



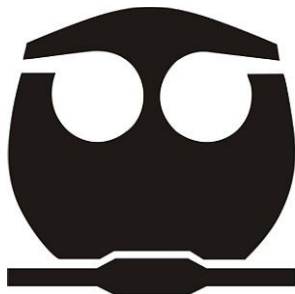
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización de la composición química y del efecto
biológico de propóleos recolectados en diferentes
apiarios y estaciones del año.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA
CRISTINA HERNÁNDEZ CAMACHO



MÉXICO, D.F.

2013



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: M. en C. JOSÉ MANUEL MENDEZ STIVALET

VOCAL: Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SECRETARIO: Dra. GLORIA DÍAZ RUIZ

1 er. SUPLENTE: Dra. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

2 do. SUPLENTE: Dr. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio **111**, Edificio **E**

Facultad de Química, UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Cristina Hernández Camacho



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.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz y las M. en C. Lilian Gabriela Valencia Turcotte y Francisca Morayna Gutiérrez Luna, por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

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

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



DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional.

A mis amigos de la Facultad, en especial a Sonia, Paty y Pancha.

**CONTENIDO**

	Página
I. ÍNDICE DE TABLAS	I
II. ÍNDICE DE FIGURAS	I
III. ÍNDICE DE GRÁFICAS	II
IV. LISTA DE ABREVIATURAS	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Propóleo.	3
2.1.1 Definición y generalidades.	3
2.2 Métodos de recolección del propóleo.	6
2.2.1 Raspado.	6
2.2.2 Rejillas.	6
2.2.3 Placas Plásticas.	6
2.2.4 Mallas.	6
2.3 Marco histórico.	7
2.4 Composición química.	8
2.5 Propiedades terapéuticas.	16
2.5.1 Actividad antibacteriana.	17
2.5.2 Actividad antiviral.	17
2.5.3 Actividad antimicótica.	18
2.5.4 Actividad antioxidante.	18
2.5.5 Actividad inmunomoduladora.	19
2.5.6 Otras actividades.	19
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	22



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
5.1 Material vegetal.	23
5.2 Obtención de los extractos etanólicos y acetónicos.	24
5.3 Obtención de la cera presente en los propóleos.	24
5.4 Obtención del bálsamo.	25
5.5 Obtención de la resina.	25
5.6 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acetónicos.	25
5.6.1 Microorganismo de prueba.	25
5.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	26
5.7 Cuantificación del contenido de flavonoides y fenoles totales presentes en los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos estudiados.	27
5.7.1 Determinación de flavonoides totales.	27
5.7.2 Determinación de fenoles totales.	28
5.8 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos estudiados.	29
5.8.1 Actividad inhibidora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH [•]).	29
5.8.2 Determinación de la actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS ^{•+}).	30
5.8.3 Determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP).	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1 Recolección de las muestras de propóleo en los diferentes apiarios y épocas del año.	32
6.2 Contenido de cera, resina y bálsamo de los propóleos estudiados.	32
6.3 Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acetónicos.	37
6.4 Contenido de flavonoides totales presentes en los extractos	38



etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos evaluados.	
6.5 Contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos.	40
6.6 Actividad antioxidante de los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos evaluados.	42
6.6.1 Actividad atrapadora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH [•]).	43
6.6.2 Actividad atrapadora del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS ^{•+}).	45
6.6.3 Capacidad reductora de hierro (FRAP).	47
7. CONCLUSIONES	50
8. PERSPECTIVAS	51
9. ANEXO I	52
10. REFERENCIAS	56



I. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo.	9
Tabla 2. Ubicación de los apiarios estudiados.	23
Tabla 3. Composición de los propóleos estudiados.	34
Tabla 4. Composición de los propóleos estudiados por Papotti y colaboradores (2012).	35
Tabla 5. Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana contra la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> de los extractos etanólicos y acetónicos de los propóleos estudiados.	38

II. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Abejas de la especie <i>Apis mellifera</i> .	3
Figura 2. Abejas <i>Apis mellifera</i> recolectando resina.	4
Figura 3. Muestra de propóleo procedente del apiario Don Nico.	4
Figura 4. Métodos de recolección de propóleos: a) método de raspado, b) método de rejillas, c) método de placas plásticas y d) método de mallas.	7
Figura 5. Productos comerciales elaborados con propóleo.	16
Figura 6. Ubicación geográfica de los apiarios estudiados.	24
Figura 7. Mapa de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano.	26



III. ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales.	27
Gráfica 2. Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales.	28
Gráfica 3. Curva de calibración para determinar la capacidad de inhibición del radical DPPH'.	29
Gráfica 4. Curva de calibración para determinar la capacidad de atrapamiento del radical ABTS ^{•+} .	31
Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de la capacidad reductora de hierro.	32
Gráfica 6. Contenido promedio de ceras, resinas y bálsamos en los propóleos estudiados.	36
Gráfica 7. Contenidos de flavonoides totales en los propóleos determinados utilizando el método de Kumazawa.	40
Gráfica 8. Contenido de fenoles totales en los propóleos determinados utilizando el método de Folin-Ciocalteu.	42
Gráfica 9. Capacidad atrapadora del radical DPPH' de los propóleos estudiados.	44
Gráfica 10. Capacidad atrapadora del radical ABTS ^{•+} de los propóleos estudiados.	46
Gráfica 11. Capacidad reductora de hierro de los propóleos estudiados.	48



IV. LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ABTS^{•+}	Radical catiónico 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio.
AlCl₃	Tricloruro de aluminio.
BHI	Infusión cerebro corazón.
CAPE	Ácido cafeico fenilester.
CHX	Gluconato de clorhexidina.
CMI	Concentración mínima inhibitoria.
DE	Desviación estándar.
D.F.	Distrito Federal.
DPPH[•]	Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
EAA/g	Equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto.
ECV	Enfermedades cardiovasculares.
EEP	Extracto etanólico de propóleo.
Ext	Extracto.
FeCl₃	Cloruro férrico.
FRAP	Capacidad reductora de hierro.
GTFs	Glucosiltransferasas.
HCl	Ácido clorhídrico.
λ	Longitud de onda.
mg EQ/g	Miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto.
mg EAG/g	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto.
µg/mL	Microgramo por mililitro.
µL	Microlitro.
mM	Milimolar.



μM	Micromolar.
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar.
Na_2CO_3	Carbonato de sodio.
Na_2SO_4	Sulfato de sodio.
nm	Nanómetros.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
TEAC	Milimoles equivalentes de Trolox® por gramo de extracto.
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro.



1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta (Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2012).

Actualmente como resultado de los recurrentes casos de efectos secundarios de los medicamentos alopáticos, al desarrollo de resistencia hacia los antibióticos y la necesidad de nuevas moléculas terapéuticas, ha aumentado el interés en los productos naturales, principalmente como fuente de nuevos agentes medicinales y alternativas para la medicina alopática, no solo en los países desarrollados si no también en los países en vías de desarrollo (Ortega y Téllez, 2010).

Es importante mencionar que México posee una gran riqueza de flora y fauna, por lo que no es de sorprender que las plantas medicinales y otros productos de origen natural forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Esto no solamente se da en el medio indígena y rural, sino también entre poblaciones mestizas, en zonas urbanas y suburbanas, como resultado de la diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de la población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos (FHEUM, 2001; Hersch-Martínez, 1996).

En la actualidad no sólo en México sino en el mundo ha incrementado la mortalidad a causa de las enfermedades crónicas degenerativas, principalmente las enfermedades cardiovasculares (ECV). Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo, y 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, 2013).



En este sentido se ha observado un incremento en la tendencia a consumir dietas saludables por parte de la población. Los productos de uso más frecuente son los suplementos alimenticios de origen natural, entre los que predominan los de tipo antioxidante. Estudios previos describen que la exposición de los organismos a factores exógenos y endógenos, genera una amplia gama de especies reactivas de oxígeno (ROS), que en condiciones anormales inducen alteraciones y pérdida de estructura/función de la célula, lo que conduce directamente a la citotoxicidad y/o indirectamente a la genotoxicidad, con numerosas anomalías graves favoreciendo las enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento acelerado, inflamación y el desarrollo de cáncer (Dasgupta y De, 2007; Tripathi *et al.*, 2007).

Cabe destacar que el consumo de alimentos funcionales está asociado con la disminución de enfermedades crónicas, debido a la presencia de compuestos bioactivos, entre los que se encuentran antioxidantes tales como vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos (Palomino, 2009a).

Tomando en cuenta este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que se enfoca en el estudio de la composición y actividad biológica del propóleo mexicano, producto apícola que ha resurgido en los últimos años por sus considerables propiedades terapéuticas.



2. ANTECEDENTES

2.1 Propóleo.

2.1.1 Definición y generalidades.

La palabra propóleo se deriva del griego “*pro*” (defensa de) y “*polis*” (ciudad o colmena), significa en defensa de la colmena (Bankova *et al.*, 2000). Es una sustancia resinosa y altamente adhesiva, que es colectada, transformada y usada por las abejas para fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores, proteger la entrada contra los intrusos, rellenar las grietas y hendiduras dentro de la colmena (Burdock, 1988; Palomino, 2009a).

Este material resinoso es colectado por las abejas de la especie *Apis mellifera* (Figura 1), para lo cual utilizan un proceso bioselector. Sus antenas detectan la fuente vegetal y recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas).



Figura 1. Abejas de la especie *Apis mellifera*.

Las abejas encargadas de la recolección del propóleo lo hacen durante las horas más cálidas del día (entre las diez de la mañana y tres de la tarde) aprovechando las altas temperaturas para facilitar la obtención de la resina que tiende a ser muy dura y friable en ausencia de calor, pero que a temperaturas de más de veinte grados centígrados se torna muy maleable (Figura 2). El material colectado se tritura, se humedece con saliva y secreciones enzimáticas, para posteriormente mezclarse con



la cera producida por las glándulas ceras de la abeja y se transporta a la colmena donde cumple sus funciones vitales. La producción del propóleo difiere en función de la variedad de abejas, el clima y el dispositivo de recolección (Farré, 2004; González y Bernal, 2002; Martínez, 2008; Peña, 2008).



Figura 2. Abejas *Apis mellifera* recolectando resina.

El propóleo (Figura 3) presenta una consistencia viscosa color verde pardo, castaño, rojo o incluso casi negro; dependiendo de su origen botánico. Se caracteriza por su sabor acre, frecuentemente amargo, olor agradable y dulce, de forma que cuando se quema se exhala una fragancia de resina aromática (González y Bernal, 2002). A temperaturas bajas es duro y quebradizo, mientras que a temperaturas altas es suave y pegajoso (Burdock, 1988).



Figura 3. Muestra de propóleo procedente del apiario Don Nico.

El propóleo se recoge de las colmenas por medio de trampas o raspado, siendo el entrampado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación, la



recolección se realiza antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales, al inicio de la estación lluviosa, cuando la propolización parece más activa (Farré, 2004).

Para proceder a la recolección del propóleo se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- No todas las razas de abejas propolizan con la misma intensidad.
- Es preferible efectuar la operación cuando hay frío, pues la sustancia se desprende con más facilidad.
- Tener precaución cuando se raspe el propóleo de las colmenas pintadas. La contaminación con pintura lo inutilizará al incorporar trazas de plomo.
- El propóleo no debe ser sometido al calor, sus valiosas propiedades son afectadas por altas temperaturas (González y Bernal, 2002).

Por otro lado, el procesamiento comercial comprende de tres pasos:

- El primer paso es la evaluación del material. Si es muy ceroso se somete a un lavado con agua fría para remover las ceras. El propóleo remanente se seca con aire en pantallas de acero inoxidable.
- El segundo paso involucra su disolución en etanol al 95%, las ceras restantes y las partes de abejas son removidas.
- El último paso involucra la filtración para eliminar cualquier otro material ajeno.

Tanto en la recolección como en el procesado deben aplicarse rigurosas normas de higiene para evitar la contaminación y la subsiguiente pérdida del valor comercial del producto (Farré, 2004; Ortega y Téllez, 2010).



2.2 Métodos de recolección del propóleo.

2.2.1 Raspado.

El propóleo se recoge en bruto de la colmena raspando las paredes con una espátula. También se utilizan rejillas especiales que al introducirse en la colmena, las abejas obreras propolizan. Posteriormente, se extraen y se retira el propóleo. Es un método que resulta bastante engorroso e inconveniente, pues las valiosas propiedades de este producto pueden ser disminuidas (Reyna, 2013).

2.2.2 Rejillas.

Consisten en una lámina de plástico con ranuras que las abejas se apresuran a rellenar con propóleos, lo que permitirá su fácil retirada y recolección. Se colocan debajo de la tapa de la colmena y una vez cubierta de propóleos, estas rejillas deben ser congeladas en la heladera para facilitar su extracción con una simple presión y desprender el propóleo de las ranuras (González y Bernal, 2002).

2.2.3 Placas Plásticas.

Son del tamaño y apariencia de un excluidor de reinas, pero con agujeros más pequeños para impedir el paso de una abeja. Se sitúan en la parte alta de la colmena en sustitución de la entretapa; al percibir la pérdida de calor que se produce en esa área, las abejas propolizan rápidamente los agujeros. Para cosechar el propóleo, se colocan las placas en el congelador por 3 a 4 horas y luego se flexionan para desprender el producto (Reyna, 2013).

2.2.4 Mallas.

Este dispositivo puede ser plástico o metal. El método consiste en cortar secciones de este material del tamaño de la superficie de la colmena y colocarlos sobre la última alza, retirándolas y congelándolas. Muchos consideran que es más económica y también más duradera, pues no se quiebra por los sucesivos cambios de temperatura y manipulación, y que las superficies son mayores, por lo que se recolecta más propóleos en cada extracción (González y Bernal, 2002). En la Figura 4 se ilustran los métodos de recolección de propóleo antes mencionados.



a)



b)



c)



d)

Figura 4. Métodos de recolección de propóleos: a) método de raspado, b) método de rejillas, c) método de placas plásticas y d) método de mallas.

2.3 Marco histórico.

Las propiedades terapéuticas del propóleo han sido reconocidas por el hombre desde épocas antiguas. De esta forma, el propóleo es uno de los pocos remedios naturales que ha mantenido su popularidad durante un largo período de tiempo (Burdock, 1988).

