grupo metoxilo en la posición 4'.

Con base en las evidencias presentadas, el compuesto C1 se identificó como la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona conocida con el nombre trivial de acetina.

Es importante mencionar que a la acetina se le han descrito en la literatura diversas propiedades biológicas adicionales a su efecto vasorrelajante. Algunas de las propiedades destacadas de este flavonoide son la antibacteriana, antitumoral, anticancerígena, antiinflamatorio, entre otras (Carroll *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 2001).

Estudios previos han reportado actividades específicas de acetina como son la inhibición selectiva de los canales de potasio para la repolarización auricular en humanos y como auxiliar en la prevención de fibrilación auricular en perros (Gui-Rong *et al.*, 2008). Los resultados descritos sugieren que la acetina inhibe los canales de potasio, y la duración prolongada del potencial en miocitos auriculares aumenta, no reduciendo la velocidad de conducción cardíaca o la contractilidad. Además, se ha demostrado que el compuesto posee un efecto antioxidante sin potencial proarrítmico, por lo que puede ejercer un efecto benéfico adicional para el tratamiento de fibrilación auricular, ya que el daño oxidante se cree que contribuye a la génesis de la fibrilación auricular en humanos. Por otra parte, en estas publicaciones se describe que la administración de la acetina por vía oral no tiene efectos tóxicos en los sujetos de prueba, por lo que se considera a esta como la mejor vía de administración (Gui-Rong *et al.*, 2008). Es importante mencionar que la acetina ha sido aislada previamente de propóleos

recolectados en diferentes partes del mundo (Hernández *et al.*, 2007; Szliszka *et al.*, 2009).

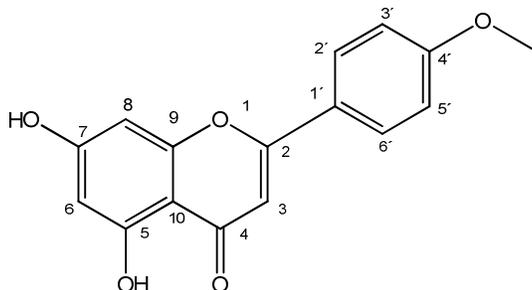


Figura 5. Estructura química de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acetina).

Tabla 7. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del compuesto aislado acetina en RMN-¹H y RMN-¹³C.

| Posición | Acetina | |
|---|--------------------------|---|
| | δ (J Hz) | δ |
| 2 | -- | 164.6 |
| 3 | 6.83 (1H, s) | 103.9 |
| 4 | -- | 182.2 |
| 5 | -- | 162.7 |
| 6 | 6.17 (1H, s) | 99.3 |
| 7 | -- | 163.7 |
| 8 | 6.48 (1H, s) | 94.5 |
| 9 | -- | 157.8 |
| 10 | -- | 104.2 |
| 1' | -- | 123.2 |
| 2', 6' | 7.99 (2H, dd, $J= 8.0$) | 128.7 |
| 4' | -- | 161.9 |
| 3', 4', 5' | -- | -- |
| 3', 5' | 7.09 (2H, dd, $J= 8.0$) | 115.0 |
| -OCH ₃ | 3.82 (3H, s) | 56.0 |
| 5-OH | 12.89 (1H, s) | -- |
| 7-OH | 10.57 (1H, s) | -- |
| 400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆ | | 100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆ |

