



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**Composición química de los extractos etanólicos de propóleos
recolectados en los estados de Puebla y Guanajuato. Actividad
antioxidante de los compuestos aislados**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JESSICA GRANADOS PINEDA

TUTOR: José Fausto Rivero Cruz

Facultad de Química

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2014.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Leovigildo Quijano
Vocal	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dr. José Pedraza Chaverri
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Secretario	Dr. Francisco Hernández Luis

Lugar donde se realizó la tesis:

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

Este trabajo se presentó en modalidad de cartel en la 10ª Reunión Internacional en Investigación de Productos Naturales en Mérida, Yucatán, 2014.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar los estudios de Posgrado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. Becario 273461) durante mis estudios de posgrado.

Al Dr. J. Fausto Rivero por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo de investigación y por la revisión del escrito.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito y la corrección del mismo.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los espectros solicitados durante el proyecto.

Al proyecto ICyT-PICSA 10-27.

Índice

Lista de Figuras	III
Lista de Tablas	IV
Lista de Abreviaturas	V
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1. EL PROPÓLEO	3
1.1.1. <i>Definición</i>	3
1.1.2. <i>Historia</i>	3
1.1.3. <i>Composición química</i>	5
1.1.4. <i>Usos</i>	14
1.1.5. <i>Actividad biológica y farmacológica</i>	15
1.2. ESTRÉS OXIDANTE Y ANTIOXIDANTES	18
1.3. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	20
1.3.1. <i>El endotelio y mecanismos de relajación vascular</i>	21
1.4. CARIES DENTAL	23
1.5. REGIONES APÍCOLAS EN MÉXICO	24
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	26
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	30
3.1. RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO	30
3.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE ANÁLISIS.....	31
3.2.1. <i>Análisis cromatográficos</i>	31
3.2.2. <i>Determinación de constantes espectrométricas y espectroscópicas</i>	32
3.3. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES.....	32
3.4. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES	32
3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	33
3.5.1. <i>Ensayo del blanqueamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)</i>	33
3.5.2. <i>Ensayo de blanqueamiento de β-caroteno</i>	33
3.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS DE LA CAVIDAD ORAL	34
3.6.1. <i>Microorganismos de prueba</i>	34
3.6.2. <i>Procedimiento general</i>	34
3.6.3. <i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria</i>	35
3.7. ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS EN EL ENSAYO EN AORTA AISLADA DE RATA.....	35
3.8. ESTUDIO QUÍMICO	36
3.8.1. <i>Preparación de los extractos etanólicos</i>	36
3.8.2. <i>Fraccionamiento primario de los EEP</i>	36
3.8.2.1. <i>Fraccionamiento primario del EEP de Puebla</i>	36
3.8.2.2. <i>Fraccionamiento primario del EEP de Guanajuato</i>	36
3.8.3. <i>Fraccionamiento secundario de los EEP y purificación de compuestos</i>	37
3.8.3.1. <i>Fraccionamiento secundario del EEP de Puebla y purificación de compuestos</i>	37

3.8.3.2. <i>Fraccionamiento secundario del EEP de Guanajuato y purificación de compuestos</i>	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1. <i>Contenido de fenoles totales</i>	43
4.2. <i>Contenido de flavonoides totales</i>	44
4.3. <i>Estudio químico de los EEP</i>	44
4.3.1. <i>Estudio químico del EEP de Puebla</i>	45
4.3.2. <i>Estudio químico del EEP de Guanajuato</i>	46
4.4. <i>Caracterización estructural de los metabolitos aislados</i>	47
4.4.1. <i>Caracterización estructural de la izalpinina (1)</i>	47
4.4.2. <i>Caracterización estructural de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2)</i>	50
4.4.3. <i>Caracterización estructural de los metabolitos aislados 3-9a</i>	59
4.5. <i>Evaluación de la actividad antioxidante</i>	64
4.5.1. <i>Ensayo de decoloración del radical DPPH</i>	65
4.5.2. <i>Ensayo de decoloración de β-caroteno</i>	66
4.6. <i>Determinación del efecto del extracto sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral</i>	67
4.7. <i>Actividad vasorrelajante de los extractos y compuestos en el ensayo en aorta aislada de rata</i>	70
 CONCLUSIONES	 73
 PERSPECTIVAS	 76
 ANEXO	 77
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 83
 REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	 99

Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación de las sustancias antioxidantes de acuerdo a diversos criterios.	20
Figura 2. Localización del endotelio en el vaso sanguíneo.	22
Figura 3. Relación entre la disfunción endotelial y la enfermedad cardiovascular.	22
Figura 4. Regionalización de la producción apícola en México.	25
Figura 5. Localización de Valsequillo y distribución del clima en Puebla.	30
Figura 6. Localización de Silao y distribución del clima en Guanajuato.	31
Figura 7. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico del propóleo de Puebla.	39
Figura 8. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico del propóleo de Guanajuato.	42
Figura 9. Patrón quimio-geográfico de los tipos de propóleos.	45
Figura 10a. Espectro de RMN- ¹ H de la izalpinina (1).	48
Figura 10b. Espectro de 1D-NOE de la izalpinina (1).	49
Figura 11. Espectro RMN- ¹ H de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).	52
Figura 12. Espectro RMN- ¹³ C de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).	53
Figura 13. Espectro COSY de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).	54
Figura 14. Espectro HSQC de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).	55
Figura 15. Espectro HMBC de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).	56
Figura 16. Correlaciones importantes en HMBC en la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).	56
Figura 17. Espectro 1D-NOE diferencial de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).	57
Figura 18. Curvas concentración – respuesta para algunos EEP.	71

Lista de Tablas

Tabla 1. Compuestos identificados en propóleo de distintos orígenes.	5
Tabla 2. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- ¹ H del compuesto (1).	50
Tabla 3. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- ¹ H del compuesto (2).	58
Tabla 4. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- ¹ H del compuesto (3).	59
Tabla 5. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- ¹ H de los compuestos (4) y (5).	60
Tabla 6. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN ¹ H de los compuestos (4a) y (5a).	61
Tabla 7. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN ¹ H de los compuestos (6a) y (7a).	63
Tabla 8. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN ¹ H de los compuestos (8a) y (9a).	64
Tabla 9. CMI's obtenidas para los EEP de Puebla y Guanajuato para los diferentes microorganismos de prueba.	68