La referencia más lejana del propóleo data del antiguo Egipto, donde era conocido por los sacerdotes, quienes tenían en sus manos la medicina, la química y el arte de embalsamar, utilizando el propóleo como uno de los ingredientes para la conservación de las vísceras de los faraones (Domínguez, 2009).



Aristóteles ya hablaba del propóleo y lo consideró como remedio para infecciones de “piel, llagas y supuraciones”. Galeno, en el siglo II, menciona al propóleo en sus trabajos así como el filósofo Persa Avicena (Cortés, 2008).

Entre los años 1899 y 1902, en la guerra Anglo-Boer en el cono sur africano, se reportó que esta sustancia salvó de la muerte a numerosos soldados, ya que en aquel entonces se desconocían los antibióticos y sin el empleo del propóleo colocado directamente sobre las heridas muchos pacientes habrían muerto de gangrena (Martínez, 2008).

Las civilizaciones del Nuevo Mundo, también conocieron sus propiedades; se conoce que los Incas emplearon el propóleo como agente antipirético (Palomino, 2009a).

Por otra parte, en México el cuidado y aprovechamiento de los productos de las abejas, se remonta a épocas prehispánicas donde las diferentes culturas existentes tales como los Mayas, Tarascos, Lacandones, Olmecas y Populucas cultivaban a las abejas sin aguijón (Meliponinos), con fines alimenticios, medicinales y religiosos (Martínez, 2010).

Como consecuencia del posterior desarrollo de la química farmacéutica y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse. Pero recientemente, se observa un resurgir en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en biología y medicina, entre los que destacan su aplicación como suplemento dietético y en la industria farmacéutica (Farré, 2004).

2.4 Composición química.

La composición química del propóleo depende del método de recolección, varía de acuerdo a las fuentes geográficas, ya que depende de la biodiversidad de plantas y árboles; así como de la época y clima existentes en el lugar de recolección (Cortés, 2008; Evans, 1996; Papotti *et al.*, 2012).



El propóleo está constituido aproximadamente por más de trescientos compuestos diferentes. Pero se puede mencionar que generalmente los propóleos se componen por 50% bálsamo y resina, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de diversas sustancias y residuos orgánicos. Además se han identificado como los principales componentes de propóleo de diversos orígenes: fenoles, ácidos grasos, aldehídos, flavonoides, esteroides, aminoácidos, lignanos, ácidos aromáticos, ácidos diterpénicos, polisacáridos, ésteres aromáticos, cetonas, vitaminas (pro vitamina A, vitamina E, vitamina B1, B2, B3 y B6), minerales (aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, selenio, silicio, estroncio, titanio, vanadio y zinc), entre otros compuestos (Burdock, 1998; Castaldo y Capasso, 2002; Domínguez, 2009; Evans, 1996; Marcucci, 1995; Papotti *et al.*, 2012; Peña, 2008; Russo *et al.*, 2002; Walker y Crane, 1987). En la Tabla 1 se muestran algunos compuestos representativos aislados de propóleo de diversos orígenes.

Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo.

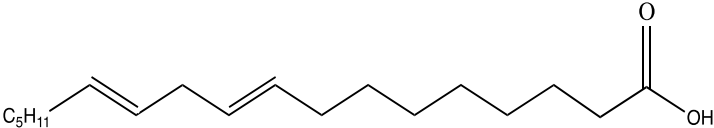
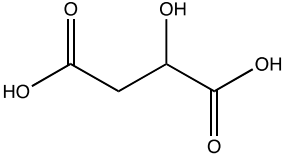
Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Ácidos grasos		
Ácido linoleico		Ataç-Uzel <i>et al.</i> , 2005. Marcucci, 1996.
Ácido málico		Kalogeropoulos, 2009.



Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo (continuación).

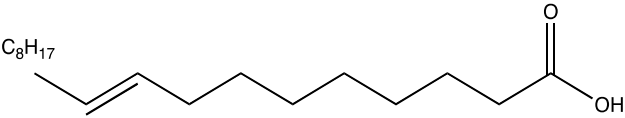
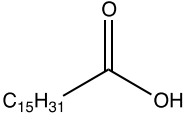
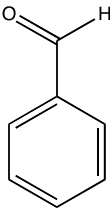
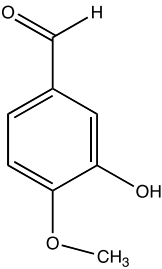
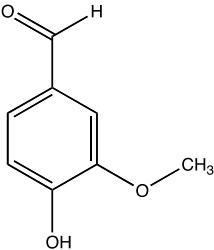
Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Ácido oleico		Ataç-Uzel <i>et al.</i> , 2005. Kalogeropoulos, 2009.
Ácido palmítico		Marcucci, 1995.
Aldehídos		
Benzaldehído		Marcucci, 1995.
Isovainillina		Walker y Crane, 1987.
Vainillina		Marcucci, 1995. Walker y Crane, 1987.



Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo (continuación).

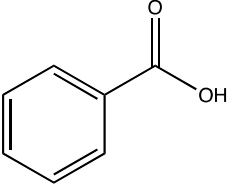
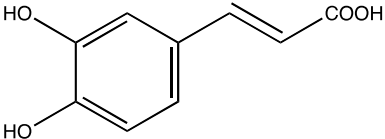
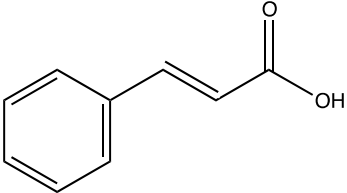
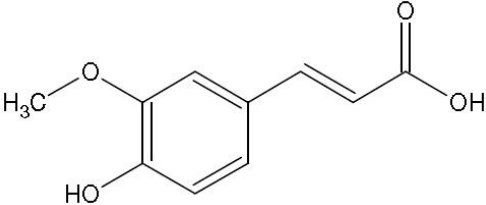
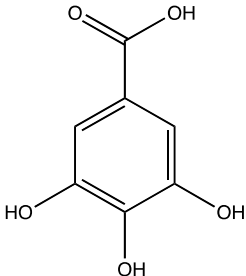
Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Ácidos aromáticos, ésteres y fenoles		
Ácido benzoico		Greenaway <i>et al.</i> , 1990. Marcucci, 1995.
Ácido cafeico		Bankova <i>et al.</i> , 1994. Gardana <i>et al.</i> , 2007.
Ácido cinámico		Marcucci, 1995. Walker y Crane, 1987.
Ácido ferúlico		García-Viguera <i>et al.</i> , 1992. Bankova <i>et al.</i> , 1998.
Ácido gálico		Marcucci, 1996. Silici, 2005.



Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo (continuación).

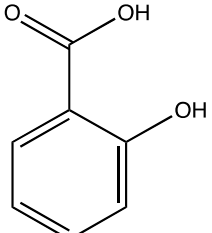
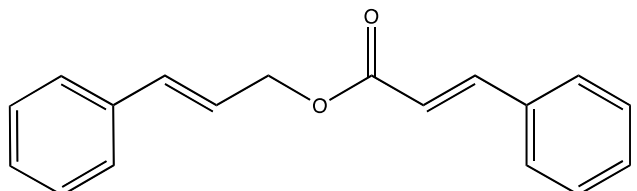
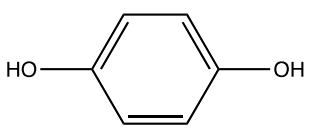
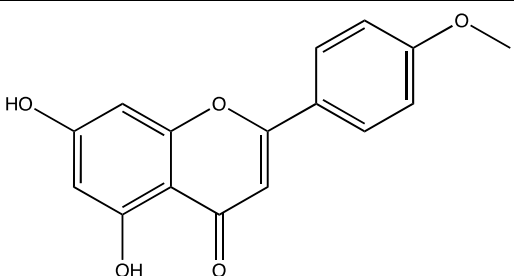
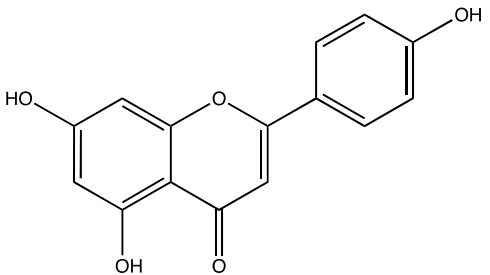
Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Ácido salicílico		Marcucci, 1995.
Cinamato de cinamilo		Popova, 2005.
Hidroquinona		Popova, 2005.
Flavonoides		
Acacetina		Silici, 2005. Walker y Crane, 1987.
Apigenina		Gardana <i>et al.</i> , 2007.



Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo (continuación).

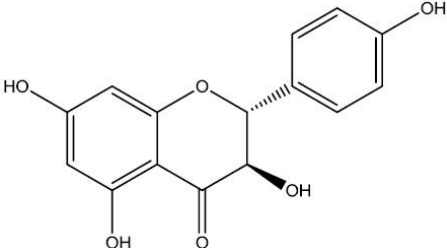
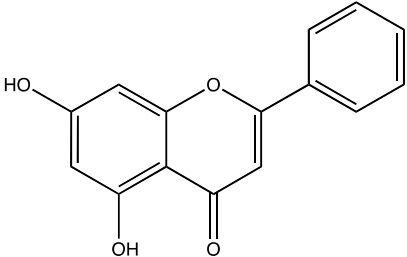
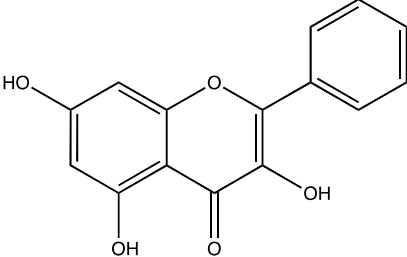
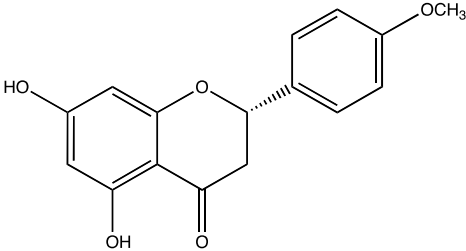
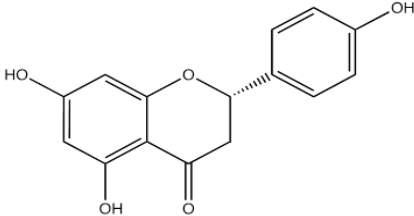
Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Canferol		Bankova <i>et al.</i> , 1983. Kalogeropoulos, 2009.
Crisina		Marucci, 1995.
Galagina		Gardana, 2007. Silici, 2005.
Isosakuranetina		Walker y Crane, 1987.
Naringenina		Ataç-Uzel <i>et al.</i> , 2005. Kalogeropoulos, 2009.



Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Pinobaskina	<chem>Oc1cc(O)c2c(c1)oc(c2=O)[C@H](O)C3=CC=CC=C3</chem>	Marucci, 1995.
Pinocembrina	<chem>Oc1cc(O)c2c(c1)oc(c2=O)[C@@H](O)C3=CC=CC=C3</chem>	Gardana, 2007. Walker y Crane, 1987.
Pinostrobrina	<chem>COc1cc(O)c2c(c1)oc(c2=O)[C@H](O)C3=CC=CC=C3</chem>	Ataç-Uzel <i>et al.</i> , 2005.
Quercetina	<chem>Oc1cc(O)c(O)c2c(c1)oc(c2=O)[C@@H](O)C3=CC(=C(C=C3)O)O</chem>	Marucci, 1995. Silici, 2005.



Tabla 1. Compuestos representativos aislados del propóleo (continuación).

Compuesto químico	Estructura química	Referencia
Lignanós		
Sesamina		Bankova <i>et al.</i> , 2000. Christov <i>et al.</i> , 1999.
Sesartenina		Christov <i>et al.</i> , 1999.
Terpenos		
Farnesol		Walker y Crane, 1987.
Geraniol		Bankova <i>et al.</i> , 2000. Walker y Crane, 1987.
Pineno		Bankova <i>et al.</i> , 2000. Borcic <i>et al.</i> , 1996.



Los compuestos identificados en los propóleos se originan de tres fuentes: los recolectados a partir de exudados de plantas, sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y materiales introducidos durante el proceso de manufactura del propóleo (Marcucci, 1995).

Por la diversidad de su composición los extractos a partir del propóleo, se realizan generalmente con disolventes como etanol, acetona, tolueno, éter, tricloroetileno y cloroformo; los cuales permiten la disolución de muchos constituyentes presentes en el propóleo (Ortega y Téllez, 2010; Papotti *et al.*, 2012).

2.5 Propiedades terapéuticas.

El propóleo es un producto natural utilizado ampliamente en la medicina tradicional por sus reconocidas propiedades terapéuticas y se ha convertido en un constituyente popular de alimentos naturistas, productos farmacéuticos y cosméticos (Figura 5).

Diversos estudios han comprobado las propiedades terapéuticas atribuidas a los propóleos, tales como actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antimicótica, anestésico local, antioxidante, anticancerígeno, inmunomodulador entre otras propiedades (Evans, 1996).



Figura 5. Productos comerciales elaborados con propóleo.



2.5.1 Actividad antibacteriana.

Se han realizado muchas investigaciones sobre la actividad antibacteriana del propóleo y de sus extractos contra cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, se ha observado que el propóleo tiene una actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y una actividad antibacteriana limitada contra bacilos Gram negativos (Lotfy, 2006). En diversos estudios se ha descrito que diferentes concentraciones de extracto etanólico de propóleo, inhibieron completamente el crecimiento de *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus brevis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus sp.* (Burdock, 1988). También se ha reportado actividad antibacteriana para *Helicobacter pylori* (Ataç-Uzel *et al.*, 2005), *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes sp.*, *Bordetella bronchiseptica* y *Serratia marcescens* (Marcucci, 1996).

La actividad antibacteriana de los propóleos se ha atribuido principalmente a los flavonoides, a los ácidos aromáticos y ésteres presentes en esta resina. La galangina, pinocembrina y pinostrobinina han sido reconocidos como los flavonoides más eficaces contra las bacterias. Además se ha descrito que el ácido ferúlico y cafeico también contribuyen a la acción bactericida del propóleo (Marcucci, 1995).