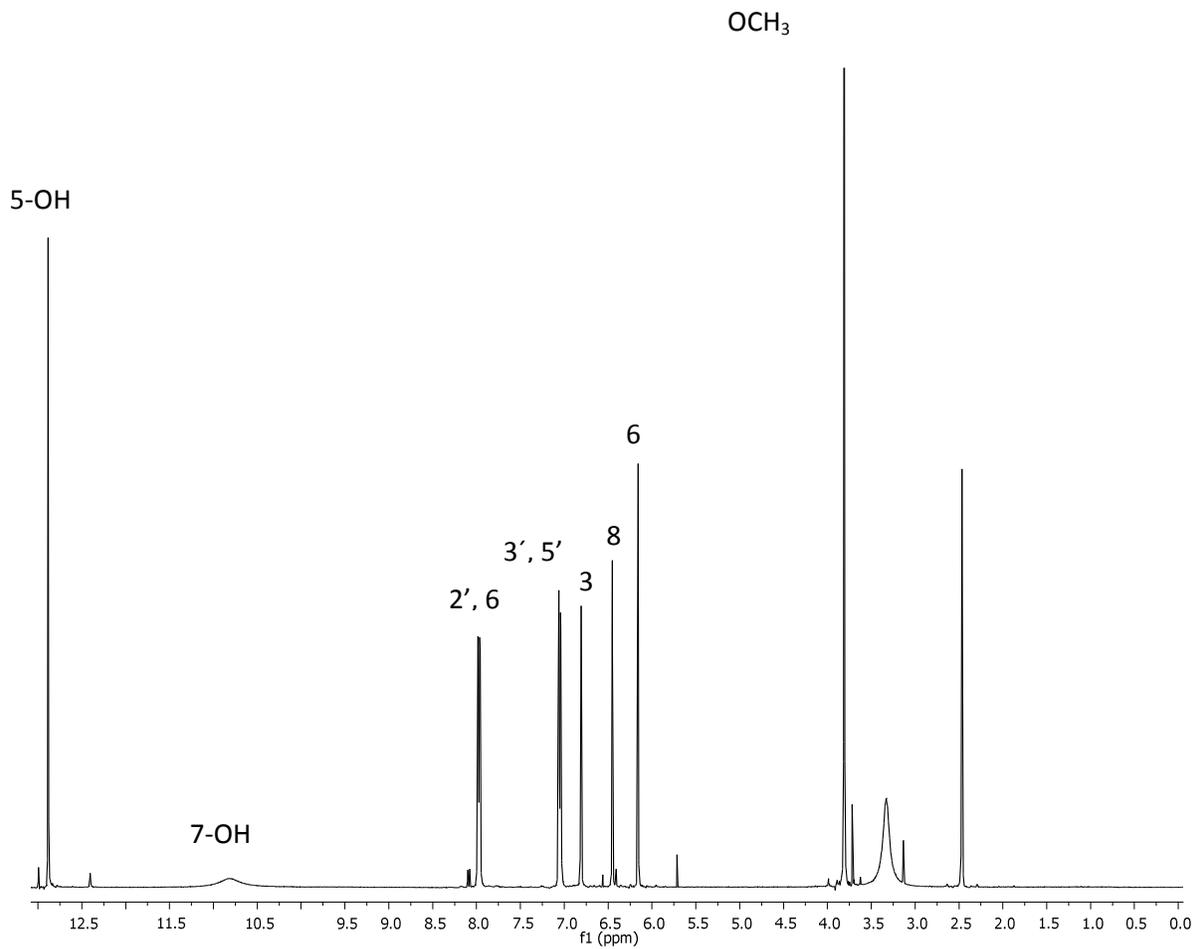


Figura 6. Espectro de RMN- ^1H de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acetina C1).

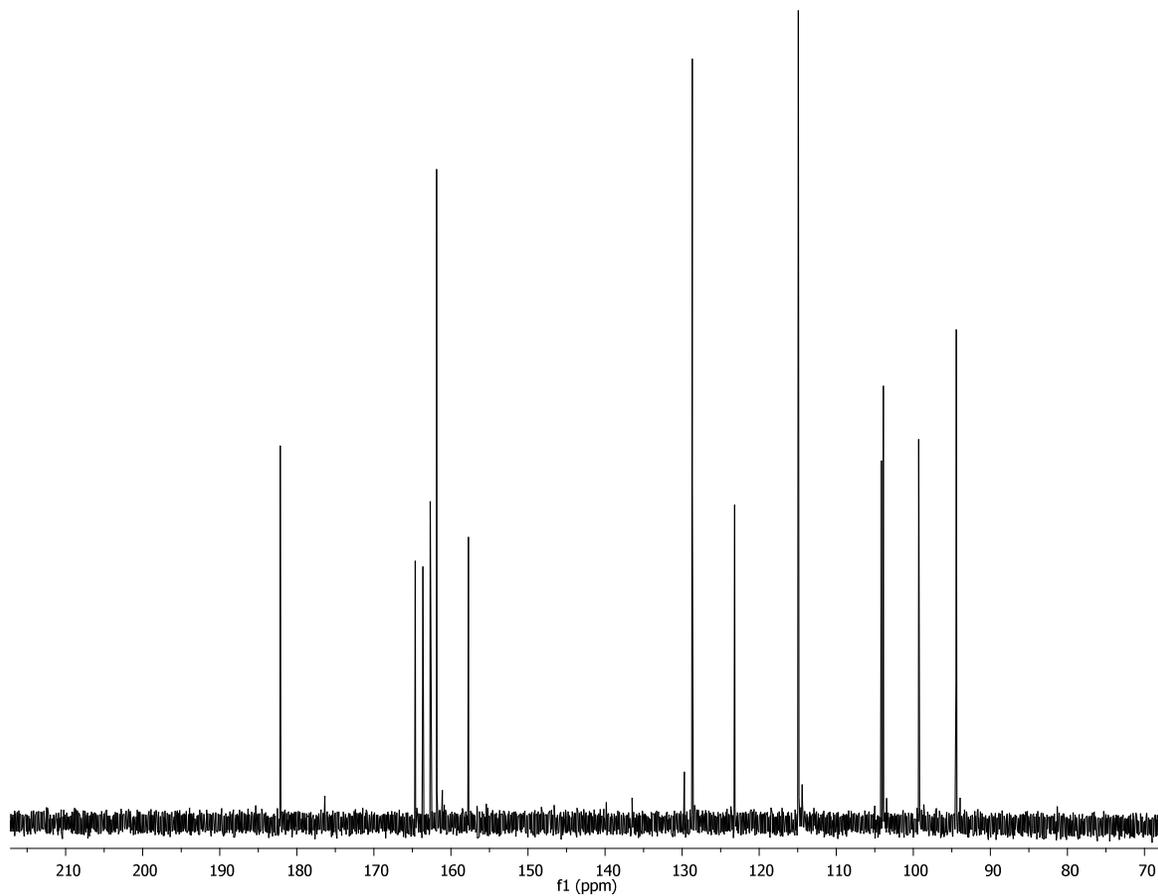


Figura 7. Espectro de RMN ^{13}C de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina **C1**).