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
ABTS	2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVC	Accidentes vasculares cerebrales
BHI	Infusión de cerebro y corazón (brain heart infusion)
BUN	Nitrógeno ureico en sangre (blood ureic nitrogen)
C	Concentración
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
CAPE	Fenil éster del ácido caféico
CCA	Cromatografía en columna abierta
CE_{50}	Concentración efectiva media
ccf	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG	Cromatografía de gases
CI_{50}	Concentración inhibitoria media
CL	Cromatografía de líquidos
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
d	Doble
δ	Desplazamiento químico
DE	Desviación estándar
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
EM	Espectrometría de masas
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EV	Electrón-voltios
FR-CLMP	Cromatografía líquida de mediana presión en fase reversa
g	Gramos
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSP	Glutación peroxidasa
h	Hora
J	Constante de acoplamiento
IE	Impacto electrónico
Kg	Kilogramo
KIM-1	Molécula de daño renal-1 (Kidney Injury Molecule-1)
λ	Longitud de onda
L	Litro
LDH	Lactato deshidrogenasa
μ	Micro
m	Metro
MeOH	Metanol

µg	Microgramos
mg	Miligramos
min	Minuto
µL	Microlitro
µmol	Micromol
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MHz	Megahertz
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanómetro
NO ⁺	Catión nitrosonio
NO ⁻	Anión nitrosilo
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONS	Óxido nítrico sintasa
PDE	Fosfodiesterasa
Phe	Fenilefrina
PKC	Proteína cinasa C
ppm	Partes por millón
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
s	Segundo
SOD	Superóxido dismutasa
t	Tiempo
TLR	Receptores tipo Toll
TOF	Tiempo de vuelo (<i>time of flight</i>)
TMS	Trimetilsilano
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta

RESUMEN

El propóleo posee efectos benéficos en la salud del hombre por lo que desde tiempos ancestrales se ha usado ampliamente, especialmente en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades. Su composición depende de la zona de recolección, la época, la flora, entre otros factores. A la fecha se han aislado compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides, azúcares y aminoácidos de propóleos de diferentes orígenes de todo el mundo. Estos compuestos son los que le confieren la variedad de actividades farmacológicas observadas.

En este marco de referencia en el presente proyecto, se propuso la investigación de la composición química, la capacidad antioxidante, actividad antibacteriana y efecto vasorrelajante de extractos de propóleos de las zonas melíferas del Altiplano.

En este trabajo de investigación se describe el estudio químico de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de Puebla y Guanajuato. Se encontró que el contenido de fenoles totales y flavonoides es considerable en la muestra procedente de Puebla y no así para la de Guanajuato. Posteriormente se determinó el efecto de los EEP sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*. Por otra parte, mediante el uso de distintos tipos de cromatografía se logró el aislamiento de los flavonoides izalpinina (1), 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2), galangina (3), pinocembrina (4) y crisina (5) del EEP de Puebla. En tanto que del EEP de Guanajuato se aisló galangina (3), pinocembrina (4), crisina (5), alpinetina (4a), 5-O-metilpinobanksina (5a), dillenetina (6a) isorhamnetina (7a), 5-O-metilgalangina (8a) y 5-O-metilcrisina (9a).

La capacidad antioxidante de los EEP y de los compuestos mayoritarios se evaluó mediante los ensayos de captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·) y decoloración de β -caroteno. Asimismo se probó el efecto de los EEP y los compuestos mayoritarios sobre la aorta aislada de rata, encontrando que tienen un potencial efecto vasorrelajante.

ABSTRACT

Propolis has beneficial effects on human health thus it has been widely employed since ancient times, especially in folk medicine for the treatment of diseases. Its composition varies according to the collection site, local flora, and season. Many constituents of propolis have been reported such as phenolics, terpenoids, steroids, sugars and aminoacids. These substances are responsible for the biological activity displayed by propolis.

This dissertation was designed to investigate the chemical composition, antioxidant, antibacterial, and vasorelaxing activity of two samples of propolis collected in the Mexican Altiplano (Central Mexico).

On this research work is described the chemical study of the ethanolic extracts of propolis (EEP) from Puebla and Guanajuato. It was found that the phenolics in the sample from Puebla are higher than those from Guanajuato. Afterwards, the effect of the EEP on mouth pathogenic bacteria *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*. On the other hand, the ethanolic extract was fractionated by means of chromatographic separation to isolate nine known flavonoids: izalpinin (**1**), 2',6'-dihidroxi-4'-metoxychalcone (**2**), galangin (**3**), pinocembrin (**4**) y chrysin (**5**) of the EEP from Puebla. Meanwhile the EEP from Guanajuato yielded galangin (**3**), pinocembrin (**4**), chrysin (**5**), alpinetin (**4a**), 5-O-methylpinobanksin (**5a**), dillenetin (**6a**) isorhamnetin (**7a**), 5-O-methylgalangin (**8a**) y 5-O-methylchrysin (**9a**).

The free radical-scavenging activity of EEP, the reference sample (Trolox) and the pure compounds was evaluated through the DPPH bleaching assay and β -caroten bleaching assay. It was found a vasorelaxant effect of the EEPs and pure compounds evaluated with the rat isolated aorta.

1. ANTECEDENTES

1.1. El propóleo

La palabra propóleo proviene de los vocablos griegos *pro* que significa “en frente de” y *polis* que significa “comunidad o ciudad”, por lo que se puede interpretar como “en defensa de la ciudad” (Ghisalberti, 1979; Wagh, 2013) y nos da una idea del importante papel de esta sustancia en la colmena.

También conocido como “pegamento de las abejas”, es aromático y de color variable desde amarillo-verdoso hasta café, es suave y pegajoso a temperaturas elevadas, en cambio, a temperaturas bajas y con el paso del tiempo se endurece (Lotfy, 2006).

1.1.1. Definición

El propóleo es un producto natural de la colmena producido por las abejas, las cuales recolectan resinas balsámicas secretadas por distintos árboles y plantas para después mezclarlas con cera y secreciones salivales propias (Vecchi, 2007).

1.1.2. Historia

Los antiguos egipcios representaron las abejas productoras de propóleo en vasijas y ornamentos para usarlos para aliviar varias afecciones (Langenheim, 2003). Además aprendieron de las abejas el uso como embalsamante (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

Los judíos consideraban el propóleo como medicina, lo conocían como "tzori" y es mencionado en el Antiguo Testamento. El bálsamo de Gilead es prácticamente igual al propóleo, es descrito como un regalo de la reina Sheba al rey Salomón. Era uno de los componentes del incienso especial que se usaba a diario en el Templo Sagrado de Jerusalén (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

En el noveno libro de *Historia Animalium*, el autor anónimo hace observaciones del propóleo como parte del panal de las abejas, lo menciona como una sustancia oscura, un tipo de deshecho o subproducto de la cera, con olor pungente, que cura

moretones y llagas (Crane, 1999). Se dice que Hipócrates lo usaba para curar úlceras y heridas, tanto internas como externas (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

En el siglo I A. C., Dioscórides escribió sobre los usos del propóleo en su obra "*De materia medica*", menciona que proviene a la resina *Styrax* (Bogdanov, 2012).