2.5.2 Actividad antiviral.

Diferentes estudios han descrito que los propóleos pueden afectar la reproducción del virus de la gripe, en particular el virus de la gripe A y B, al virus de vaccinia, y el virus del herpes aviar (Amoros *et al.*, 1992). Se observó claramente la inhibición de la propagación de virus de la polio. A una concentración de 30 µg/ml, el propóleo redujo el título de virus del herpes simple por 1000, mientras que el virus de la estomatitis vesicular y el adenovirus fueron menos susceptibles. Además de su efecto sobre la multiplicación de virus, se halló que el propóleo ejerce una acción viricida sobre el virus del herpes simple y sobre el virus de la estomatitis vesicular (Marcucci, 1995).



2.5.3 Actividad antimicótica.

Utilizado gránulos de propóleo, así como tabletas de propóleos preparadas, a concentraciones de 5 a 25 mg/ml; se observó actividad antifúngica con una u otra preparación contra *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Phialophora jeanselmei*, *Piedra hortae*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichosporon cutaneum* (Burdock, 1988).

También se ha descrito la actividad antifúngica de propóleos en diferentes cepas de la levadura del género *Candida*, las levaduras mostraron una actividad antifúngica clara con el siguiente orden de sensibilidad: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii* (Lotfy, 2006).

2.5.4 Actividad antioxidante.

En los propóleos la capacidad antioxidante se ha relacionado con la composición química de éstos y con la prevención de diversas enfermedades (Palomino, 2009a).

El propóleo es una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación. Sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad antiradicalaria y al efecto inhibidor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Farré *et al.*, 2004).

De forma particular se atribuye la actividad antioxidante principalmente al contenido de compuestos fenólicos (Palomino, 2009a), algunos compuestos antioxidantes identificados incluyen ácido ferúlico, quercetina y ácido cafeico (Peña, 2008).

A su vez la actividad antioxidante ha sido ampliamente estudiada debido a su prometedora aplicación en la medicina preventiva, ya que su consumo podría evitar o aminorar los daños causados a las células por los radicales libres, lo que conlleva al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas principalmente.



2.5.5 Actividad inmunomoduladora.

Los estudios realizados por Orsatti en el año 2010 permitieron demostrar que el extracto etanólico de propóleo, a una dosis de 200 mg/Kg durante tres días, activó en ratones los pasos iniciales de la respuesta inmune mediante la sobreexpresión de los receptores TLR-2, TLR-4 y la producción de citosinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos y las células del bazo. Esta respuesta contribuye al reconocimiento de los microorganismos y a la activación de los linfocitos por las células presentadoras de antígenos (Reyna, 2013).

2.5.6 Otras actividades.

Asimismo se han reportado otras actividades biológicas como antiulcérico, antidiabético (Sforcin y Bankova, 2011), vasoprotector (Valenzuela, 2013), antihipertensivo (Niraldo, 2005), antitumoral (Bassani-Silva *et al.*, 2007), entre otras.



3. JUSTIFICACIÓN

En muchos países una parte considerable del consumo de productos naturales no cuenta con algún tipo de regulación, México no es la excepción; ya que solo unas pocas especies vegetales y pocos productos de origen natural han sido descritos en registros que incluyen control de calidad y monografías científicas. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó a sus países miembros en su resolución WHA 42.43 de 1989, que realizaran una evaluación detallada de sus recursos terapéuticos de origen vegetal, principalmente los que se utilizan en las prácticas de medicina alternativa y complementaria. Con lo cual se busca enriquecer las Farmacopeas Nacionales.

En México, actualmente el propóleo se comercializa como componente de jarabes, jaleas, cremas, geles, caramelos, champús, aerosoles, cosméticos entre otros productos que principalmente se encuentran en tiendas naturistas. Sin embargo, no se cuenta con la información suficiente sobre la composición química y actividad biológica de los propóleos mexicanos, la cual es necesaria para establecer una regulación y parámetros de calidad que sirvan para que las instituciones regulatorias a cargo realicen un control y la verificación de dichos productos. A pesar de ello, las autoridades sanitarias han prestado poca atención a la regulación y estudio científico de los productos naturales medicinales, aunque el comercio de estos se ha incrementado de manera importante y presentan diferentes niveles de calidad.

Debido a la amplia utilización y complejidad del propóleo, en México se deben de establecer normas y parámetros de control de calidad. Tomando en cuenta que debido a que el propóleo es un producto apícola altamente variable, se debe centrar la atención en la estandarización de las técnicas de extracción y de los extractos de propóleo para así poder garantizar la actividad biológica de dichos extractos, que posteriormente pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.



Con base en lo anterior, el presente proyecto se enfoca principalmente a enriquecer el conocimiento de los propóleos mexicanos, mediante el estudio de la composición y actividad biológica de propóleos recolectados en diferentes apiarios y estaciones del año.



4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtención, caracterización de la composición química y evaluación del efecto biológico de propóleos recolectados en la zona rural del Distrito Federal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Extraer y cuantificar el contenido de cera, resina y bálsamo de propóleos obtenidos en diferentes apiarios y estaciones del año.
- ❖ Evaluar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólicos y acetónicos de los propóleos, utilizando como microorganismo de prueba a la bacteria *Streptococcus mutans*.
- ❖ Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos; utilizando el ensayo de atrapamiento del radical DPPH[•], la capacidad atrapadora del radical ABTS^{•+} y la capacidad reductora de hierro (FRAP).
- ❖ Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos, utilizando técnicas espectrofotométricas.



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal.

Las muestras de propóleo utilizadas fueron colectadas por personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Se utilizaron 12 propóleos provenientes de diferentes apiarios ubicados en la Zona Rural del Distrito Federal, los cuales se indican en la Tabla 2. Las muestras se obtuvieron utilizando el método de recolección con mallas, se realizaron tres colectas; la primera colecta fue realizada en el mes de agosto, la segunda en octubre y la tercera en diciembre del 2011. En la Figura 6, se muestra la ubicación geográfica de cada apiario estudiado.

Las muestras vegetales se desecaron, fragmentaron y se guardaron en refrigeración a -4°C.

Tabla 2. Ubicación de los apiarios estudiados.

Apiario	Ubicación	m.s.n.m*
Acuexcomatl	Delegación Xochimilco, D.F. Poblado de San Luis Tlaxialtemalco.	2240
Trojes	Delegación Tlalpan, D.F. Poblado de San Antonio Tecomitl.	2240
Don Nico	Delegación Tlalpan, D.F. Poblado de Topilejo.	2240
Bonilla	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.	2240
Búho	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.	2240
Panteón	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.	2240
Tepenáhuatl	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.	2240

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



Figura 6. Ubicación geográfica de los apiarios estudiados.

5.2 Obtención de los extractos etanólicos y acetónicos.

Para obtener los extractos se pesaron dos gramos de propóleo seco y fragmentado, se adicionaron 10 mL de etanol y se realizó la extracción con agitación constante a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, el material vegetal se dejó macerar con el etanol por un periodo de 24 horas, siguiendo la metodología descrita previamente por Papotti y colaboradores (2012) con algunas modificaciones. Por último, el extracto etanólico se filtró y se dejó secar. Adicionalmente, se obtuvo el extracto acetónico del propóleo siguiendo una estrategia similar a la descrita anteriormente para el caso del extracto etanólico.

5.3 Obtención de la cera presente en los propóleo.

Para la obtención de la cera del propóleo, se pesaron tres gramos de propóleo, los cuales se sometieron a un proceso de extracción continua (Sohxlet) por un período de dos horas y 120 mL de hexano como disolvente. Posteriormente, el extracto hexánico se concentró y se resuspendió utilizando 120 mL de etanol al 70 %, como pasos siguientes, la suspensión se calentó, se enfrió con hielo, se



filtró y la cera separada se dejó secar durante 24 horas. Siguiendo la metodología descrita por Papotti y colaboradores (2012) con algunas modificaciones. Por último se calculó el rendimiento en porcentaje. Es importante mencionar que la extracción se realizó por triplicado.

5.4 Obtención del bálsamo.

La solución remanente obtenida en la extracción de la cera, se concentró y particionó tres veces con 50 mL de diclorometano. Las fases orgánicas se reunieron, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. Posteriormente se concentraron al vacío, siguiendo la metodología descrita por Papotti y colaboradores (2012) con algunas modificaciones. Por último se calculó el rendimiento en porcentaje.

5.5 Obtención de la resina.

La resina del propóleo se obtuvo a partir del residuo del propóleo tratado con hexano. Siguiendo la metodología descrita por Papotti y colaboradores (2012) con algunas modificaciones. El método utilizado incluyó una segunda extracción en Soxhlet con una mezcla de etanol-cloroformo (1:1) por un período de dos horas, posteriormente, el extracto resultante se concentró y se calculó el rendimiento en porcentaje. La extracción de las resinas se realizó por triplicado.

5.6 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acetónicos.

5.6.1 Microorganismo de prueba.

Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos, se utilizó la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* (ATCC 10499) como microorganismo de prueba.



5.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, se colocaron en todos los pozos 100 μL de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI). Seguidamente se adicionó en los pozos de la primera línea de A hasta G 100 μL de cada muestra (2 mg/mL), en H se adicionó 100 μL del control positivo gluconato de clorhexidina (CHX al 0.12 %) y en todo el carril 12 se adicionaron 100 μL de control negativo (medio BHI). Se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 100 μL de línea en línea de la primera a la doceava línea (Figura 7). Posteriormente se adicionó a todos los pozos 80 μL de medio de cultivo BHI con 1.5 % de glucosa, y 10 μL de solución 1×10^6 UFC/mL de *Streptococcus mutans*. Las determinaciones se realizaron por duplicado, se incubaron las placas durante 24 horas a 37 °C, y posteriormente se leyeron. El valor de CMI para cada muestra analizada se definió como la mínima concentración del compuesto de prueba que limitaba la turbidez a menos de 0.05 a una absorbancia de 660 nm.

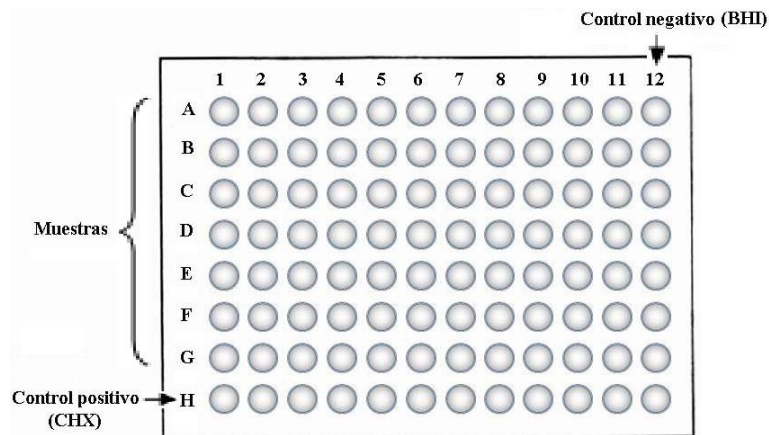


Figura 7. Mapa de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano.

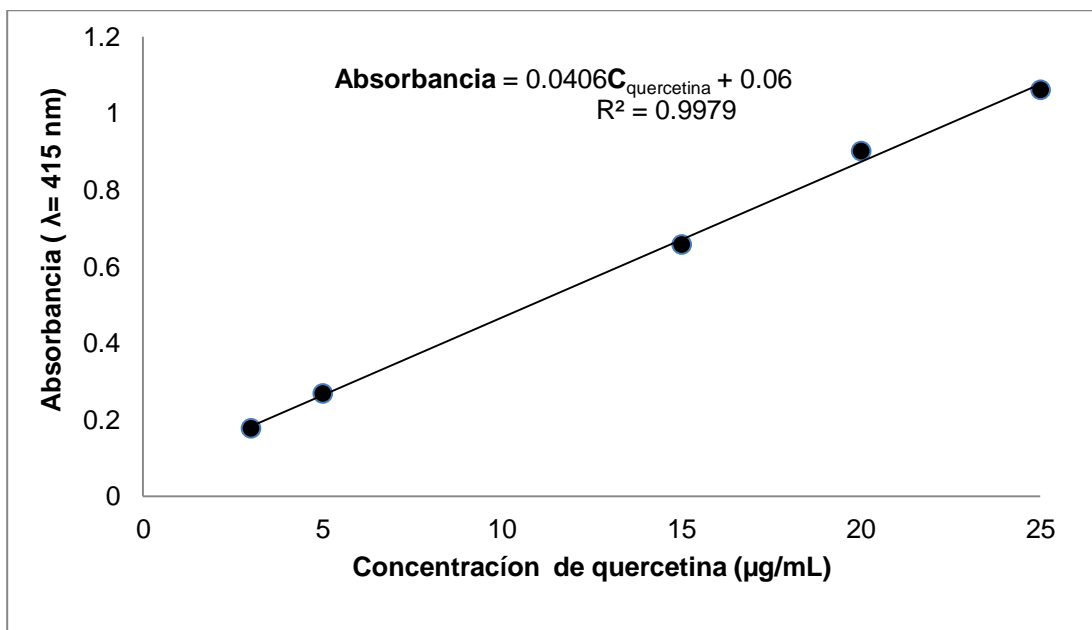


5.7 Cuantificación del contenido de flavonoides y fenoles totales presentes en los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos estudiados.

5.7.1 Determinación de flavonoides totales.

La determinación de flavonoides totales se realizó en placas de 96 pozos, siguiendo la metodología de Kumazawa y colaboradores (2004). Se adicionaron 100 μL de solución de la muestra (1 mg/mL), y 100 μL de solución etanólica de AlCl_3 al 2%. Se dejó incubar a temperatura ambiente una hora y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de ELISA BIO•RAD Benchmark. Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar correspondiente.

En la Gráfica 1, se muestra la curva de calibración de quercetina que se construyó en un intervalo de concentración entre 3-25 $\mu\text{g/mL}$, con el fin de expresar los resultados como equivalentes de quercetina por gramo de extracto ($\text{mg}_{\text{quercetina}}/\text{g}_{\text{ext}}$ o mg EQ/g).