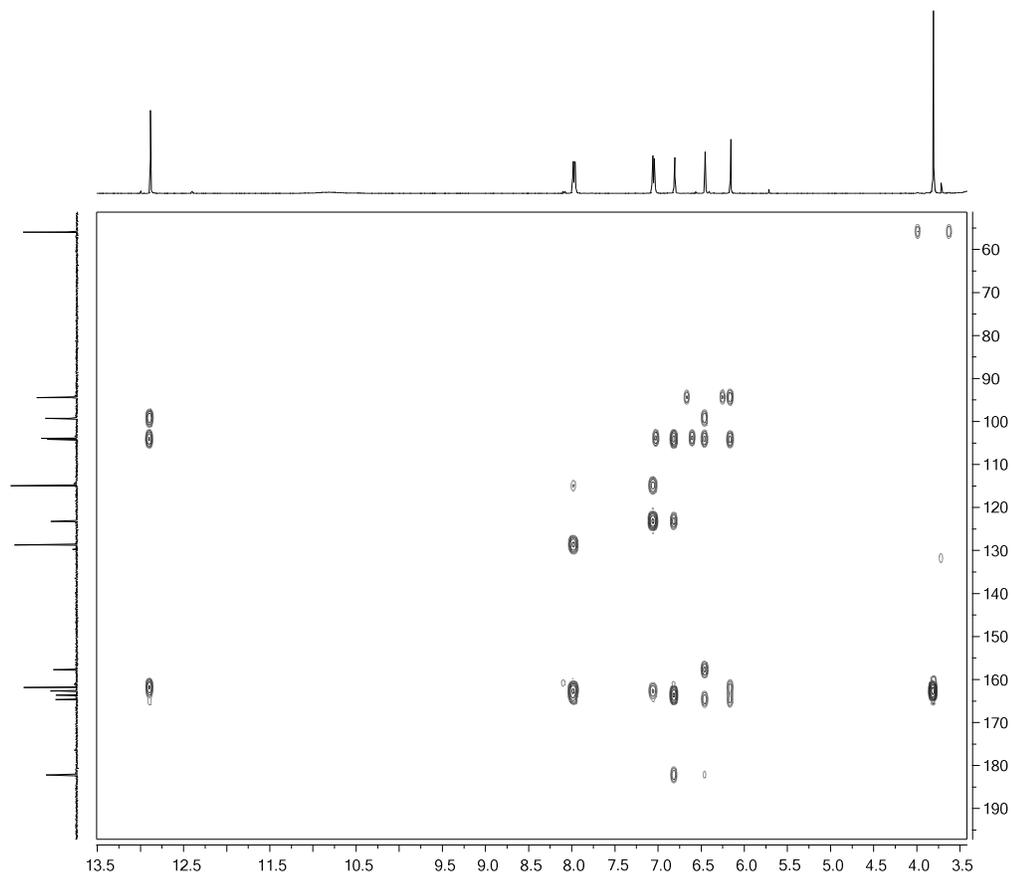


Figura 8. Espectro de HMBC de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, **C1**)

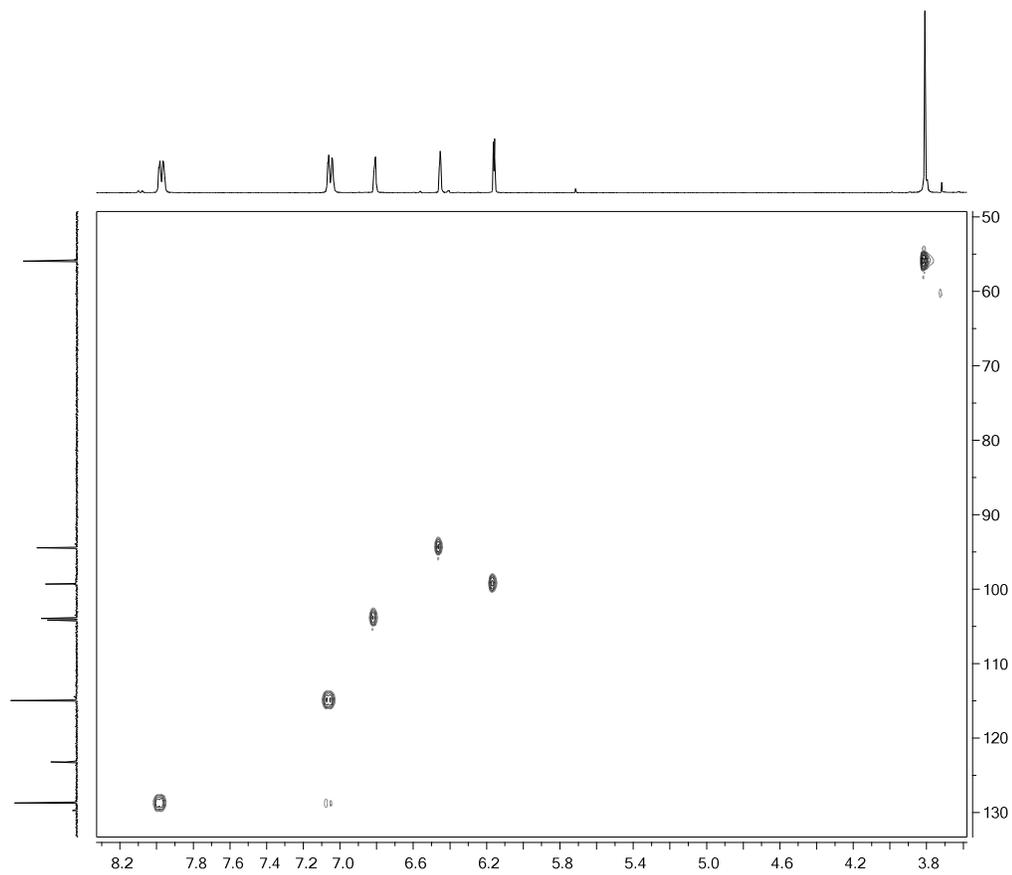


Figura 9. Espectro de HSQC de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, **C1**).