Entre los romanos, Plinio el Grande describió la apariencia del propóleo y sus usos, incluso menciona que es de mayor valor que la miel (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

En el siglo I A. C., Cornelius Celsus escribió el uso de una serie de sustancias que promovían la supuración en heridas abiertas o para el tratamiento de abscesos, como parte de esta lista se encuentra el propóleo junto con la mirra y el gálbano (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

En manuscritos persas, se describe al propóleo como medicamento contra eczemas, mialgia y reumatismo (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

De la Edad Media, se cuenta con pocos manuscritos que relatan el uso del propóleo como parte de preparados para tratar infecciones orales y faríngeas y caries dentales. El conocimiento del uso del propóleo sobrevivió esta época a través de la medicina tradicional (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

Con la llegada del Renacimiento, se retomó el uso del propóleo. En el libro "Historia de las plantas", Gerard hace referencia al uso de la resina o sustancia pegajosa proveniente de los brotes de los árboles del género *Populus* como parte de ungüentos. Además menciona que este ungüento sirve para cualquier inflamación y moretones, entre otros (Fearnley, 2001).

Hacia el siglo XVII, las farmacopeas europeas ya lo enlistaban como un medicamento oficial (Crane, 1997).

El botánico y médico, Nicolás Culpeper, asevera en su obra “Herbario Completo” que el ungüento *Populneon* (hecho a base de productos derivados del *Populus alba*) es útil para calmar inflamaciones y calor de cualquier parte del cuerpo, que regula el calor de las heridas; además, sirve para secar la leche materna (Fearnley, 2001).

A pesar del uso médico que se le había dado al propóleo, Stradivari y Amati usaban esta sustancia para barnizar los violines que construían (Crane, 1999).

Es hasta el siglo XX cuando se inicia la investigación química del propóleo. Entre los investigadores que estudiaron inicialmente la composición química se encuentran Dieterich, Halfenberg, Küstenmacher, Jaubert y Rösch (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

1.1.3. Composición química

El propóleo es una mezcla compleja compuesta aproximadamente de 50% de resina y bálsamo, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de desechos orgánicos. Estas proporciones dependen de la fuente natural de colecta de las abejas (Cirasino *et al.*, 1987; Toreti *et al.*, 2013).

En las zonas templadas la mayor parte del propóleo procede del exudado de brotes de álamos pertenecientes al género *Populus spp*; en la zona septentrional de Rusia, de los brotes de *Betula verrucosa* y de *P. tremula*; en las regiones mediterráneas, de *Populus nigra* y de las hojas de *Cistus spp.*. En Brasil procede de las hojas de especies de *Baccharis dracunculifolia*; en Venezuela y Cuba de la resina floral del género *Clusia* (Farooqui *et al.*, 2012).

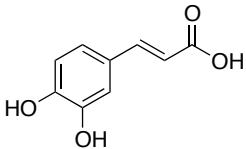
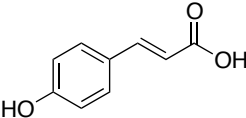
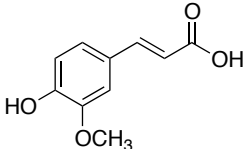
Hasta la fecha, se han identificado más de 300 constituyentes en diferentes tipos de propóleo, siendo los compuestos fenólicos los más abundantes (Falçao, 2010).

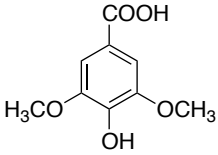
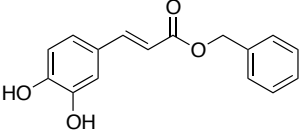
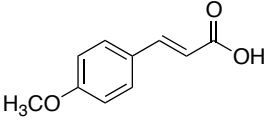
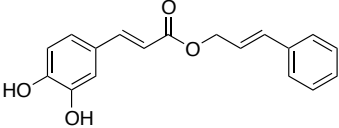
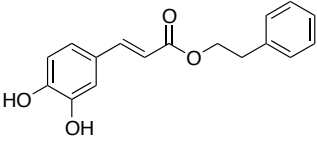
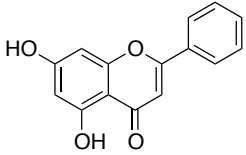
La resina contiene compuestos fenólicos y terpenoides, sin embargo no se han descrito alcaloides, glucosinolatos o glucósidos cianogénicos. La composición típica de los propóleos de zonas templadas consiste en flavonoides y ácidos fenólicos,

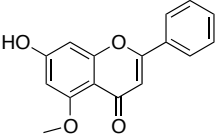
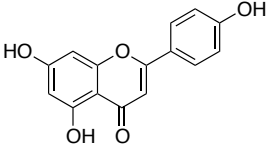
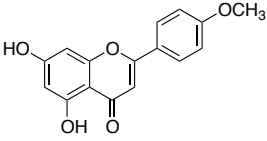
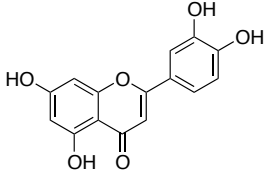
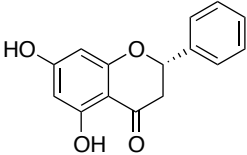
mientras que los provenientes de zonas tropicales contienen fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoil quínicos (Salatino *et al.*, 2011).

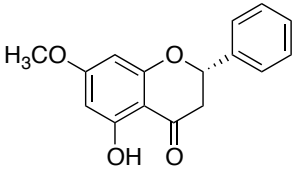
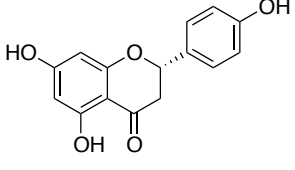
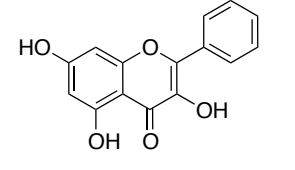

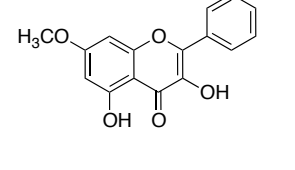
A continuación se presentan en la **Tabla 1** los compuestos más representativos aislados en muestras de propóleo de varias partes del mundo.