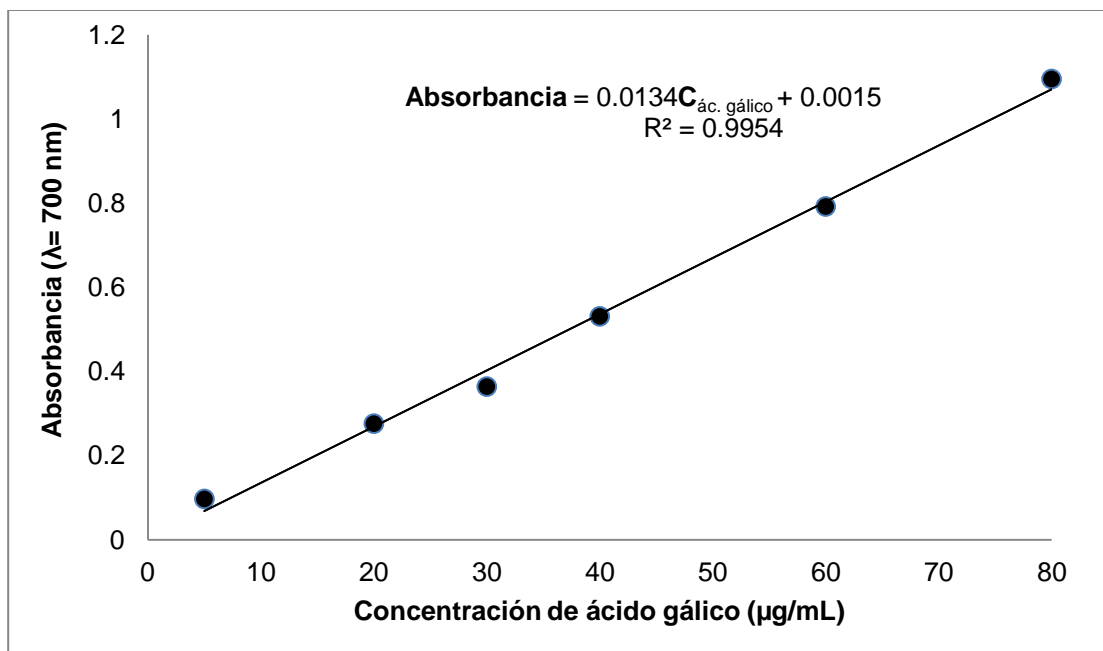
Gráfica 1. Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales.



5.7.2 Determinación de fenoles totales.

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. En placas de 96 pozos, se adicionó en cada pozo 160 μL de agua desionizada, 20 μL de solución de la muestra (1 mg/mL) y 20 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1). La mezcla resultante se agitó y se dejó reposar por 8 minutos en ausencia de luz. Posteriormente se adicionó 10 μL de Na_2CO_3 al 20%. Se incubó por una hora en ausencia de luz y se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de Elisa BIO•RAD Benchmark. Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar correspondiente.

En la Gráfica 2, se observa la curva de calibración de ácido gálico que se construyó en un intervalo de 5-80 $\mu\text{g/mL}$, con la finalidad de expresar los resultados como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto ($\text{mg}_{\text{ác.gálico}}/\text{g}_{\text{ext}}$ o mg EAG/g).



Gráfica 2. Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales.



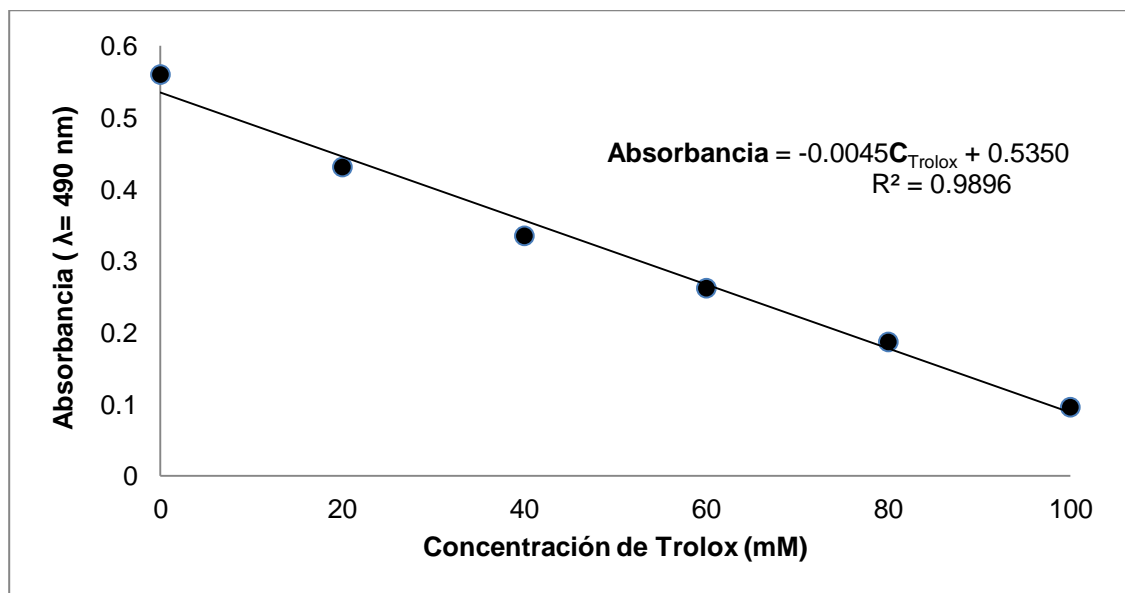
5.8 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos estudiados.

5.8.1 Actividad inhibidora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]).

Se utilizó la capacidad de atrapamiento del radical DPPH[•] para determinar la actividad antioxidante de las muestras, siguiendo la metodología descrita por Rojano y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. La determinación se realizó en placas de 96 pozos, se colocaron 100 μ L de solución de la muestra (1mg/mL) y se adicionaron 100 μ L de solución etanólica de DPPH[•] 0.208 mM. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de Elisa BIO•RAD Benchmark.

Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar correspondiente.

En la Gráfica 3, se presenta la curva de calibración del antioxidante comercial Trolox[®] que se construyó en un intervalo de concentración de 0-100 mM. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox[®] por gramo de extracto ($\text{mM}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{ext}}$ o TEAC).



Gráfica 3. Curva de calibración para determinar la capacidad de inhibición del radical DPPH[•].



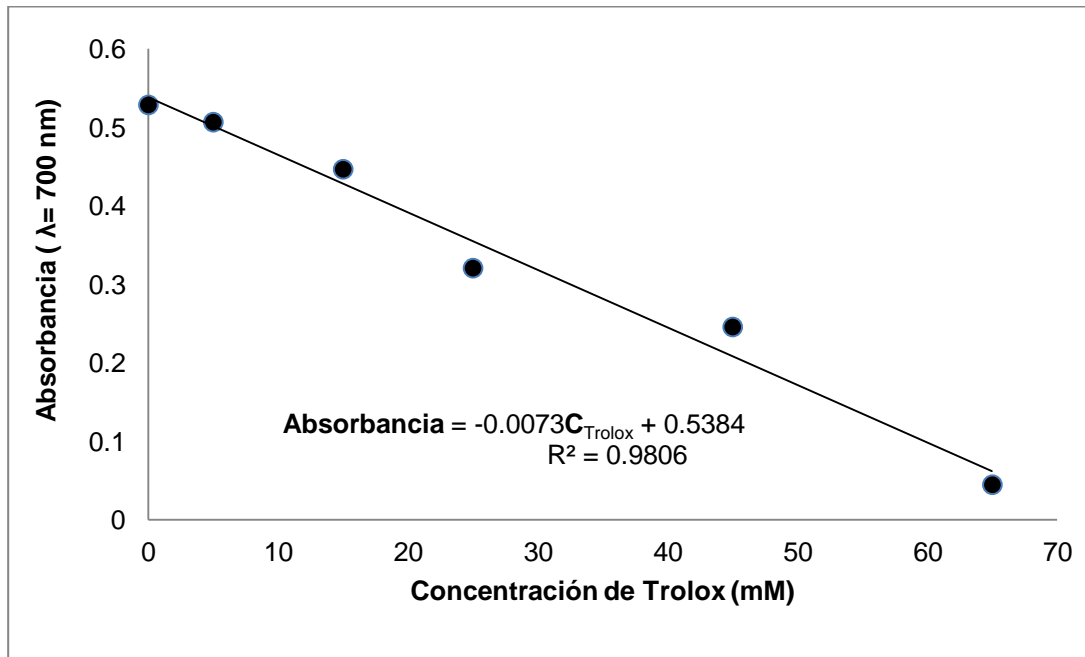
5.8.2 Determinación de la actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS^{•+}).

De acuerdo al método descrito por Kriengsak y colaboradores (2006) con algunas modificaciones. El radical ABTS^{•+} se formó por la reacción de oxidación de la solución 7mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio. La solución resultante se conservó durante 16 horas en ausencia de luz antes de su utilización. De esta forma la actividad antioxidante de las muestras, se evaluó con la capacidad de atrapamiento del radical ABTS^{•+}. La solución del radical ABTS^{•+} se diluyó con MeOH hasta obtener una absorbancia inicial de al menos 0.70 a 700 nm.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, se adicionaron 20 μ L de solución de cada muestra (1mg/mL) y se colocaron 180 μ L de la solución del radical ABTS^{•+} ajustados a la absorbancia de al menos 0.70. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 6 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de Elisa BIO•RAD Benchmark.

Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar.

En la Gráfica 4, se puede observar la curva de calibración del antioxidante comercial Trolox[®] que se construyó en un intervalo de 0-65 mM y los resultados se expresaron en equivalentes de Trolox[®] por gramo de extracto ($\text{mM}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{ext}}$ o TEAC).



Gráfica 4. Curva de calibración para determinar la capacidad de atrapamiento del radical $ABTS^{\bullet+}$.

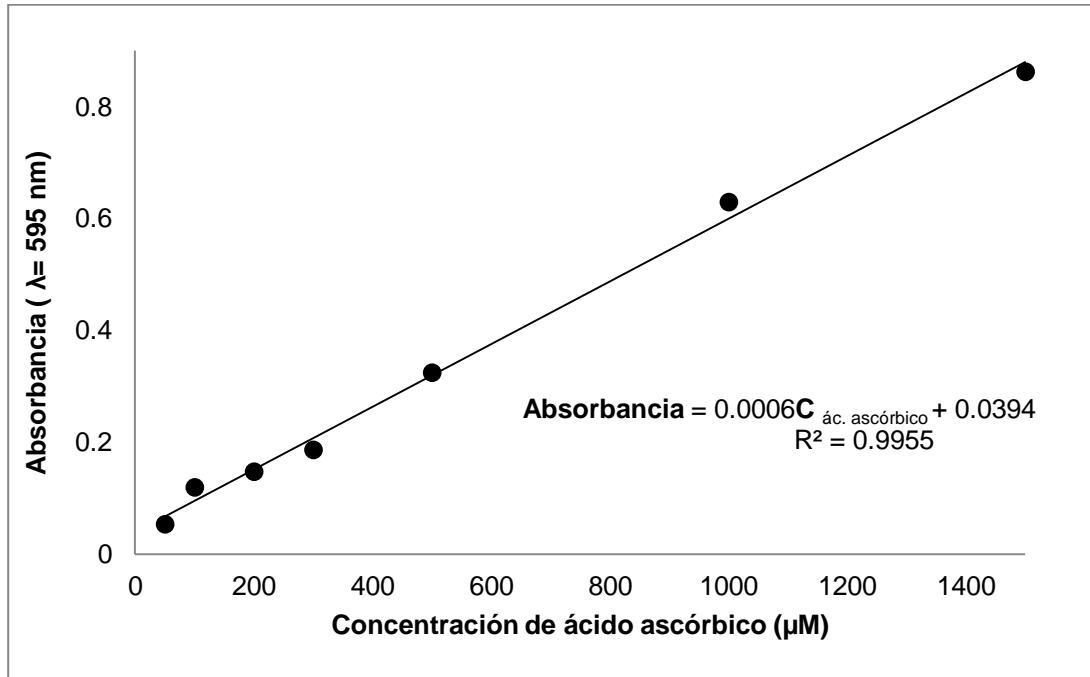
5.8.3 Determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP).

El ensayo de FRAP se efectuó utilizando la metodología descrita por Strain (1996) con algunas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos, se colocó en cada pozo 20 μ L de solución de la muestra (0.1 mg/mL), con 180 μ L de la solución del reactivo de FRAP (2.5 mL de solución 2,4,6-tripiridil-S-triazina 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 mL de $FeCl_3$ 20 mM y 25 mL de buffer de acetato 300 mM a un pH de 3.6). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se registró la absorbancia a 595 nm en un lector de Elisa BIO•RAD Benchmark.

Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar correspondiente.



En la Gráfica 5, se muestra la curva de calibración de ácido ascórbico que se construyó en un intervalo de 50-1500 μM y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto ($\text{mM}_{\text{ác. ascórbico}}/\text{g}_{\text{ext}}$ o EAA/g).



Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de la capacidad reductora de hierro.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Recolección de las muestras de propóleo en los diferentes apiarios y épocas del año.

Los propóleos objeto de estudio se recolectaron durante los meses agosto, octubre y diciembre del 2011 en apiarios ubicados en la zona rural del Distrito Federal (Delegaciones Milpa Alta, Tlalpan y Xochimilco). Las muestras presentaban en todos los casos un color café oscuro y un olor agradable. La consistencia de los propóleos era viscosa a temperatura ambiente y quebradiza a -4°C .

6.2 Contenido de cera, resina y bálsamo de los propóleos estudiados.

En la Tabla 3 se resume el contenido promedio de cera, resina y bálsamo de cada uno de los propóleos recolectados en la zona rural del Distrito Federal. Estos resultados representan el promedio de tres determinaciones independientes y se expresan en porcentajes. Como se observa en los resultados ahí resumidos los propóleos recolectados en tres diferentes épocas del año en los apiarios seleccionados presentan diferencias significativas en el contenido de ceras. Las muestras recolectadas presentaron un contenido de ceras en un rango tan amplio de 53.33 ± 2.95 a 83.28 ± 2.55 %. Estos contenidos corresponden a las muestras obtenidas del apiario Don Nico, ubicado en Topilejo delegación Tlalpan. Los apiarios Acuexcomatl, Trojes, Búho, Panteón, Tepenáhuatl y Bonilla no tuvieron un rango tan amplio en el contenido de ceras en las diferentes épocas.