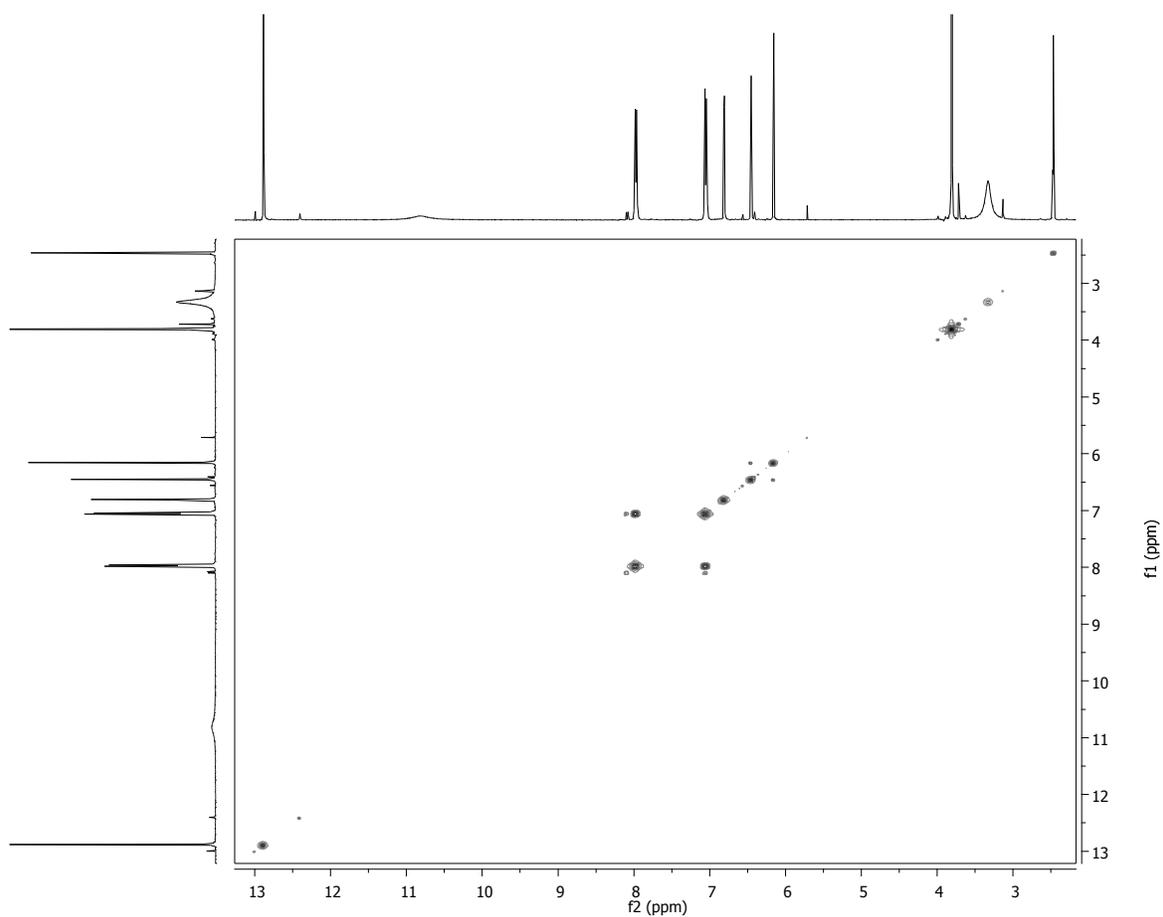


Figura 10. Espectro de ^1H - ^1H COSY de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, **C1**).

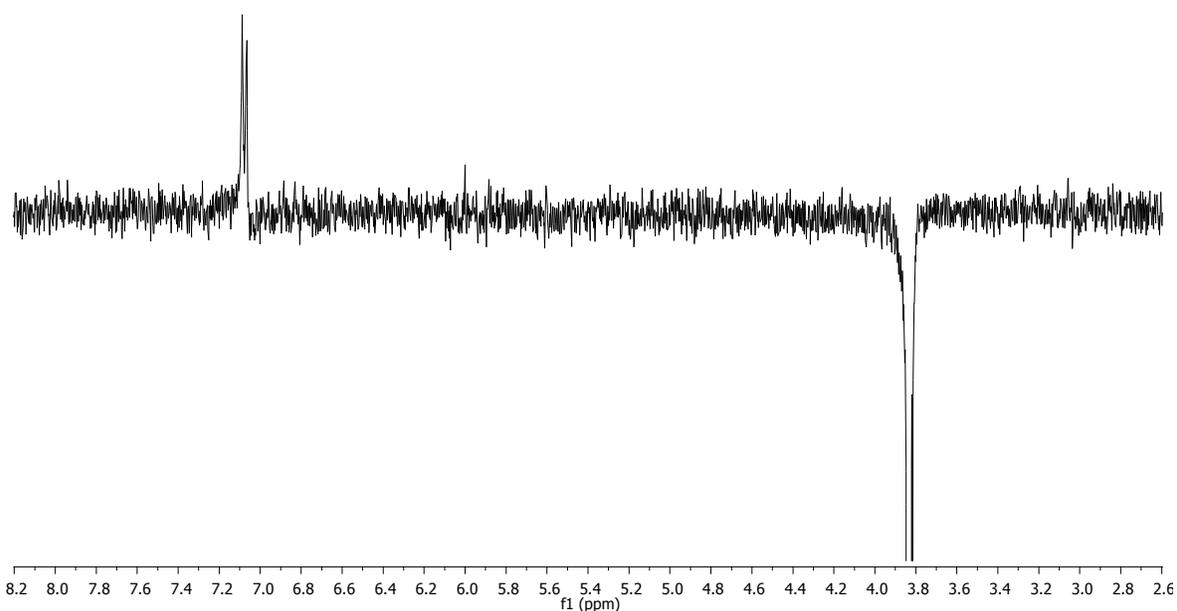


Figura 11. Región del espectro de nOe de una dimensión comprendida entre 2.6-8.2 ppm de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina, **C1**).

6.2 Elucidación estructural de 5,7-dihydroxiflavona (crisina, FIII).

El compuesto FIII, se aisló como un sólido de color amarillo soluble en una mezcla de diclorometano-acetona.

La elucidación de la estructura del compuesto FIII se realizó siguiendo una estrategia similar a la descrita para la acacetina. El análisis del espectro de RMN¹H permitió determinar que la estructura del compuesto FIII correspondía al de la crisina. Este flavonoide ha sido aislado previamente de los propóleos poplares recolectados en diferentes regiones del mundo (Salatino *et al.*, 2011).

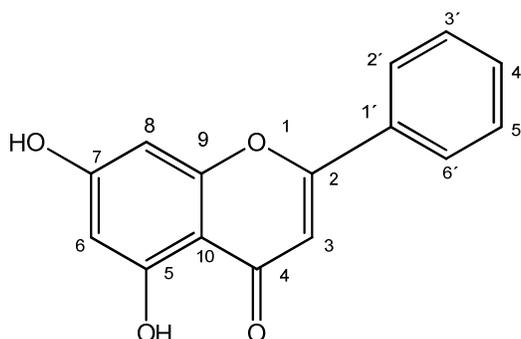


Figura 12 Estructura química de 5,7-dihidroxi flavona (crisina).