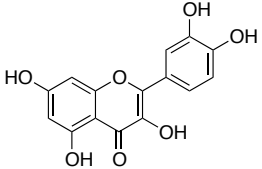
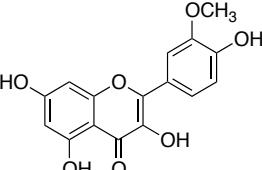
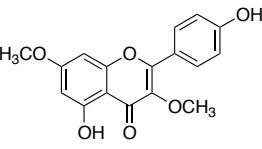
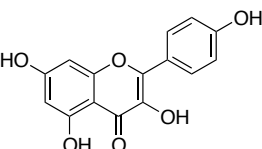
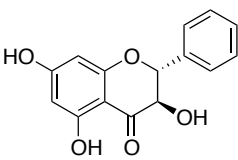
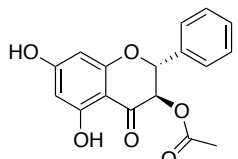
Tabla 1. Compuestos identificados en propóleo de distintos orígenes.

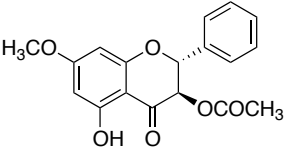
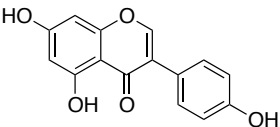
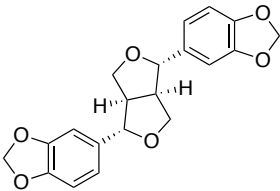
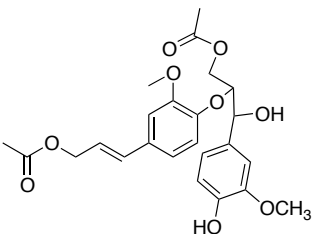
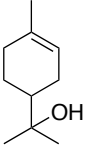
Nombre del compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÉSTERES			
Ácido caféico		España	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
		China	Ahn <i>et al.</i> , 2007
		Portugal	Falçao <i>et al.</i> , 2010
		Rumania	Marghitas <i>et al.</i> , 2013
		Croacia	Kosalec <i>et al.</i> , 2007
		Grecia	Lagouri <i>et al.</i> , 2014
		Turquía	Popova <i>et al.</i> , 2007
Ácido <i>p</i> -cumárico		España	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
		China	Ahn <i>et al.</i> , 2007
		Portugal	Falçao <i>et al.</i> , 2010
		Rumania	Marghitas <i>et al.</i> , 2013
		Grecia	Lagouri <i>et al.</i> , 2014
Ácido ferúlico		España	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
		China	Ahn <i>et al.</i> , 2007
		Rumania	Marghitas <i>et al.</i> , 2013
		Grecia	Lagouri <i>et al.</i> , 2014
		Turquía	Popova <i>et al.</i> , 2007
		Países bajos	Banskota <i>et al.</i> , 2002

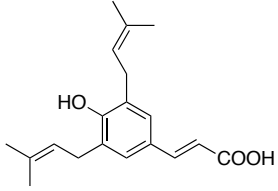
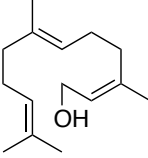
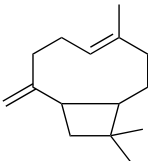
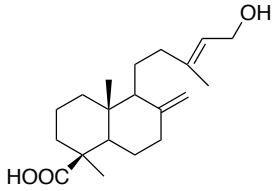
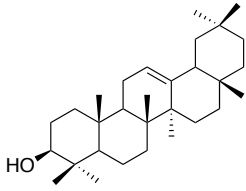
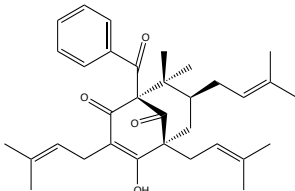
Ácido siríngico		Rumania Turquía	Marghitas <i>et al.</i> , 2013 Aliyazicioglu <i>et al.</i> , 2011
Bencilcafeato		China Turquía	Yang <i>et al.</i> , 2011 Popova <i>et al.</i> , 2007
Ácido 4-metoxicinámico		China	Yang <i>et al.</i> , 2011
Cinamilcafeato		España China	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004 Ahn <i>et al.</i> , 2007
Feniletíl éster del ácido caféico (CAPE)		España México Portugal Grecia	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004 Valencia <i>et al.</i> , 2012 Falçao <i>et al.</i> , 2010 Lagouri <i>et al.</i> , 2014
FLAVONOIDES: flavonas			
Crisina		España México Bulgaria Argentina China Argelia Portugal Rumania Croacia	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004 Valencia <i>et al.</i> , 2012 Bankova <i>et al.</i> , 1983 Volpi y Bergonzini, 2006 Ahn <i>et al.</i> , 2007 Piccinelli <i>et al.</i> , 2013 Falçao <i>et al.</i> , 2010 Marghitas <i>et al.</i> , 2013

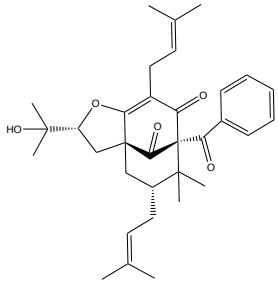
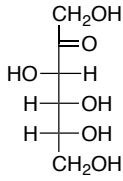
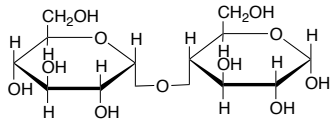
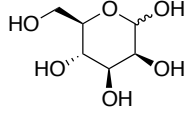
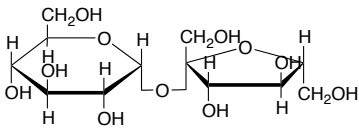
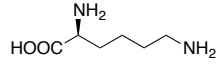
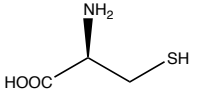
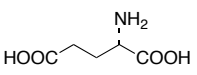
Crisina (Continuación)		Turquía	Kosalec <i>et al.</i> , 2007
		Países bajos	Popova <i>et al.</i> , 2007
		Argentina	Banskota <i>et al.</i> , 2002
		Jordania	Lima <i>et al.</i> , 2009
		Nueva Zelanda	Shaheen <i>et al.</i> , 2011
		Zelanda	Markham <i>et al.</i> , 1996
5-O-metilcrisina		Portugal	Falçao <i>et al.</i> , 2010
Apigenina		Argentina	Volpi y Bergonzini, 2006
		Argelia	
		Portugal	Piccinelli <i>et al.</i> , 2013
		Grecia	Falçao <i>et al.</i> , 2010
		Jordania	Lagouri <i>et al.</i> , 2014
			Shaheen <i>et al.</i> , 2011
Acacetina		México	Valencia <i>et al.</i> , 2012
		Argentina	Volpi y Bergonzini, 2006
Luteolina		Grecia	Lagouri <i>et al.</i> , 2014
FLAVONOIDES: flavanonas			
Pinocembrina		España	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
		México	Valencia <i>et al.</i> , 2012
		Argentina	Volpi y Bergonzini, 2006
		China	
		Portugal	Ahn <i>et al.</i> , 2007
		Rumania	Falçao <i>et al.</i> , 2010
		Croacia	Marghitas <i>et al.</i> , 2013