Por otra parte, el contenido de resinas obtenido para los propóleos recolectados en la zona rural del Distrito Federal presentó un rango de 8.22 ± 0.64 a 18.44 ± 1.50 %. Por último, el contenido de bálsamos determinado para los diferentes propóleos se encontró entre 2.14 ± 0.64 a 11.67 ± 1.27 %.



Tabla 3. Composición de los propóleos estudiados

Propóleo		% Cera	% Resina	% Bálsamo
Colecta	Apiario			
Primera	Acuexcomatl	65.95 ± 3.07	8.80 ± 2.09	8.45 ± 2.17
	Trojes	62.03 ± 1.97	11.28 ± 2.54	7.31 ± 1.15
	Don Nico	67.37 ± 2.78	18.44 ± 1.50	6.61 ± 2.61
	Bonilla	62.45 ± 1.95	15.41 ± 2.26	8.30 ± 0.45
	Promedio	64.45 ± 2.44	13.48 ± 2.10	7.67 ± 1.96
Segunda	Don Nico	53.33 ± 2.95	16.57 ± 1.74	5.34 ± 1.38
	Búho	67.38 ± 1.00	9.84 ± 0.67	5.96 ± 1.35
	Panteón	75.82 ± 1.40	11.45 ± 1.25	5.23 ± 1.39
	Tepenáhuatl	63.63 ± 1.64	8.22 ± 0.64	11.67 ± 1.27
	Promedio	65.04 ± 1.75	11.52 ± 1.07	7.05 ± 1.35
Tercera	Acuexcomatl	68.89 ± 2.43	13.77 ± 1.28	4.33 ± 1.14
	Don Nico	83.28 ± 2.55	8.29 ± 0.13	4.02 ± 0.22
	Bonilla	69.90 ± 1.65	15.08 ± 1.06	2.14 ± 0.64
	Búho	77.17 ± 0.93	11.80 ± 0.52	3.61 ± 0.41
	Promedio	74.81 ± 1.89	12.24 ± 0.75	3.52 ± 0.60

Es importante destacar que el contenido promedio de ceras, resinas y bálsamos obtenidos para los propóleos estudiados difieren de los reportados por Papotti y colaboradores (2012) para propóleos poplares recolectados durante el verano de 2007 en Italia. En la Tabla 4 se resumen los resultados descritos por Papotti y colaboradores (2012).



Tabla 4. Composición de los propóleos estudiados por Papotti y colaboradores (2012).

Método de recolección	% Cera	% Bálsamo	% Resina
Raspado	26.4 ± 7.5	5.25 ± 1.3	56.4 ± 8.7
Cuñas	18.7 ± 8.1	4.67 ± 2.2	64.3 ± 8.1
Redes plásticas	21.9 ± 5.7	6.07 ± 0.6	60.1 ± 5.8

Al comparar los resultados descritos por Papotti y colaboradores (2012) para propóleos recolectados utilizando los métodos de raspado, cuñas y redes plásticas se puede observar claramente la influencia que tienen los métodos de recolección sobre el contenido de ceras, resinas y bálsamos.

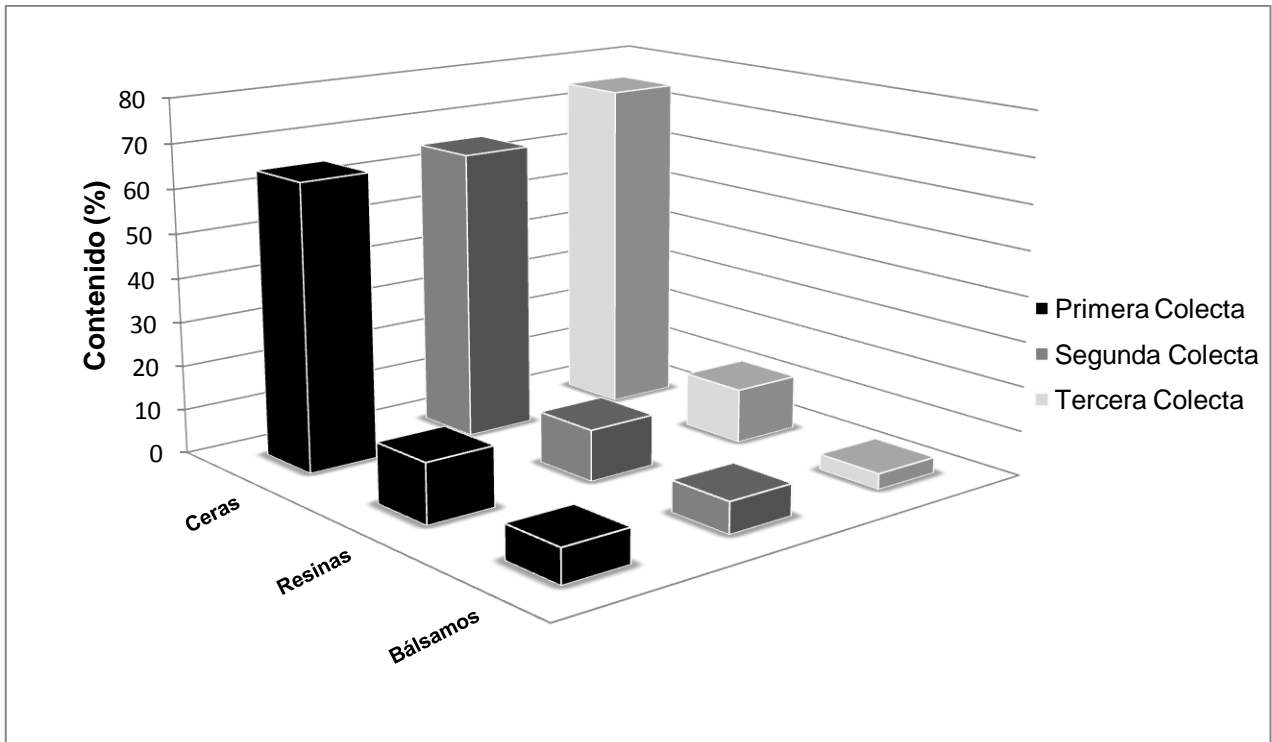
Las muestras analizadas en el presente estudio fueron obtenidas en todos los casos utilizando mallas, y los resultados obtenidos para el contenido de ceras, bálsamos y resinas nos permiten afirmar que los propóleos recolectados en la zona rural del Distrito Federal contienen menores cantidades de resinas y mayores concentraciones de ceras y bálsamos que los descritos por Papotti y colaboradores (2012). Es importante destacar que esta comparación se realizó considerando a los propóleos italianos ya que son los únicos con información completa sobre las variaciones en los contenidos de ceras, resinas y bálsamos.

Los análisis de varianza (ANOVA) realizados con la finalidad de conocer las diferencias en los contenidos de ceras, resinas y bálsamos en los propóleos estudiados permitieron determinar que las tres colectas realizadas a lo largo del año poseen diferencias significativas en el contenido de ceras. Con respecto al contenido de bálsamo se encontró una tendencia similar a la determinada para el contenido de ceras. Por último, el contenido de resinas no presentó diferencias significativas en las tres colectas realizadas. En la Gráfica 6 se resumen los resultados obtenidos para los contenidos de ceras, resinas y bálsamos.

Asimismo se observó un incremento en el contenido de ceras a lo largo del año, siendo la colecta correspondiente al mes de diciembre (tercera) la que presentó el mayor



contenido de cera. En cuanto a los bálsamos, se observó una disminución de su contenido durante las estaciones del año, siendo la tercera colecta la que presentó el menor contenido de bálsamos (Gráfica 6). Este fenómeno se explica por la escasez de flora y el endurecimiento de las resinas de los árboles durante el invierno, lo cual hace más difícil su recolección por las abejas. Otros factores que se deben considerar son los efectos del calentamiento global y la urbanización de terrenos rurales, puesto que estos factores tienen un efecto directo sobre la flora y el ciclo reproductivo de las abejas, lo cual repercute directamente sobre la composición del propóleo (González y Bernal, 2002).



Gráfica 6. Contenido promedio de ceras, resinas y bálsamos en los propóleos estudiados.



6.3 Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acetónicos.

Para la determinación de la actividad biológica de los extractos etanólicos y acetónicos, se utilizó como microorganismo de prueba a la bacteria *Streptococcus mutans*. Este microorganismo es considerado como uno de los principales agentes para la formación de caries. Esta bacteria produce glucosiltransferasas (GTFs), las cuales le dan la capacidad de sintetizar glucanos a partir de sacarosa. Estos glucanos permiten que mediante adherencia *Streptococcus mutans* y otras bacterias de la flora de la superficie de los dientes formen la placa dentobacteriana (Pimenta *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos para este ensayo indican que los extractos con mejores CMI's fueron el extracto acetónico derivado del propóleo del apiario "Don Nico" segunda colecta, con 250 µg/mL y el extracto etanólico obtenido del apiario "Acuexcomatl" tercera colecta, con 500 µg/mL. Los extractos restantes exhibieron CMI's mayores a la concentración límite de 1000 µg/mL. Es importante destacar que un extracto preparado a partir de materiales vegetales es considerado activo si presenta una CMI menor a 1000 µg/mL (Rosas-Piñón, 2012). En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de la actividad antibacteriana de los propóleos estudiados.

Estos resultados son congruentes con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, los cuales permitieron aislar a partir de muestras de propóleo recolectadas en el Altiplano mexicano compuestos de tipo flavonoide como responsables de la actividad antibacteriana (Medina, 2011; Ortega y Téllez, 2010). Entre los compuestos con actividad antibacteriana se encuentran los flavonoides pinocembrina, acacetina, apigenina y quercetina, y los ácidos cafeico y ferúlico con CMI's en un rango de 125 a 2000 µg/mL. Por otra parte, estudios realizados por otros grupos de investigación describen como compuestos activos a la pinocembrina, la pinobanksina, el 3-acetato de pinobanksina, el canferol, la galagina y el CAPE como los responsables de la actividad inhibitoria del propóleo sobre el crecimiento de *S. mutans* (Burdock, 1988; Marcucci, 1995; Koo *et al.* 2000; Duarte *et al.*, 2003; Reyna, 2013).



Tabla 5. Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana contra la bacteria *Streptococcus mutans* de los extractos etanólicos y acetónicos de los propóleos estudiados.

Propóleo		CMIs de los extractos etanólicos (µg/mL)	CMIs de los extractos acetónicos (µg/mL)
Colecta	Apiario		
Primera	Acuexcomatl	> 1000	> 1000
	Troje	> 1000	> 1000
	Bonilla	> 1000	> 1000
	Don Nico	> 1000	> 1000
Segunda	Búho	> 1000	> 1000
	Don Nico	> 1000	250
	Panteón	> 1000	> 1000
	Tepenáhuatl	> 1000	> 1000
Tercera	Acuexcomatl	500	> 1000
	Don Nico	> 1000	> 1000
	Bonilla	> 1000	> 1000
	Búho	> 1000	> 1000

6.4 Contenido de flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos, de los propóleos evaluados.

En la caracterización de los propóleos es importante determinar su contenido de flavonoides, debido a que a estos compuestos se les atribuyen numerosas propiedades terapéuticas descritas para este material vegetal.

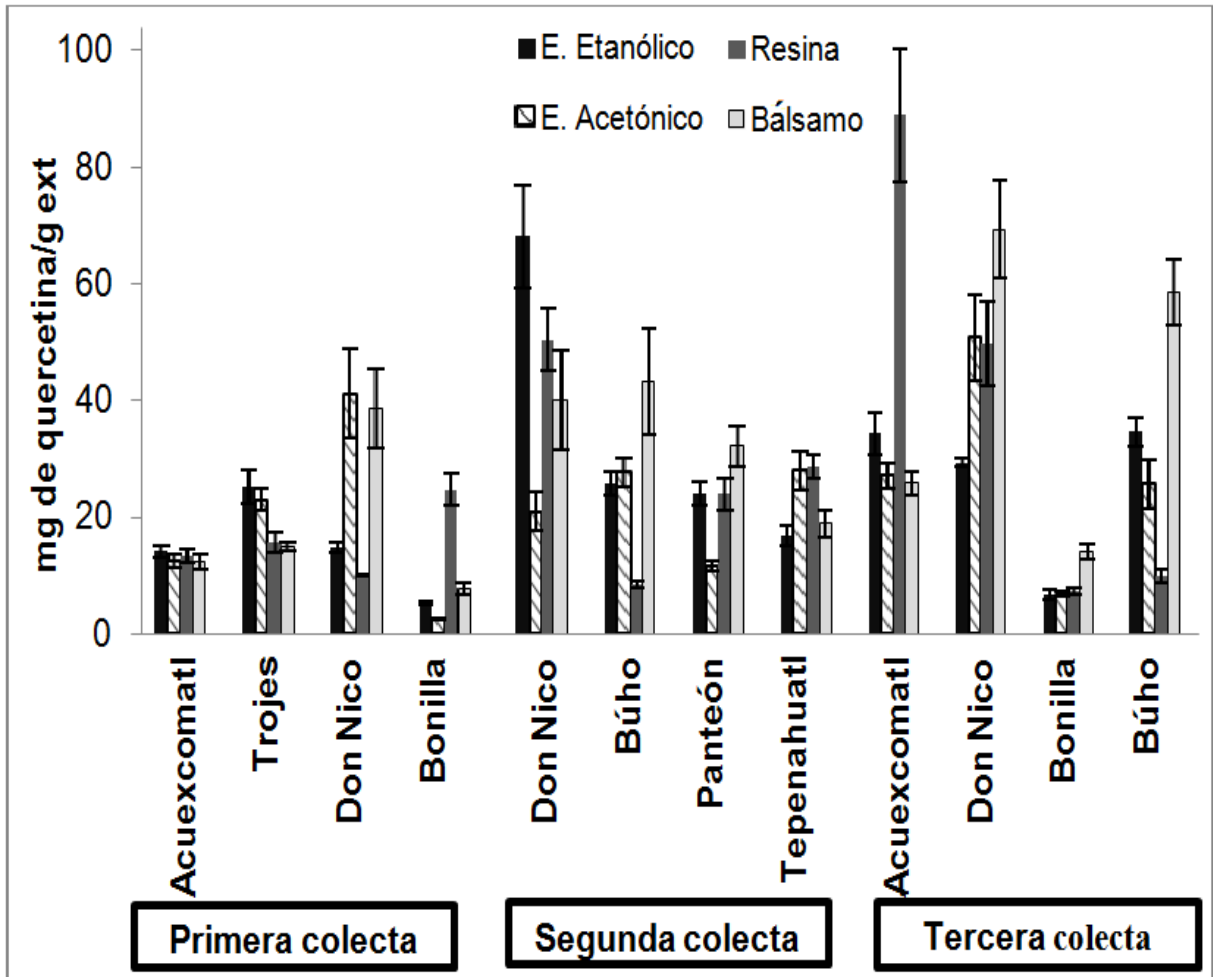
El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el método de Kumazawa, los resultados obtenidos indican que las muestras poseen concentraciones de flavonoides que varían desde 2.58 ± 0.15 hasta 88.95 ± 11.42