Tabla 8. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del compuesto aislado crisina en RMN-¹H y RMN-¹³C.

| Posición | Crisina | |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| | δ (J Hz) | δ |
| 2 | -- | 164.88 |
| 3 | 6.94 (1H, s) | 105.61 |
| 4 | -- | 182.31 |
| 5 | -- | 161.89 |
| 5-OH | 12.80 (1H, s) | -- |
| 6 | 6.20 (1H, d, $J= 2.0$) | 99.46 |
| 7 | -- | 163.60 |
| 8 | 6.50 (1H, d, $J= 2.0$) | 94.57 |
| 9 | -- | 157.89 |
| 10 | -- | 104.40 |
| 1' | -- | 131.14 |
| 2', 6' | 8.03-8.05 (2H, m) | 126.85 |
| 4' | -- | 132.47 |
| 3', 5' | -- | 129.58 |
| 3', 4', 5' | 7.53-7.59 (3H, m) | -- |
| 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ | | 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ |

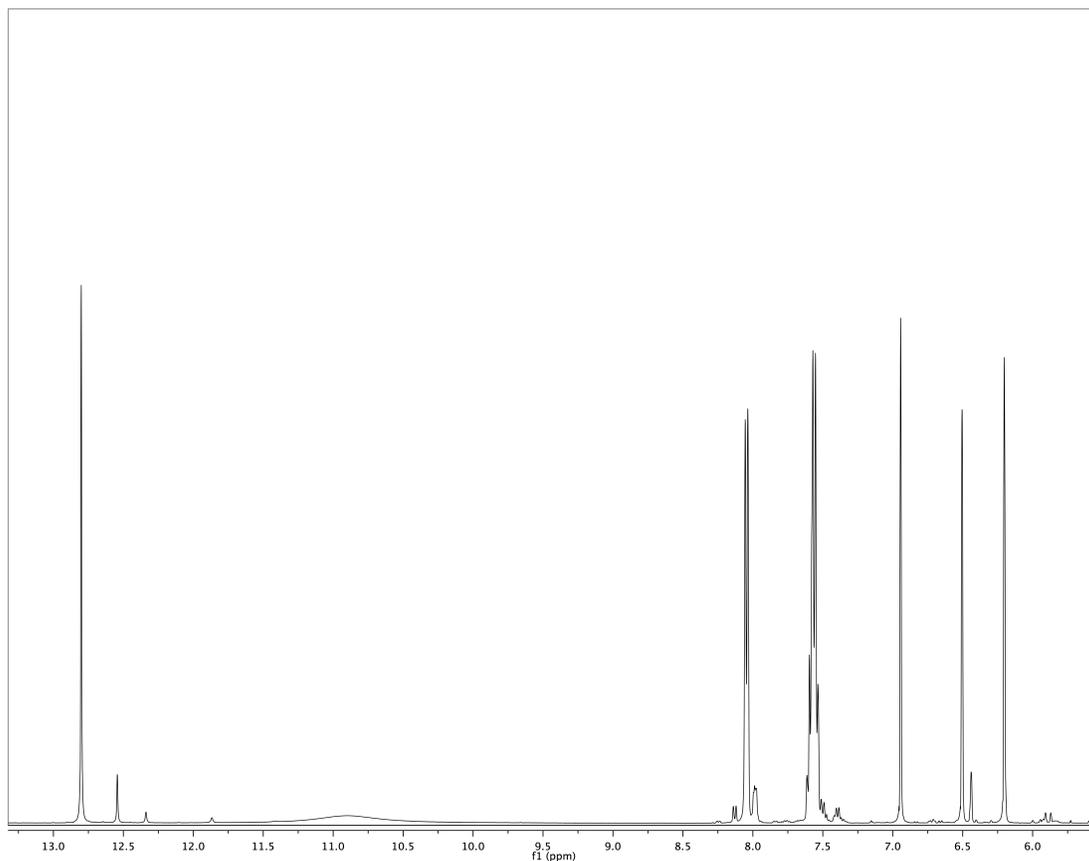


Figura 13. Espectro de RMN-¹H de la 5,7-dihidroxi flavona (crisina FIII).

6.3 Elucidación estructural de la 5,7-dihydroxiflavanona (pinocembrina, A8).

El compuesto **A8**, se aisló como un sólido cristalino de color amarillo soluble en acetona. La fórmula molecular del compuesto se estableció como C₁₅H₁₂O₄ con un P.M. de 256, con base en los espectros de RMN-H¹ (Figura 15) y espectrometría de masas (Figura 13) generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE). En esta última el ión molecular se encuentra en una relación masa carga de *m/z* 256 (100% abundancia relativa).

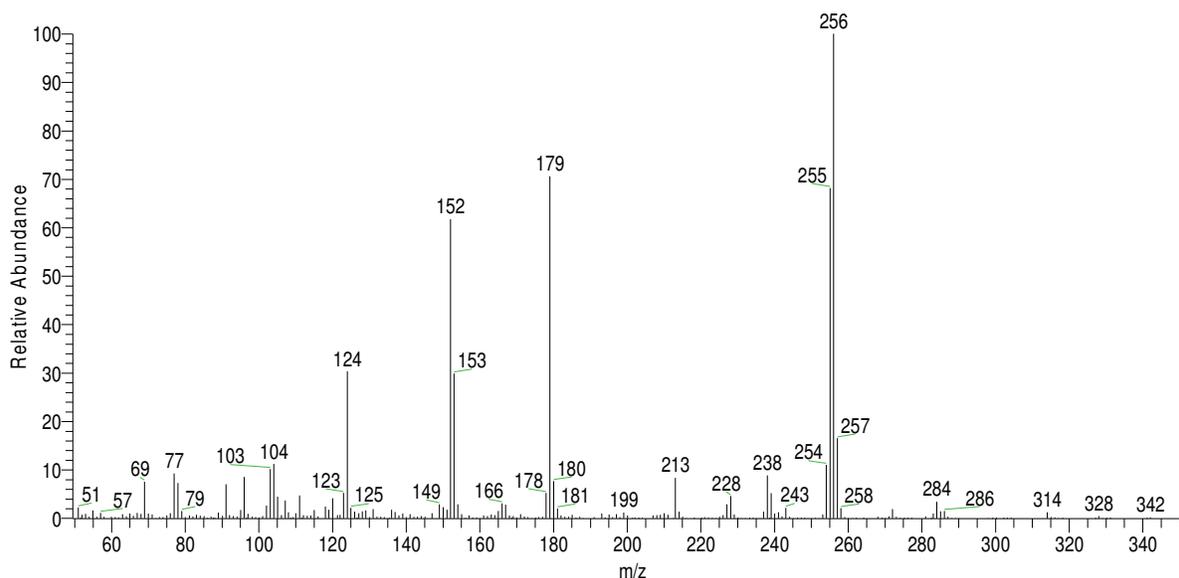


Figura 14. Espectro de masas de la 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina A8).