Pinocembrina (Continuación)		Turquía Argentina Jordania Nueva Zelanda	Kosalec <i>et al.</i> , 2007 Popova <i>et al.</i> , 2007 Lima <i>et al.</i> , 2009 Shaheen <i>et al.</i> , 2011 Markham <i>et al.</i> , 1996
Pinostrobin		Rumania Nueva Zelanda	Marghitas <i>et al.</i> , 2013 Markham <i>et al.</i> , 1996
Naringenina		Argentina Croacia Jordania	Volpi y Bergonzini, 2006 Kosalec <i>et al.</i> , 2007 Shaheen <i>et al.</i> , 2011
FLAVONOIDES: flavonoles			
Galangina		España Bulgaria Argentina China Argelia Rumania Croacia Grecia Turquía Argentina Jordania	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004 Bankova <i>et al.</i> , 1983 Volpi y Bergonzini, 2006 Ahn <i>et al.</i> , 2007 Piccinelli <i>et al.</i> , 2013 Marghitas <i>et al.</i> , 2013 Kosalec <i>et al.</i> , 2007 Lagouri <i>et al.</i> , 2014 Popova <i>et al.</i> , 2007 Lima <i>et al.</i> , 2009 Shaheen <i>et al.</i> , 2011
7-O- metilgalangina		China Países bajos Nueva Zelanda	Ahn <i>et al.</i> , 2007 Banskota <i>et al.</i> , 2002 Markham <i>et al.</i> , 1996

Quercetina		Bulgaria Grecia	Bankova <i>et al.</i> , 1983 Lagouri <i>et al.</i> , 2014
Isorhamnetina		Bulgaria	Bankova <i>et al.</i> , 1983
Rhamnocitrina		China	Yang <i>et al.</i> , 2011
Campferol		Bulgaria Argentina Argelia Checoslovaquia	Bankova <i>et al.</i> , 1983 Volpi y Bergonzini, 2006 Piccinelli <i>et al.</i> , 2013 Nagy <i>et al.</i> , 1987
FLAVONOIDES: flavanones			
Pinobanksina		España China Argelia Portugal Turquía Países bajos Argentina Nueva Zelanda	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004 Ahn <i>et al.</i> , 2007 Piccinelli <i>et al.</i> , 2013 Falçao <i>et al.</i> , 2010 Popova <i>et al.</i> , 2007 Banskota <i>et al.</i> , 2002 Lima <i>et al.</i> , 2009 Markham <i>et al.</i> , 1996
Pinobanksina-3- O-acetil		España México China Portugal Argelia	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004 Valencia <i>et al.</i> , 2012 Ahn <i>et al.</i> , 2007 Piccinelli <i>et al.</i> , 2013 Falçao <i>et al.</i> , 2010

Pinobanksina-3-O-acetil (Continuación)		Turquía Jordania Nueva Zelanda	Popova <i>et al.</i> , 2007 Shaheen <i>et al.</i> , 2011 Markham <i>et al.</i> , 1996
Alpinona		Jordania	Shaheen <i>et al.</i> , 2011
ISOFLAVONOIDES			
Genisteína		Argentina	Volpi y Bergonzini, 2006
LIGNANOS			
Sesamina		Islas Canarias	Christov <i>et al.</i> , 1999
Dímero del alcohol coniferílico		Chile	Valcic <i>et al.</i> , 1998
TERPENOIDES: monoterpenos			
Terpineol		Brasil	Koo <i>et al.</i> , 2002

Artepillina C		Brasil	Salatino <i>et al.</i> , 2005
TERPENOIDES: sesquiterpenos			
Farnesol		Brasil	Salatino <i>et al.</i> , 2005
Cariofileno		Brasil	Koo <i>et al.</i> , 2002
TERPENOIDES: diterpenos			
Ácido isocuprésico		Brasil	Salatino <i>et al.</i> , 2005
TERPENOIDES: triterpenos			
β -amirina		Egipto	Christov <i>et al.</i> , 1998
BENZOFENONAS PRENILADAS			
Nemorosona		Cuba	Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2002

Propolona D		Cuba	Hernández <i>et al.</i> , 2005
AZÚCARES			
D-fructosa		Islas Canarias Kenia Bulgaria Tanzania India	Bankova <i>et al.</i> , 1998 Qian <i>et al.</i> , 2008
Maltosa		Islas Canarias	Bankova <i>et al.</i> , 1998
D-manopiranososa		Islas Canarias	Bankova <i>et al.</i> , 1998
Sacarosa		Islas Canarias Kenia Bulgaria Tanzania India	Bankova <i>et al.</i> , 1998 Qian <i>et al.</i> , 2008
AMINOÁCIDOS			
Lisina		Corea	Chang <i>et al.</i> , 2003
Cisteína		Corea	Chang <i>et al.</i> , 2003
Ácido glutámico		Corea	Chang <i>et al.</i> , 2003

ÁCIDOS GRASOS			
Ácido oléico		Corea	Chang <i>et al.</i> , 2003
Ácido mirístico		Corea	Chang <i>et al.</i> , 2003
Ácido palmítico		Corea	Chang <i>et al.</i> , 2003

1.1.4. Usos

Las abejas usan el propóleo para sellar la colmena durante la construcción de esta, para disminuir la entrada de intrusos a la colmena, ayuda a mantener la temperatura interna de la colmena (en 35 °C aproximadamente) y protege a los habitantes de la colmena de infecciones bacterianas fúngicas y virales (Molan, 2001; Salomão *et al.*, 2008).

En los apiarios, el propóleo se recoge de las colmenas por medio de trampas o raspado, siendo el atrapado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación (Stangaciu, 1998). Posteriormente se extrae con algún disolvente como agua, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter o acetona. El uso de cualquiera de ellos depende de la naturaleza de los metabolitos que se quieran extraer, por ejemplo, con diclorometano se extraen terpenoides, cumarinas y ácidos grasos, mientras que con etanol se extraen taninos, polifenoles, esteroides y alcaloides (Wagh, 2013).