mg EQ/g. Como se observa en la Gráfica 7, la muestra que presentó el menor contenido de flavonoides fue el extracto acetónico del apiario “Bonilla” primera colecta y la mayor concentración de flavonoides la obtuvo la resina extraída del propóleo del apiario “Acuexcomatl” tercera colecta. Es importante destacar que las muestras recolectadas del apiario “Don Nico” presentaron los mayores contenidos de flavonoides, en cada una de las tres colectas evaluadas. Por último, los bálsamos presentaron el mayor contenido promedio de flavonoides totales en las tres colectas analizadas en los diferentes apiarios (Gráfica 7). Estos resultados son congruentes con los descritos en las normas de Argentina y Brasil, en donde se ha establecido que los propóleos y sus extractos deben contener como mínimo 5 mg EQ/g de extracto etanólico de propóleo (EEP) para ser utilizados como materia prima en el desarrollo de productos (Palomino, 2009b). Basándose en esta consideración todos los extractos etanólicos derivados de los propóleos estudiados cumplen con esta norma, ya que las concentraciones obtenidas se encuentran en un rango de 5.24 ± 0.25 a 68.15 ± 8.79 mg EQ/g.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Zarco (2012), cuyos extractos etanólicos de propóleo poseen concentraciones de flavonoides en un rango de 16.65 ± 0.01 hasta 43.64 ± 0.08 mg EQ/g.

En la Tabla A del Anexo I se muestran los resultados obtenidos para la determinación del contenido de flavonoides totales de los propóleos estudiados.



Gráfica 7. Contenidos de flavonoides totales en los propóleos determinados utilizando el método de Kumazawa.

6.5 Contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos.

El contenido de fenoles totales es otro parámetro importante para la caracterización de los propóleos, ya que estos compuestos son los principales responsables de las actividades antibacterianas y antioxidantes descritas para los propóleos.



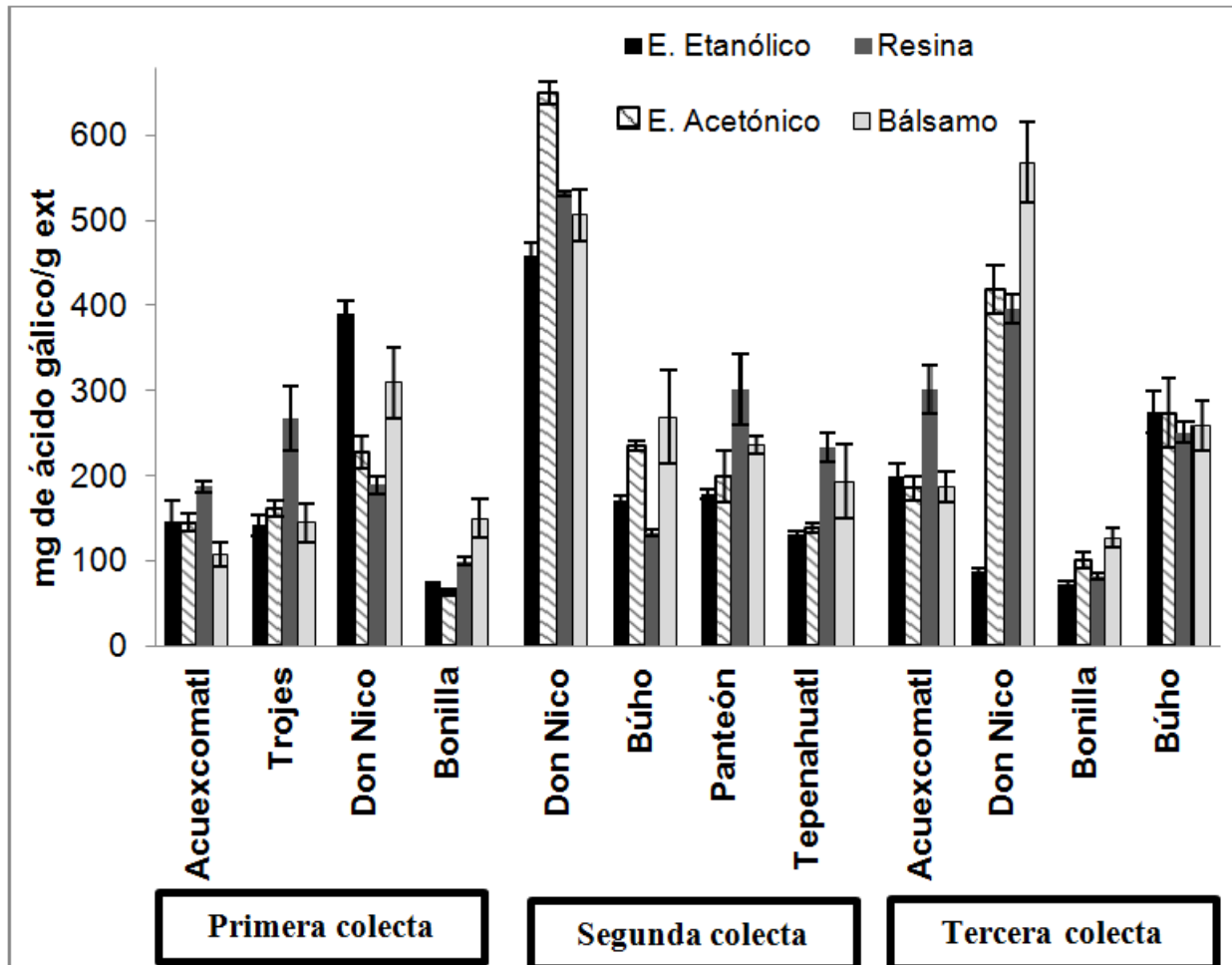
El contenido de fenoles totales se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu y los resultados indican que las muestras presentan concentraciones de fenoles en un rango de 62.84 ± 3.11 hasta 649.20 ± 13.30 mg EAG/g. Como se observa en la Gráfica 8, el menor contenido de fenoles totales se encontró en el extracto acetónico del apiario “Bonilla” primera colecta y el mayor contenido en el extracto acetónico del apiario “Don Nico” segunda colecta. Las muestras obtenidas del apiario “Don Nico” presentan en general los mayores contenidos de fenoles totales en cada una de las tres colectas estudiadas.

Por otro lado, las muestras que presentaron el mayor contenido promedio de fenoles totales fueron los bálsamos y las resinas.

El contenido de fenoles totales determinado para las muestras que se estudiaron se encuentra en el rango descrito por las normas de Argentina y Brasil. En estas normas se establece que la concentración mínima de fenoles totales debe ser de 50 mg EAG/g de EEP (Palomino, 2009b), y las concentraciones determinadas para los extractos etanólicos se encuentran en un rango de 71.70 ± 2.72 a 458.00 ± 16.41 mg EAG/g.

Por otro lado, en un estudio previo realizado por Zarco (2012) se reportó que los extractos etanólicos de propóleo estudiados tenían concentraciones de fenoles totales en un rango de 44.53 ± 0.04 hasta 115.04 ± 0.14 mg EAG/g.

En la Tabla A del Anexo I se muestran los resultados obtenidos para la determinación del contenido de fenoles totales de los propóleos estudiados.



Gráfica 8. Contenido de fenoles totales en los propóleos determinados utilizando el método de Folin-Ciocalteu.

6.6 Actividad antioxidante de los extractos etanólicos, acetónicos, resinas y bálsamos de los propóleos evaluados.

Los contenidos de fenoles y flavonoides totales en los propóleos representan un parámetro importante para establecer la calidad del material y su potencial biológico, en especial la actividad antioxidante. Se ha reportado que estos compuestos pueden actuar interrumpiendo la reacción de oxidación de lípidos, inhibiendo las reacciones de quimioluminiscencia y capturando especies reactivas



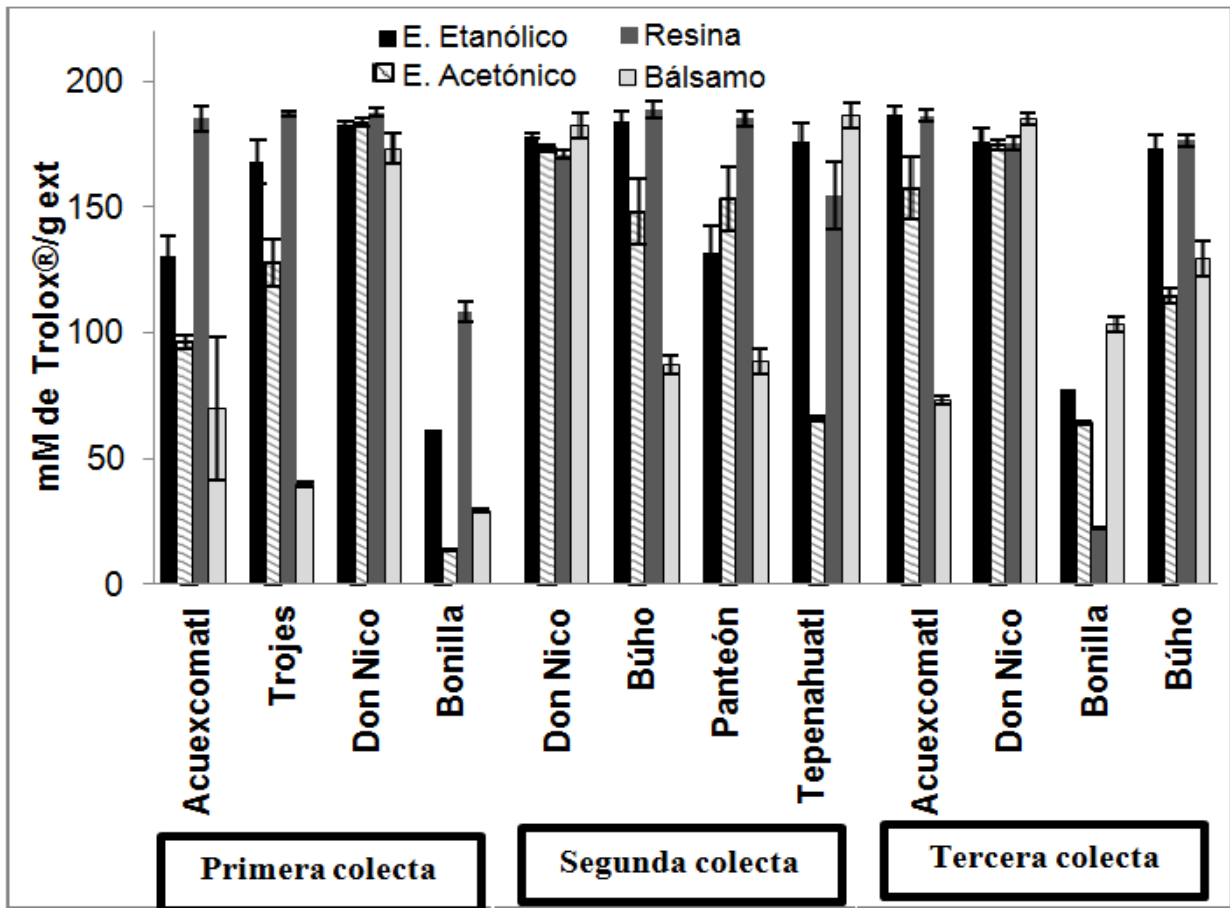
de oxígeno. Esto se debe a que los compuestos antioxidantes poseen diferentes mecanismos de acción, dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria (Palomino, 2009b).

6.6.1 Actividad atrapadora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[·]).

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad atrapadora del radical DPPH[·] para las diferentes muestras (EEP, extracto acetónico, resinas y bálsamos) indican que poseen TEACs en un rango de 13.47 ± 0.27 a 188.71 ± 3.51 . En la Gráfica 9, se puede observar que la menor capacidad atrapadora corresponde al extracto acetónico del apiario “Bonilla” primera colecta y la mayor capacidad atrapadora la presentó la resina del apiario “Búho” segunda colecta. Por otro lado, las muestras obtenidas del apiario “Don Nico” presentan en general las mayores actividades atrapadoras del radical DPPH[·], en cada una de las tres colectas evaluadas.

Por otra parte, la capacidad blanqueadora del radical DPPH[·] en el presente estudio para los extractos etanólicos se encontró en un rango de 60.31 ± 0.45 hasta 186.93 ± 2.88 TEACs. Estas capacidades superaron a las descritas para los propóleos estudiados por Zarco (2012), a los cuales, se les reportó una capacidad atrapadora en un rango de 62.21 ± 0.008 a 78.33 ± 0.003 TEACs.

En la Tabla A del Anexo I se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la actividad atrapadora del radical DPPH[·] de los propóleos estudiados.



Gráfica 9. Capacidad atrapadora del radical DPPH[•] de los propóleos estudiados.