La estructura del compuesto A8 se realizó siguiendo una estrategia similar a la descrita para la acetina. El análisis de los espectros de masas y RMN¹H permitió determinar que la estructura del compuesto A8 correspondía al de la pinocembrina. Este flavonoide ha sido aislado previamente de los propóleos poplares recolectados en diferentes regiones del mundo (Salatino *et al.*, 2011).

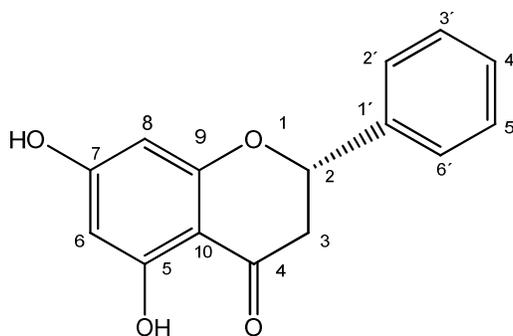


Figura 15. Estructura química de 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina).

Resultados y Discusión

Tabla 9. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del compuesto aislado pinocembrina en RMN-¹H.

| Posición | Pinocembrina | |
|--|--|--|
| | δ (J Hz) | δ |
| 2 | 5.44 (1H, dd, $J= 16.0, 4.0$) | 79.01 |
| 3 | 3a 2.76 (1H, dd, $J= 4.0, 16.0$) 3b 3.1 (1H, dd, $J= 16.0, 12.0$) | 42.75 |
| 4 | -- | 195.87 |
| 5 | -- | 164.05 |
| 5-OH | -- | -- |
| 6 | 5.90 (1H, d, $J= 4.0$) | 94.81 |
| 7 | -- | 167.00 |
| 8 | 5.93 (1H, d, $J= 4.0$) | 95.76 |
| 9 | -- | 163.22 |
| 10 | -- | 102.5 |
| 1' | -- | 138.98 |
| 2', 6' | 7.48 (2H, dd, $J= 8.0, 4.0$) | 128.27 |
| 4' | -- | 128.19 |
| 3', 5' | -- | 125.91 |
| 3', 4', 5' | 7.35-7.41 (3H, m) | -- |
| 400 MHz, metanol-d_4 | | 100 MHz, metanol-d_4 |

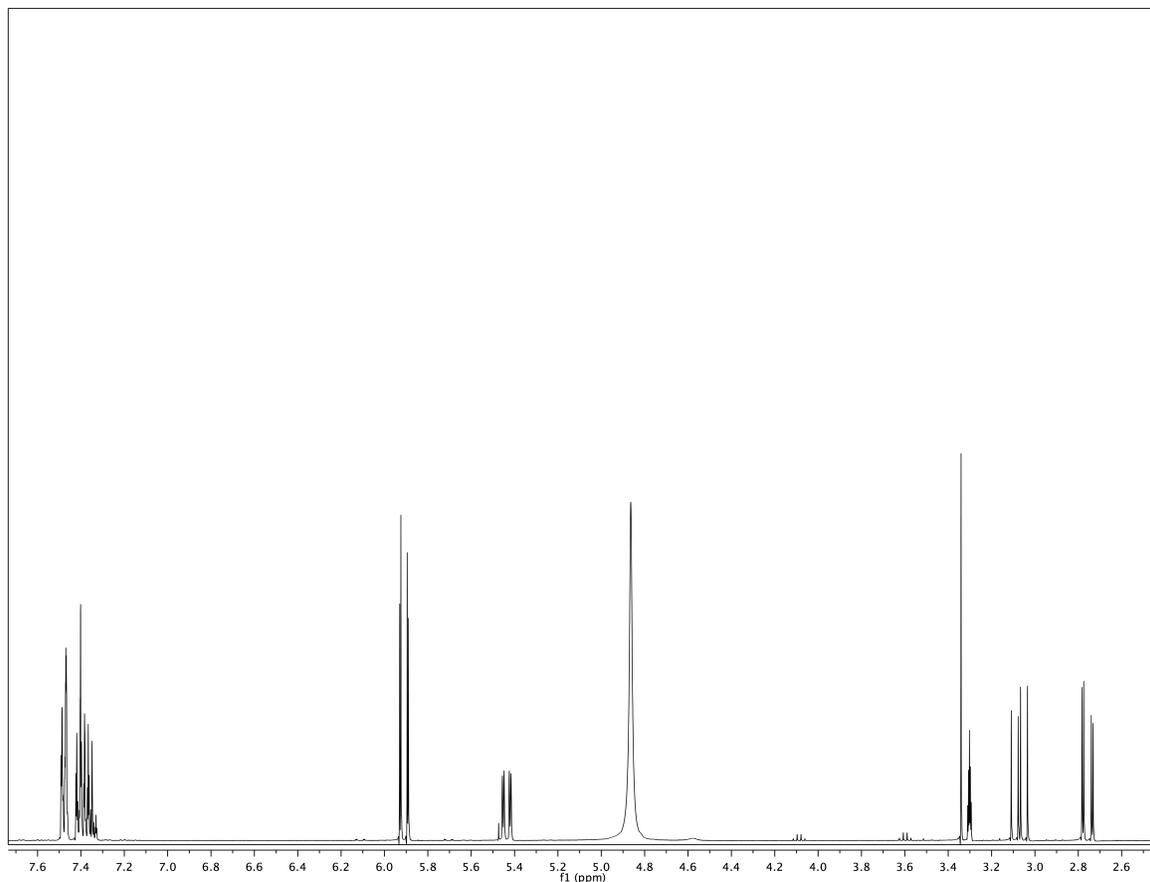


Figura 16. Espectro de RMN-¹H de la 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina A8).