Se utiliza principalmente como suplemento natural y en medicina complementaria. En tabletas puede ser combinado con gran variedad de ingredientes como polen y jalea real; como aditivo, en lociones para la piel, cosméticos, jabones, champús, goma de mascar, cremas dentales y enjuagues bucales (López-Ramírez, 2004).

Los médicos tradicionales modernos lo recomiendan para aumentar la resistencia natural del cuerpo a las infecciones y para tratar úlceras gastroduodenales. Si se aplica de manera externa, alivia algunos tipos de dermatitis causadas por bacterias y hongos (Castaldo y Caspasso, 2002).

1.1.5. Actividad biológica y farmacológica

El propóleo contiene constituyentes farmacológicamente activos como polifenoles, terpenoides, esteroides y aminoácidos (Burdock, 1998). Por lo que se le atribuyen una variedad de actividades biológicas por ejemplo, antiinflamatoria, antioxidante, captura de radicales e inmunomoduladoras (Farooqui *et al.*, 2010).

Actividad antibacteriana. El propóleo tiene un amplio espectro de acción contra las bacterias patógenas (Vokhonina *et al.*, 1969; Grecianu y Enciu, 1976). A continuación se mencionan algunos ejemplos de bacterias sensibles.

Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Corynebacterium spp.*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus cristicus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus sobrinus* (Bogdanov, 2012).

Gram-negativas: *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella ozaemae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella paratyphi-A*, *Salmonella paratyphi-B*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* (Bogdanov, 2012).

Se han usado modelos animales para investigar el efecto sobre la caries, como dentífrico y como enjuague en la formación de placa (Koo *et al.*, 2002). Se atribuye la actividad bactericida a la presencia de flavonoides y derivados del ácido caféico (Bosio *et al.*, 2000). Se ha encontrado que extracto de propóleo tienen un efecto sinérgico en combinación con algunos antibióticos comerciales. (Ghisalberti, 1979; Krol *et al.*, 1993)

Actividad fungicida. Ota y cols. (2001) estudiaron la sensibilidad de cepas de *Candida* y encontraron el orden siguiente de sensibilidad: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*.

Actividad antiprotozoaria y antiparasitaria. Los extractos de propóleo presentaron actividad inhibitoria contra *Trypanosoma cruzi* (Higashi y De Castro, 1995) y fueron letales contra *Trichomonas vaginalis* (Starzyk *et al.*, 1977).

Actividad antiviral. La quercetina, el campferol, el feniletil éster del ácido cafeico (CAPE) y derivados prenilados del ácido caféico interfieren en la replicación del virus de inmunodeficiencia humana, por medio de la inhibición de la enzima integrasa (Amoros *et al.*, 1992). Otros compuestos como los ésteres del ácido cinámico inhiben significativamente la infección del virus de la influenza A (cepa de Hong Kong) a una concentración de 50 mg/mL (Serkedjieva *et al.*, 1992).

Actividad antitumoral. La administración de propóleo en la dieta de una rata con carcinogénesis inducida llevó a la disminución de la incidencia y multiplicación de carcinomas mamarios (Kimoto *et al.*, 1998). Por otra parte, en un propóleo taiwanés, Chia-Nana y cols. (2004) aislaron dos prenilflavanonas que inducen la apoptosis de células de melanoma humano.

Actividad hepatoprotectora. Esta actividad se asocia a la actividad antioxidante de la resina (Lin *et al.*, 1997). En forma de formulación pediátrica administrada a ratas se observa mejora en la secreción de bilis y ácidos cólicos (Drogovoz *et al.*, 1994). Se ha encontrado un efecto protector a hepatocitos de ratón con ácidos diterpénicos provenientes del extracto metanólico de propóleo checo (Banskota *et al.*, 2000).

Actividad cardioprotectora. El propóleo disminuye el colesterol total en ratones. Asimismo, inhibe la agregación plaquetaria y disminuye el nivel de NO por

disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS), protegiendo las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Daleprane y Abdalla, 2013).

Actividad nefroprotectora. Summya y cols. (2013) estudiaron el efecto protector de un extracto etanólico de propóleo usando ratas Wistar tratadas con 5-fluoroacilo. El 5-fluoroacilo es un agente anticancerígeno que se usa de manera restringida porque causa toxicidad en los órganos, aumenta el estrés oxidativo y la inflamación. En este estudio se midieron, como indicadores de nefrotoxicidad, niveles de creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), lactato deshidrogenasa (LDH), molécula de daño renal-1 (KIM-1), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y enzimas antioxidantes. Con el tratamiento de propóleo se observó una marcada disminución de los niveles séricos de los marcadores mencionados y aumentó la cantidad de enzimas antioxidantes.

Actividad antiangiogénica. Keshavarz y cols. (2009) estudiaron extractos de propóleo verde que contenían artemisina C y feniletil ester del ácido caféico (CAPE), encontrando que reducían significativamente la angiogénesis y la producción del factor de crecimiento endotelial vascular.

Actividad antiinflamatoria. El propóleo elimina la producción de prostaglandinas y leucotrienos mediante la inhibición de la expresión y actividad de las ciclooxigenasas 1 y 2 y de las lipooxigenasas, en un estudio *in vitro* de inflamación (Mirzoeva y Calder, 1996).

Actividad antiulcerosa. Boyanova y cols. (2003) investigaron el efecto del propóleo búlgaro sobre bacterias causantes de úlceras y encontraron que la actividad de este, comparada con la amoxicilina, inhibe considerablemente el crecimiento de *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

Actividad inmunomoduladora. Se encontró actividad inmunomoduladora en ratones estresados crónicamente, regulando la expresión de los receptores tipo Toll (TLR-2 y

TLR-4), que contribuyen al reconocimiento de microorganismos y favorecen los pasos iniciales de la respuesta inmune durante el estrés (Orsatti y Sforcin, 2012).

Neurodegeneración. El propóleo y sus constituyentes exhiben actividades neuroprotectoras en estudios *in vitro* e *in vivo*, gracias a sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Farooqui, 2012).

1.2. Estrés oxidante y antioxidantes

El estrés oxidante se define como el desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes que produce un daño potencial (Halliwell *et al.*, 1984). Entre los sistemas antioxidantes que posee naturalmente el cuerpo, se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GSP). Además se cuenta con antioxidantes no enzimáticos, que se adquieren por medio de la dieta, como el α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno y ascorbato (vitamina C) (Cadenas, 1989).