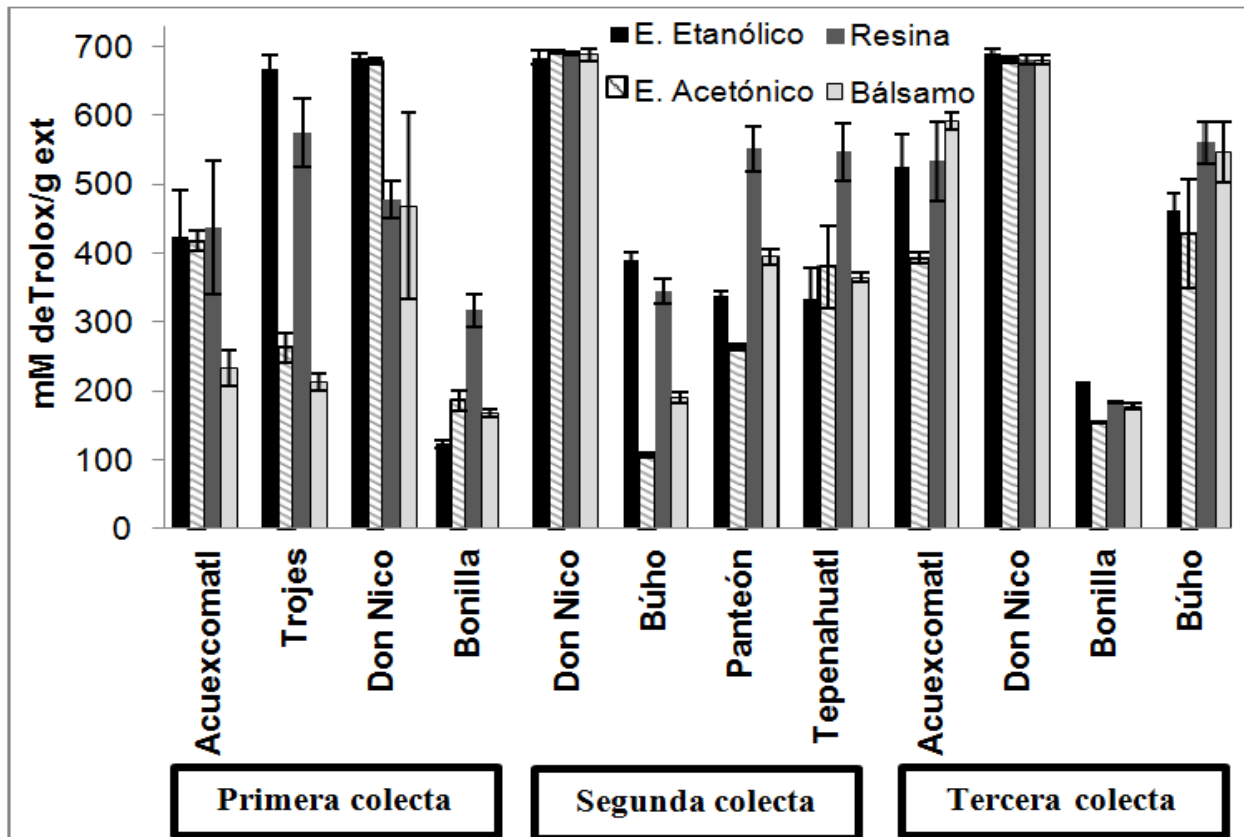


6.6.2 Actividad atrapadora del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS^{•+}).

En el caso del radical libre catiónico ABTS^{•+}, los extractos presentaron una capacidad atrapadora de radicales en un intervalo de 106.03 ± 3.45 a 691.51 ± 2.42 TEACs. En la Gráfica 10, se puede observar que la mayor capacidad atrapadora correspondió al extracto acetónico del apiario "Don Nico" segunda colecta y la más pobre corresponde al extracto acetónico del apiario "Búho" segunda colecta. Las muestras obtenidas del apiario "Don Nico" presentaron de nueva cuenta las mayores actividades atrapadoras del radical ABTS^{•+} en cada una de las tres colectas estudiadas.

Los extractos etanólicos presentaron TEACs en un rango comprendido entre 122.88 ± 5.20 y 689.59 ± 7.22 . Estos resultados presentaron una tendencia similar a los encontrados para el radical DPPH[•] cuando se compararon con los descritos por Zarco (2012), cuyos extractos etanólicos mostraron TEACs de 184.00 ± 0.016 hasta 344.83 ± 0.017 .

En la Tabla A del Anexo I se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la actividad atrapadora del radical ABTS^{•+} de los propóleos estudiados.



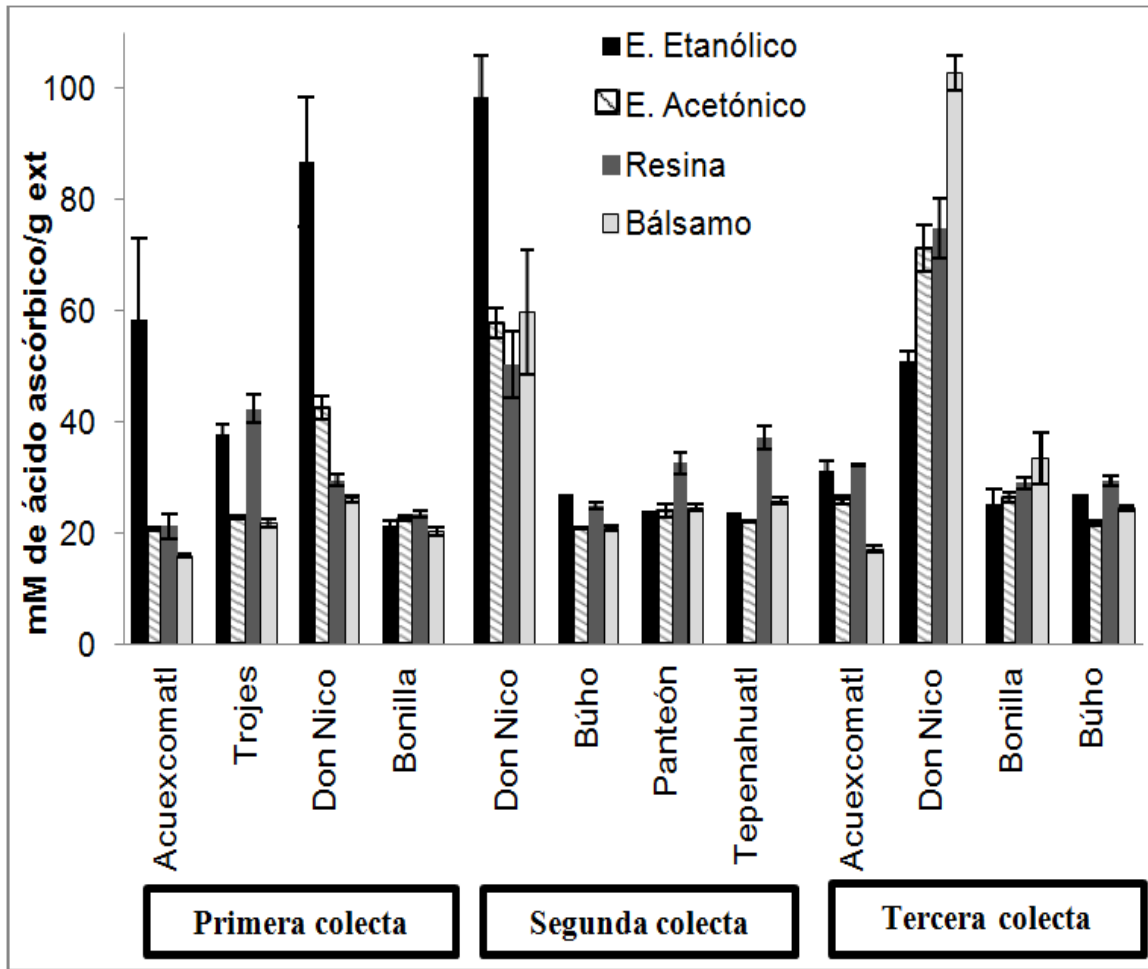
Gráfica 10. Capacidad atrapadora del radical ABTS^{•+} de los propóleos estudiados.



6.6.3 Capacidad reductora de hierro (FRAP).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad reductora de hierro por los propóleos permitieron determinar que los extractos poseían una actividad en un rango de 15.93 ± 0.30 a 102.77 ± 3.13 EAA/g. En la Gráfica 11, se puede observar que la menor capacidad reductora la presentó el bálsamo del apiario “Acuexcomatl” primera colecta y la mayor capacidad el bálsamo del apiario “Don Nico” tercera colecta. Las muestras obtenidas del apiario “Don Nico” presentaron las mejores capacidades reductoras de hierro, en cada una de las tres colectas evaluadas. Por otra parte, los extractos etanólicos y las resinas presentaron la mayor capacidad reductora promedio considerando las tres colectas.

En la Tabla A del Anexo I se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la actividad reductora de hierro de los propóleos estudiados.



Gráfica 11. Capacidad reductora de hierro de los propóleos estudiados.



Las variaciones observadas en los componentes químicos del propóleo se deben a la diversidad de las fuentes vegetales presentes en el entorno de la colmena y a la raza de las abejas, principalmente. Por otra parte, en estudios previos se reporta que aún cuando los apiarios o colmenas se ubiquen en la misma zona geográfica existen variaciones en la composición de este material vegetal (Burdock, 1988; González y Bernal, 2002).

Por último, es importante destacar que la comparación de los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante con otros valores reportados en la literatura es difícil, debido a que los métodos de obtención de los extractos son diferentes. La principal dificultad se centra en el uso de diversos compuestos de referencia y las diferentes formas de expresión de los resultados. Otra dificultad, es debida a que muchos de los resultados se reportan como porcentajes remanentes los cuales dependen del tiempo de reacción, la concentración inicial de los reactivos y la mezcla de antioxidantes en el ensayo (Cheng *et al.*, 2006; Mărghițaș *et al.*, 2013).



7. CONCLUSIONES

- ❖ Los resultados obtenidos a partir de la extracción y cuantificación de las ceras, resinas y bálsamos de las muestras de propóleos recolectadas en diferentes apiarios y estaciones del año, permiten afirmar que existe un incremento en el contenido de ceras y una disminución de los bálsamos a lo largo del año. En el caso de las resinas no se observaron variaciones significativas en las diferentes colectas.
- ❖ El extracto acetónico del apiario “Don Nico” segunda colecta, presentó la mejor actividad atrapadora del radical ABTS^{•+} con 691.51 ± 2.42 TEAC y el mayor contenido de fenoles totales con 649.20 ± 13.30 mg EAG/g. La resina del apiario “Búho” segunda colecta, demostró la mejor actividad atrapadora del radical DPPH[•] con 188.71 ± 3.51 TEAC. Por otra parte, el bálsamo del apiario “Don Nico” tercera colecta, tuvo la mayor capacidad reductora de hierro con 102.77 ± 3.13 EAA/g.
- ❖ Los extractos derivados del apiario “Don Nico” en las tres colectas tuvieron los mayores contenidos de fenoles y flavonoides totales. Por otra parte, los extractos del apiario “Bonilla” primera y tercera colecta tuvieron los menores contenidos de flavonoides y fenoles totales. La resina del apiario “Acuexcomatl” tercera colecta, presentó el mayor contenido de flavonoides totales con 88.95 ± 11.95 mg EQ/g.
- ❖ El extracto acetónico del propóleo del apiario “Don Nico” segunda colecta y el extracto etanólico del propóleo recolectado en “Acuexcomatl” tercera colecta presentaron los mejores efectos sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* con CMI de 250 µg/ml y 500 µg/mL, respectivamente.



8. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar modelos factoriales que relacionen los contenidos de ceras, resinas y bálsamos con la actividad antioxidante y los contenidos de fenoles y flavonoides totales.
- ❖ Aislar e identificar los compuestos mayoritarios presentes en las resinas y bálsamos con la mejor actividad biológica.
- ❖ Aislar e identificar los compuestos mayoritarios del extracto acetónico del apiario “Don Nico” segunda colecta.



9. ANEXO I



Tabla A. Resumen de los resultados obtenidos en la determinación del contenido de flavonoides y fenoles totales, así como los resultados de los ensayos de antioxidantes de las muestras de propóleo evaluadas.

Propóleo			Flavonoides totales (mg _{quercetina} /g _{ext} ±DE)	Fenoles totales (mg _{ác.gálico} /g _{ext} ±DE)	DPPH (TEAC) (mM _{Trolox} /g _{ext} ±DE)	ABTS (TEAC) (mM _{Trolox} /g _{ext} ±DE)	FRAP (EAA/g) (mM _{ác.ascórbico} /g _{ext} ±DE)
Colecta	Apiario	Muestra					
Primera	Acuexcomatl	Extracto etanólico	14.20 ± 1.06	145.59 ± 25.65	130.67 ± 7.59	423.42 ± 68.32	58.32 ± 14.63
		Extracto acetónico	12.53 ± 1.16	145.12 ± 10.15	96.13 ± 2.71	417.40 ± 14.29	20.72 ± 0.29
		Resina	13.50 ± 1.13	186.88 ± 7.01	185.07 ± 5.10	437.12 ± 97.67	21.22 ± 2.32
		Bálsamo	12.38 ± 1.23	107.19 ± 14.42	70.09 ± 28.42	233.42 ± 26.64	15.93 ± 0.30
	Trojes	Extracto etanólico	25.26 ± 2.91	141.67 ± 12.43	168.18 ± 8.75	668.08 ± 20.42	37.93 ± 1.72
		Extracto acetónico	22.97 ± 1.83	161.57 ± 9.34	127.87 ± 9.31	262.60 ± 21.21	22.88 ± 0.36
		Resina	15.73 ± 1.66	267.04 ± 37.45	187.20 ± 1.15	575.34 ± 49.05	42.32 ± 2.54
		Bálsamo	15.01 ± 0.78	144.81 ± 22.54	39.69 ± 1.16	211.92 ± 12.15	21.77 ± 0.72
	Don Nico	Extracto etanólico	14.89 ± 0.82	391.16 ± 14.84	182.76 ± 1.11	682.47 ± 7.08	86.77 ± 11.62
		Extracto acetónico	41.14 ± 7.57	227.40 ± 18.71	183.64 ± 1.68	679.18 ± 4.68	42.65 ± 2.02
		Resina	10.10 ± 0.23	189.00 ± 10.90	187.56 ± 1.74	478.22 ± 27.79	29.48 ± 1.09
		Bálsamo	38.60 ± 6.84	309.12 ± 41.37	173.07 ± 6.10	468.08 ± 135.64	26.15 ± 0.67
	Bonilla	Extracto etanólico	5.24 ± 0.25	71.70 ± 2.72	60.31 ± 0.45	122.88 ± 5.20	21.38 ± 0.72
		Extracto acetónico	2.58 ± 0.15	62.84 ± 3.11	13.47 ± 0.27	185.89 ± 13.85	22.65 ± 0.48
		Resina	24.76 ± 2.82	99.36 ± 5.06	108.44 ± 4.10	316.58 ± 23.69	23.38 ± 0.55
		Bálsamo	7.65 ± 1.03	149.27 ± 22.55	29.20 ± 0.56	168.08 ± 5.66	20.22 ± 0.79



Tabla A. Resumen de los resultados obtenidos en la determinación del contenido de flavonoides y fenoles totales, así como los resultados de los ensayos de antioxidantes de las muestras de propóleo evaluadas (continuación).