La evaluación biológica se realizó solamente del compuesto mayoritario acetina, el cual se determinó utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente, obteniendo como resultados un E_{max} (%) y una CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) reportados en la Tabla 10, observando que nuestro compuesto sobrepasa los resultados obtenidos con el control positivo ACh.

Tabla 10. E_{max} (%) y CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) del flavonoide mayoritario acetina.

| Muestra | E_{max} (%) | CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------|-----------------|--------------------------------|
| Acetina | 100.0 ± 1.3 | 33.18 ± 4.2 |
| Ach | 67.6 ± 3.2 | 8.6 ± 1.4 |

En la Figura 10 se observa la relación entre el logaritmo de la concentración ($\mu\text{g/ml}$) y el porcentaje de relajación, observando que a medida que la concentración de acetina aumenta el porcentaje de relajación también lo hace, lo que nos muestra que la acetina tienen un efecto considerablemente mayor para la relajación del musculo liso vascular aislado de rata en comparación con nuestro control positivo ACh.

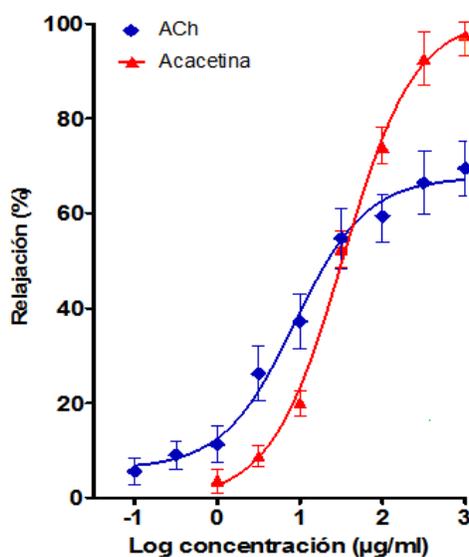


Figura 17. CCR del flavonoide mayoritarios acetina.

8. CONCLUSIONES

La evaluación biológica del extracto etanólico de propóleo presento un E_{max} de 79.3 ± 5.1 (%) y una CE_{50} de 150.4 ± 12.3 $\mu\text{g/ml}$, resultados que contribuyeron a seguir con el estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico que resultó en el aislamiento de los flavonoides, acacetina, crisina y pinocembrina. Así como la evaluación del efecto vasorrelajante en el modelo de aorta aislada de rata del compuesto mayoritario acacetina obteniendo un E_{max} de 100 ± 1.3 (%) y una CE_{50} de 33.18 ± 4.2 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos son comparables con trabajos reportados en la literatura sobre los flavonoides atribuyendo gran cantidad de actividades biológicas entre las que se encuentran los efectos antioxidante, antitrombótico y vasorrelajante (Harborne y Williams, 2000).

Es importante señalar que la presencia del flavonoide acacetina, explica de manera parcial, alguna de las propiedades que posee el propóleo.

Estudios subsecuentes sobre esta resina, podrían conducir al desarrollo de nuevos fármacos útiles para tratar enfermedades cardiovasculares, las cuales son consideradas la principal causa de muerte en el mundo.

El presente estudio es una contribución innovadora en el estudio del propóleo mexicano, tanto en su composición química como en la actividad biológica, considerando que no se han reportado estudios sobre lo ya presentado en nuestro país.

9. PERSPECTIVAS

- Continuar el estudio de los extractos etanólicos de propóleo evaluados en el presente estudio, con el fin del aislamiento de compuestos diferentes a los encontrados en este trabajo.
- Realizar la evaluación biológica de los metabolitos pendientes, crisina y pinocembrina.
- Elaboración de pruebas biológicas in vivo, lo que podría ayudar al surgimiento de nuevos medicamentos para la prevención y/o tratamiento de ECV, enfermedades que aquejan a todo el mundo.
- Establecer el mecanismo de acción vasorrelajante de los metabolitos aislados.
- Continuar con el estudio del propóleo como fuente de compuestos naturales para el tratamiento de diversos padecimientos que aquejan a la población.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriambeloston E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R. *Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta*. J Nutr. 1998; 128, 2324-33.
- Amarenco P, Labreuche J, Touboul PJ. *High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review*. Atherosclerosis 2008; 196(2):489–96.
- Ashraf A. El-Bassuony. *New Prenilated Compound from Egyptian Propolis with Antimicrobial Activity*, Rev. Latinoamer. Quím. March 2009.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P: *Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile*. Food Chem 2005; 89: 27-36.
- Beltrame Dalepranea Julio, da Silva Freitasb Vanessa, Pachecoc Alejandro, Rudnickib Martina, Aparecida Faineb Luciane, Dörrb Felipe Augusto, Ikegakid Masaharu, Salazarc Luis Antonio, Prates Onga Thomas, Parra Abdalla Dulcinéia Saes. *Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis*. Journal of Nutritional Biochemistry 23 (2012) 557–566.
- Calderone Vincenzo, Chericoni Silvio, Martinelli Cinzia, Testai Lara, Nardi Antonio, Morelli Ivano, Breschi Maria Cristina, Martinotti Enrica. *Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2004. 370: 290–298.
- Carroll KK, Guthrie N, SO FV, Chambers AS: *Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids*. En: Rice-Evans CA, Packer L. Eds. *Flavonoids in Health and Disease*. New York. Marcel-Dekker., 1998: 437-446.