Los oxidantes se producen durante el funcionamiento normal del organismo y como transductores de señales. El anión superóxido se forma por la reducción de oxígeno molecular triplete ($^3\text{O}_2$) mediante la NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa o la semi-ubiquinona. Las superóxido dismutasas convierten el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. El radical NO^\bullet se produce en organismos superiores por la oxidación de L-arginina, proceso catalizado por la enzima óxido nítrico sintasa (ONS) y que puede ser convertido en el catión nitrosonio (NO^+), anión nitrosilo (NO^-) o peroxinitrito (ONOO^-) (Cadenas, 1989).

Según Hicks y cols. (2006) la progresión del estrés oxidante se puede dividir en tres etapas: de adaptación, aguda y crónica. En la etapa de adaptación, la célula trata de lograr el balance oxidante-antioxidante con la sobreexpresión genética y activación enzimática, lo que conlleva a una protección parcial. Sin embargo si progresa a la etapa aguda, los oxidantes logran dañar a la célula y alterar la homeostasis. Si hay una generación descontrolada de especies oxidantes, se llega a la etapa crónica

donde los daños ocasionados a la célula son irreversibles y se genera una reacción en cadena que inevitablemente desembocan en la muerte celular.

Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) están involucradas en situaciones de envejecimiento y muerte celulares en enfermedades cardiovasculares, artritis, cáncer, diabetes, Parkinson y Alzheimer (Daleprane y Abdalla, 2013).

Los efectos de los radicales libres y especies reactivas son controlados en los seres vivos por una gama de mecanismos fisiológicos, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).

La maquinaria enzimática comprende principalmente tres enzimas la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GSP) y la catalasa. Estas sólo eliminan las sustancias potencialmente iniciadoras de la oxidación y no intervienen en las reacciones desencadenadas por las especies reactivas. Además se cuenta con otras proteínas como ferritina, transferrina y ceruloplasmina, que se unen a metales limitando la disponibilidad de hierro necesario para formar el radical $\text{OH}\cdot$ por la reacción de Fenton (Touyz y Schiffrin, 2004).

En segunda instancia, está la inactivación no enzimática que consiste en la acción de sustancias como la ubiquinona, los tocoferoles, los carotenoides y el ácido ascórbico. Estos son llamados “antioxidantes verdaderos” porque intervienen en la cadena de formación de los radicales libres, convirtiendo los hidroperóxidos y radicales en compuestos estables, inactivando a los radicales lipídicos y dando lugar a la formación de un radical más estable, por lo que se denominan “scavengers” en inglés.

Antioxidantes

Un antioxidante puede ser definido como cualquier sustancia que retarda, previene o remueve el blanco del daño oxidativo de una molécula (Procházková *et al.*, 2011). Se

ha clasificado a los antioxidantes bajo diversos criterios como: origen, sitio donde ejercen su acción y la fuente (Venéreo-Gutiérrez, 2002; Lima-Hernández, 2002; Iglesias-Neira, 2009).

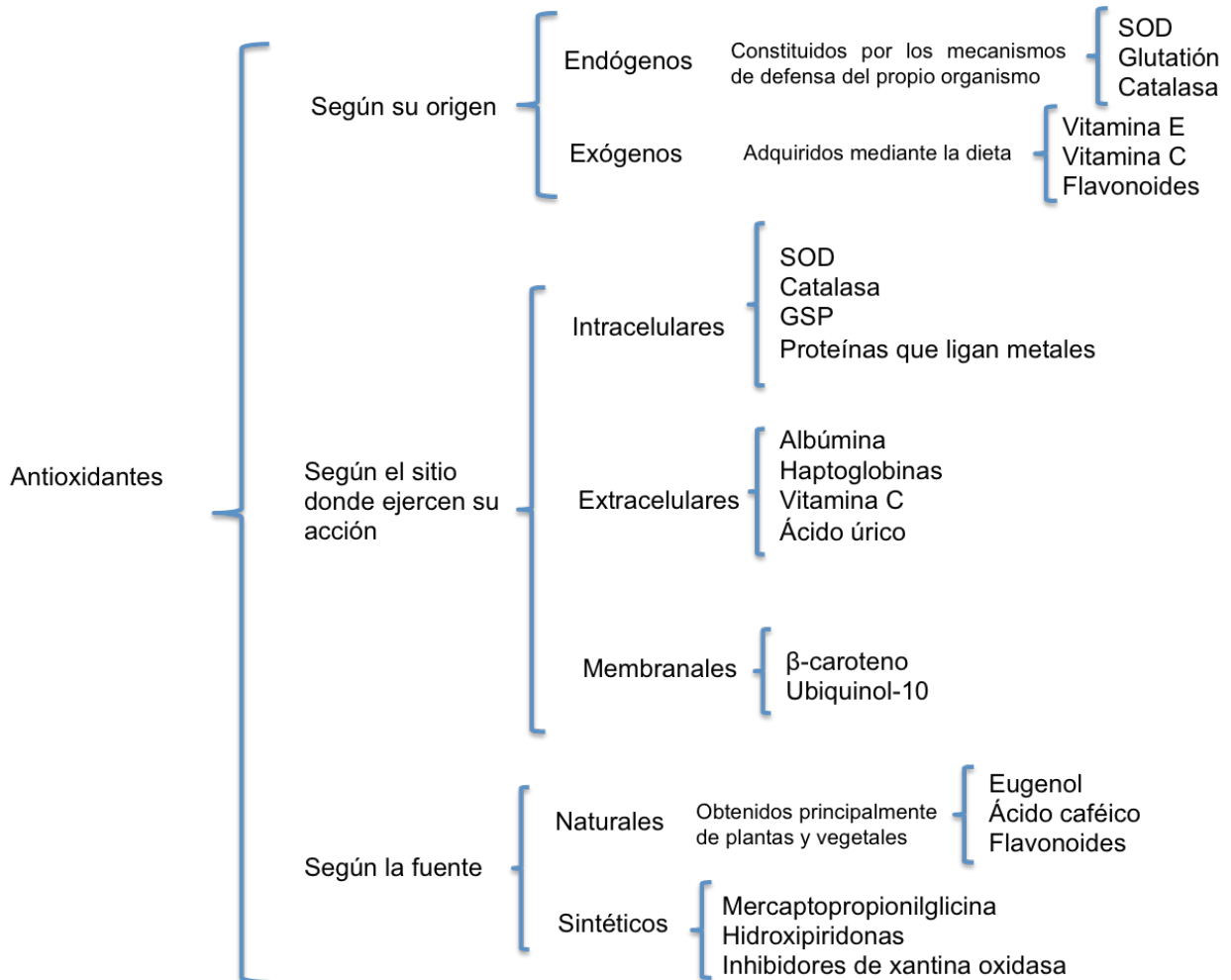


Figura 1. Clasificación de las sustancias antioxidantes de acuerdo a diversos criterios.