Propóleo			Flavonoides totales (mg _{quercetina} /g _{ext} ±DE)	Fenoles totales (mg _{ác.gálico} /g _{ext} ±DE)	DPPH (TEAC) (mM _{Trolox} /g _{ext} ±DE)	ABTS (TEAC) (mM _{Trolox} /g _{ext} ±DE)	FRAP (EAA/g) (mM _{ác.ascórbico} /g _{ext} ±DE)
Colecta	Apiario	Muestra					
Segunda	Don Nico	Extracto etanólico	68.15 ± 8.79	458.00 ± 16.41	178.31 ± 1.07	648.11 ± 9.48	98.32 ± 7.50
		Extracto acetónico	21.00 ± 3.33	649.20 ± 13.30	173.33 ± 1.53	691.51 ± 2.42	57.82 ± 2.58
		Resina	50.42 ± 5.38	531.90 ± 2.35	170.84 ± 1.50	690.14 ± 2.41	50.32 ± 6.09
		Bálsamo	40.07 ± 8.50	506.04 ± 30.49	182.22 ± 4.97	688.22 ± 9.59	59.77 ± 11.21
	Búho	Extracto etanólico	25.83 ± 1.90	170.98 ± 6.23	183.82 ± 3.92	390.96 ± 10.82	26.32 ± 0.53
		Extracto acetónico	27.70 ± 2.36	234.92 ± 6.24	148.13 ± 13.22	106.03 ± 3.45	20.98 ± 0.14
		Resina	8.49 ± 0.69	133.37 ± 3.90	188.71 ± 3.51	345.34 ± 18.09	24.88 ± 0.52
		Bálsamo	43.31 ± 9.10	268.93 ± 54.61	87.11 ± 3.60	190.96 ± 7.66	20.88 ± 0.36
	Panteón	Extracto etanólico	24.07 ± 1.89	178.03 ± 6.23	132.13 ± 10.56	338.90 ± 5.82	23.38 ± 0.35
		Extracto acetónico	11.63 ± 0.79	199.19 ± 30.38	153.02 ± 12.84	263.15 ± 4.56	24.05 ± 1.32
		Resina	24.02 ± 2.76	301.52 ± 42.15	185.07 ± 2.83	551.78 ± 32.75	32.60 ± 2.02
		Bálsamo	32.17 ± 3.56	235.70 ± 10.14	88.58 ± 5.28	395.07 ± 11.06	24.55 ± 0.55
	Tepenáhuatl	Extracto etanólico	16.83 ± 1.76	131.25 ± 2.73	175.82 ± 7.82	332.47 ± 47.22	23.32 ± 0.04
		Extracto acetónico	27.98 ± 3.25	138.85 ± 5.46	65.78 ± 1.02	380.00 ± 59.69	22.22 ± 0.15
		Resina	28.67 ± 2.10	233.35 ± 16.37	154.67 ± 13.23	547.40 ± 42.03	37.10 ± 2.09
		Bálsamo	18.92 ± 2.26	193.39 ± 36.61	186.31 ± 5.51	364.52 ± 6.69	25.82 ± 0.60



Tabla A. Resumen de los resultados obtenidos en la determinación del contenido de flavonoides y fenoles totales, así como los resultados de los ensayos de antioxidantes de las muestras de propóleo evaluadas (continuación).

Propóleo			Flavonoides totales (mg _{quercetina} /g _{ext} ±DE)	Fenoles totales (mg _{ác.gálico} /g _{ext} ±DE)	DPPH (TEAC) (mM _{Trolox} /g _{ext} ±DE)	ABTS (TEAC) (mM _{Trolox} /g _{ext} ±DE)	FRAP (EAA/g) (mM _{ác.ascórbico} /g _{ext} ±DE)
Colecta	Apiario	Muestra					
Tercera	Acuexcomatl	Extracto etanólico	34.32 ± 3.54	198.87 ± 14.80	186.93 ± 2.88	526.03 ± 45.56	31.22 ± 1.87
		Extracto acetónico	27.19 ± 2.18	185.08 ± 14.79	157.47 ± 12.20	392.74 ± 7.80	26.05 ± 0.80
		Resina	88.95 ± 11.42	301.84 ± 28.88	186.22 ± 2.29	533.42 ± 57.42	32.22 ± 0.21
		Bálsamo	25.83 ± 1.94	187.43 ± 17.91	73.47 ± 1.59	591.23 ± 12.83	17.15 ± 0.52
	Don Nico	Extracto etanólico	29.41 ± 0.58	87.92 ± 3.89	176.18 ± 5.23	689.59 ± 7.22	50.88 ± 1.77
		Extracto acetónico	50.79 ± 7.41	418.82 ± 28.13	174.67 ± 2.06	680.55 ± 4.69	71.32 ± 4.12
		Resina	49.80 ± 7.22	395.32 ± 17.19	175.29 ± 2.59	681.37 ± 7.06	74.98 ± 5.36
		Bálsamo	69.35 ± 8.26	568.25 ± 46.92	185.24 ± 2.27	680.27 ± 7.03	102.77 ± 3.13
	Bonilla	Extracto etanólico	6.71 ± 0.86	72.72 ± 3.11	76.00 ± 1.25	210.14 ± 1.64	25.22 ± 2.78
		Extracto acetónico	6.85 ± 0.41	100.14 ± 9.35	64.13 ± 0.82	153.97 ± 1.45	26.48 ± 0.93
		Resina	7.35 ± 0.63	81.88 ± 3.89	22.36 ± 0.32	183.15 ± 1.36	29.05 ± 1.09
		Bálsamo	14.05 ± 1.34	127.10 ± 11.70	103.24 ± 3.07	177.67 ± 4.78	33.48 ± 4.60
	Búho	Extracto etanólico	34.63 ± 2.54	274.65 ± 24.97	173.42 ± 5.10	463.15 ± 23.12	26.32 ± 0.40
		Extracto acetónico	25.71 ± 4.20	273.86 ± 40.57	114.67 ± 2.90	427.95 ± 79.53	21.88 ± 0.40
		Resina	9.92 ± 1.18	251.14 ± 12.48	176.36 ± 2.10	560.82 ± 30.25	29.43 ± 0.76
		Bálsamo	58.65 ± 5.64	258.97 ± 28.86	129.33 ± 6.89	546.30 ± 43.51	24.60 ± 0.46



10. REFERENCIAS

- ❖ Amoros M., Sauvager F., Girre L., and Cormier M., **1992**. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 23, 231-240.
- ❖ 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.
- ❖ Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Pureb, O., Bocari, G., **1994**. Volatile constituents of propolis. *Z Naturforsch* 49C, 6-10.
- ❖ Bankova, V., Boudourova-Krasteva, Popov, S., Sforcin, J., Cunha, S., **1998**. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 29, 361-367.
- ❖ Bankova, S., Castro, S. and Marcucci, M.C., **2000**. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- ❖ Bassani-Silva, S., Sforcin, J.M., Amaral, A.S., Gaspar, L.F.J., Rocha, N.S., **2007**. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 102, 261–265.
- ❖ Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2012.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html> Consultada el 1 de Diciembre del 2012.
- ❖ Borcic, I., Radonic, A., Grzunov, K., **1996**. Comparison of the volatile constituents of propolis gathered in different regions of Croatia. *Flavor Fragrance J*, 11, 311–313.
- ❖ Burdock, G. A., **1988**. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology.*, 36: 347 - 363.
- ❖ Castaldo, S. and Capasso, F., **2002**. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.
- ❖ Cheng, Z., Moore, J. and Yu, L., **2006**. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7429-7436.



- ❖ Christov, R., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Delgado, A., **1999**. Antibacterial furofuran lignans from Canary Island propolis. *Fitoterapia*, 70, 89–92.
- ❖ Cortés, A., **2008**. Efecto inhibitorio del extracto de propóleo sobre *Nocardia asteroides*, aislada de vacas con mastitis. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F.
- ❖ Dasgupta, N., De, B., **2007**. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, 101, 471–474.
- ❖ Domínguez, G., **2009**. Pulpotomía en dientes de la primera dentición con MTA y propóleo. Tesina de licenciatura, UNAM, México, D. F.
- ❖ Duarte, S., Koo, H., Bowen, W., Hayacibara M., Cury, J., Ikegaki, M. and Rosalen, P., **2003**. Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of *Mutans Streptococci*. *Biol. Pharm. Bull.* 26(4) 527-531.
- ❖ Evans W., **1996**. *Pharmacognosy*. Editorial Elsevier, Quinceava edición. 432, 219-220.
- ❖ Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). SSA. **2001**. México, 15.
- ❖ Farré, R. , Frasquet, I. and Sánchez, A., **2004**. El própolis y la salud. *Ars. Pharmaceutica*, 45, 21 – 43.
- ❖ Frank S., **1999**. *Botanicals a phytocosmetic desk reference*. CRC Press. USA. pp 172-173.
- ❖ Garcia-Viguera, C., Greenaway, W., Whatley F.R., **1992**. Composition of propolis from two different Spanish regions. *Z Naturforsch* 47C, 634-637.
- ❖ 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.
- ❖ Gómez-Caravaca, A., Gómez, D., Arráez-Román, Segura-Carreto, A., Fernandez-Gutierrez, A., **2006**. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and*



Biomedical Analysis 41: 1220-1234.

- ❖ González, A y Bernal, R., **2002**. Propóleos: un camino hacia la salud. Editorial Cuarto día, tercera edición México. Jalisco, 8-9, 12, 15-16, 27, 28.
- ❖ Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., **1990**. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, 71, 107-118.
- ❖ Hersch-Martínez P., **1996**. Destino común: Los recolectores y su flora medicinal, el comercio de la flora medicinal silvestre desde el suroccidente poblano. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México D.F., 50.
- ❖ Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V., **2009**. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.
- ❖ Koo, H., Gomes, B., Rosalen, P., Ambrosano, G., Park, Y. and Cury, J., **2000**. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology* 45: 141-148.
- ❖ Kriengsak T., Unaraj 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.
- ❖ Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T., **2004**. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
- ❖ Lotfy M., **2006**. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7: 22-31.
- ❖ Marcucci, M., **1995**. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- ❖ Marcucci, M.A., **1996**. Propiedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da propolis. *Química nova*, 19, 529-536.
- ❖ Mărghitaș, L., Dezmirean, D. and Bobiș O., **2013**. Important Developments in Romanian Propolis Research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2013, Article ID 159392, 9 pages.
- ❖ Martínez, C., **2008**. Efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento y el daño estructural de *Candida albicans*. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F.



- ❖ Martínez, L. Delgado, M. Rojas, N. Casillas, R., **2010**. El propóleo y las técnicas para su colecta. Notiabeja. Núm. 6.
- ❖ Martínez, C., **2006**. Estudio de parámetros alternativos como indicadores del envejecimiento y de la calidad del brandy de Jerez. Tesis, Universidad de Cádiz, España, Puerto Real.
- ❖ Medina, M., **2011**. Compuestos derivados del extracto etanólico del propóleo con actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F.
- ❖ 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.
- ❖ Organización Mundial de la Salud, 2013.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html> Consultada el 3 de Enero del 2013.
- ❖ Ortega, F. y Téllez, B., **2010**. Influencia de compuestos derivados del propóleo en la formación de biocapas mono especie por *Streptococcus mutans* y *Escheríchia coli*. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F.
- ❖ Palomino, L., **2009a**. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia.
- ❖ Palomino, L., García, C., Gil, J., Rojano, B. y Durango, D., **2009b**. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Vitae. 16(3): 388-395.
- ❖ Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L. and Plessi, M., **2012**. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60 (11): 2852-2862.
- ❖ Peña, R., **2008**. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Ciencia e Investigación agraria, 35 (1), 17-26.
- ❖ Pimenta, D., Alves, A., Morseli, A., Kenupp, J. and Cropanese, A., **2004**.



- Comparative Evaluation of in-Vitro Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. Biol. Pharm. Bull. 27(11): 1834-1839.
- ❖ 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.
 - ❖ Reyna, W., **2013**. Efecto de la zona y la época de colecta sobre la producción de marcadores químicos en propóleos de la región del altiplano mexicano. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F.
 - ❖ 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, G., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M., Sánchez-Nieto, S. y Rivero-Cruz, F., **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(3): 860-5.
 - ❖ Russo, A., Longo, R. and Vanella, A., **2002**. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galagin. Fitoterapia, 73, S21-S29.
 - ❖ Sforcin M., and Bankova V., **2011**. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. Journal of Ethnopharmacology 133, 253–260.
 - ❖ 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 Ethnopharmacology, 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.
 - ❖ Strain, J.J., Benzie, I.F.F., **1996**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239, 70–76.
 - ❖ Tripathi, R., Mohan, H., Kamat, J-P., **2007**. Modulation of oxidative damage by natural products. Food Chemistry. 100, 81–90 pagina 1.



- ❖ Valenzuela, M., **2013**. Estudio químico y actividad vasorrelajante del extracto etanólico de un propóleo recolectado en la delegación Milpa Alta. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F.
- ❖ Walker P. and Crane E., **1987**. Constituents of propolis. *Apidologie*, 18 (4), 327-334.
- ❖ WHO, **2012**. http://www.who.int/dg/speeches/2012/amr_20120314/es/ consultado el día 25/07/12.
- ❖ Zarco, G., **2012**. Estudio químico y biológico de propóleos recolectados en la zona melífera del Altiplano. Tesis de maestría, UNAM, México, D. F.