Referencias Bibliográficas

- Castaldo Stefano, Capasso Francesco. *Propolis, and old remedy used in modern medicine*. Elsevier. *Fitoterapia* 73 Suppl. 1 2002. S1-S6.
- Coneac G., Gafitani E., Hadaruga D. I., Hadaruga N. G., Pinzaru I.A., Bandur G., Ursica L., Paunescu V., Gruia A. *Flavonoid Contents of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activiy*. *Chem Bull. Politechnica Univ*, 2008 Volume 53 (67), 1-2.
- Dimov V, Ivanovska N, Manolova N, Bankova V, Nikolov N, Popov S. *Immunomodulatory action of propolis*. Influence on anti-infections protection and macrophage function. *Apidologie* 22, 1991, 155–162.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. *Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships*. *Gen Pharmacol*. 1993b; 24:857-62.
- Duarte J, Pérez-Vinzcaíno F, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A: *Flavonoids and cardiovascular diseases*. En: Atta-Ur-Rahman. Ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 25, part F. Amsterdam. Elsevier., 2001: 565-605.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A Jimenez J, Tamargo J. *Vasodilatory effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle*. *Eur J Pharmacol*. 1993a; 239, 1-7.
- Ezequiel Álvarez Castro y Francisco Orallo Cambeiro. *Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea*. *OFFARM* Vol 22 Núm 11 Diciembre 2003.
- Ferriola PC, Cody V, Middleton E. *Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships*. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:1617-24.
- Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B. y Schmidt, H. H. 1999. *The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P- 450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation*. *Molecular Pharmacology*. Vol. 56: 243-253.

Referencias Bibliográficas

- Georgieva P, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. *Anticomplement activity of lysine complexes of propolis phenolic constituents and their synthetic analogs*. Zeitschrift für Naturforschung 52c, 1997; 60–64.
- González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, et al. *One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development*. Atherosclerosis 2006; 188(1):35–42.
- Lik-Cheung Cheng, Shui-Wah Chiu, Hung-Fat Tse, Paul M. Vanhoutte and Chu-Pak Lau Xin-Ling Du, Xiu-Ling Deng, Xiao-Hua Zhang, Jing-Bo Chen, Lei Chen, Xiao-Hui Xu, Gui-Rong Li, Hong-Bing Wang, Guo-Wei Qin, Man-Wen Jin, Qiang Tang, Hai-Ying Sun. *Acacetin, a Natural Flavone, Selectively Inhibits Human Atrial Repolarization Potassium Currents and Prevents Atrial Fibrillation in Dogs*. Journal American Heart Association. 2008;117:2449-2457.
- Harborne, J. B. y Williams, C. A. 2000. *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry. Vol. 55: 481-504.
- Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. *Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models*. J Ethnopharmacol 2005; 100(3):276–83.
- Ibarra M, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Lopez-Lopez J.G, Tamargo J. *Cardiovascular effects of isohamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rata tria*. Planta Med. 2002; 68:307-10.
- Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, Okihara K. *The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet*. J Food Sci 2009;74(5):H127–31.

Referencias Bibliográficas

- Ivanovska N.D, Dimov V.B, Pavlova S, Bankova V, Popov S. *Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative.* Journal of Ethnopharmacology 47, 1995a, 135–143.
- J.M. Sforcin. *Propolis and the immune system: a review.* Journal of Ethnopharmacology 113 (2007) 1–14.
- Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolčić-Bubalo A, Medić-Sarić M, Mayer L, et al. *In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells.* J Ethnopharmacol 2007;110(3):548–54.
- Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pac J Cancer Prev, 2006 Jan-Mar. 7(1):22-31.
- Ko FN, Huan TF, Teng CM: *Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from Apium graveolens in rat thoracic aorta.* Biochim Biophys Acta 1991; 1115: 69-74.
- Koya-Miyata S, Arai N, Mizote A, Taniguchi Y, Ushio S, Iwaki K, et al. *Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice.* Biol Pharm Bull 2009; 32(12):2022–8.
- Kramer MK, Kriska AM, Venditti EM, Miller RG, Brooks MM, Burke LE, et al. *Translating the Diabetes Prevention Program: a comprehensive model for prevention training and program delivery.* Am J Prev Med 2009; 37(6):505-11.
- Lotti Cinzia, Campo Fernandez Mercedes, Piccinelli Anna Lisa, Cuesta Rubio Osmany, Márquez Hernández Ingrid, Rastrelli Luca. *Chemical Constituents of Red Mexican Propolis.*J.Agric. Food Chem. 2010, 58, 2209-2213.
- 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.
- Moskaug Jo, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R: *Polyphenols and glutathione synthesis regulation.* Am J Clin Nutr 2005; 81(1): 277S-283S.

- Nader MA, el-Agamy DS, Suddek GM. *Protective effects of propolis and thymoquinone on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.* Arch Pharm Res 2010; 33(4):637–43.
- Organización Mundial de la Salud. *Prevención de las enfermedades cardiovasculares. Guía de bolsillo para la estimación y el manejo del riesgo cardiovascular.* Ginebra, 2007.
- Peña C Raul. *Propolis standardization: a chemical and biological review.* Cien. Inv. Agr. 2008 35(1): 11-20.
- Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, et al., *Endothelium- Independent Vasodilator Effects of the Flavonoid Quercetin and Its Methylated Metabolites in Rat Conductance and Resistance Arteries.* J Pharmacol Exp Ther 2002; 302(1): 66-72.
- Perez-Vizcaíno F, Ibarra M, Gogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Moreno L, Lopez-Lopez G, Tamargo J. *Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries.* J Pharmacol Exp Ther. 2002; 302:66-72.
- Rocha KK, Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Cataneo AC, Novelli EL. *Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets.* Food Chem Toxicol 2009; 47(6):1362–7.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease.* Circulation. 2000; 101:1899-906.
- Sforcin José Mauricio, Bankova Vassya. *Propolis: Is there a potential for the development of new drug?* Journal of Ethnopharmacology 133 (2011) 253-260.

Referencias Bibliográficas

- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. *Functional properties of honey, propolis, and royal jell.* J Food Sci. 2008 Nov; 73(9): R117-24.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. *The clinical implications of endothelial dysfunction.* J Am Coll Cardiol. 2003; 42:1149-60.