SOD, superóxido dismutasa; GSP, glutación peroxidasa.

1.3. Enfermedades cardiovasculares

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).

En el sistema cardiovascular las EROs juegan un papel en el mantenimiento de la integridad cardíaca y vascular, así como un papel patológico en la disfunción cardiovascular asociada a diversas condiciones como la hipertensión, diabetes, aterosclerosis, isquemia cardíaca y falla congestiva cardíaca (Landmesser y Harrison, 2001; Zalba *et al.*, 2001).

Bajo condiciones patológicas, una alta concentración de EROs provoca disfunción endotelial, aumento de la contractilidad, lipoperoxidación, inflamación y aumento de deposición de proteínas extracelulares, los cuales contribuyen al daño vascular (Touyz y Schiffrin, 2004).

Un gran número de investigadores han postulado que el consumo de polifenoles en la dieta reduce el riesgo de desórdenes cardiovasculares, el ejemplo más conocido quizá sea “la paradoja francesa”. Esta teoría encuentra una correlación positiva entre el alto consumo de grasas saturadas y de vino tinto con un bajo riesgo de isquemia cardíaca (Renaud y De Lorgeril, 1992).

Varios flavonoides tienen propiedades vasorrelajantes, debido a diferentes mecanismos de acción que aún no se han aclarado por completo. Sin embargo, se ha descrito que la apigenina posee una actividad relajante del músculo liso vascular mediante la liberación de óxido nítrico endotelial y una actividad independiente de endotelio, probablemente mediada por la proteína cinasa C (Huang *et al.*, 2013). Duarte y cols. (1993) encontraron una tendencia de relajación inducida por diferentes flavonoides, siendo más potentes los flavonoles (quercetina, campferol), seguidos de las flavonas (luteolina, apigenina), flavanoles ((+)-catequina, (-)-epicatequina). Además de que estos flavonoides tienen como mecanismo principal de relajación la inhibición de la proteína cinasa C.

1.3.1. El endotelio y mecanismos de relajación vascular

El endotelio es una monocapa de células que actúa como interfase entre la pared arterial y la sangre (Porro, 2002).

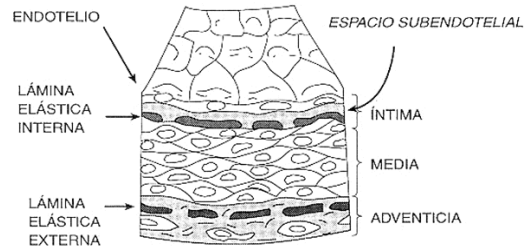


Figura 2. Localización del endotelio en el vaso sanguíneo.

El endotelio regula el tono vascular produciendo vasodilatadores y vasoconstrictores. De igual manera, controla la fluidez de la sangre y la coagulación mediante la producción de factores que regulan la actividad plaquetaria, la cascada de coagulación y el sistema fibrinolítico. Por último, tiene la capacidad de producir citosinas y moléculas de adhesión que regulan el proceso inflamatorio (Widlansky et al., 2003).

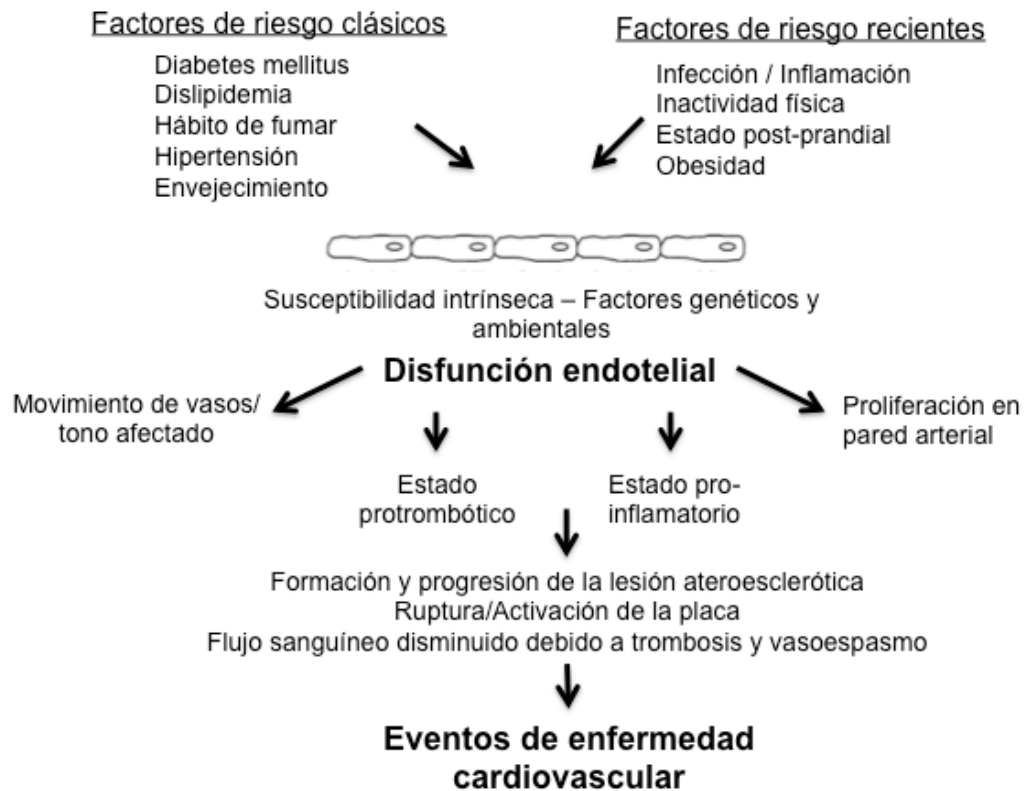


Figura 3. Relación entre la disfunción endotelial y la enfermedad cardiovascular. Tomada de Widlansky y cols. (2003).

La diabetes, dislipidemias, fumar, hipertensión, falta de ejercicio y obesidad son factores de riesgo que afectan las funciones endoteliales y contribuyen al desarrollo, progresión y expresión clínica de aterosclerosis (Widlansky *et al.*, 2003). En la **Figura 3** se ilustra la relación entre los factores de riesgo y la disfunción endotelial.

La vasodilatación dependiente de endotelio es mediada por la liberación del factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) (ahora conocido como óxido nítrico) y de prostaciclina (Oliveri, 2005).

Los mecanismos independientes de endotelio engloban la acción sobre la proteína cinasa C (PKC) y otras cinasas, la entrada de calcio en la célula y la actividad fosfodiesterasa (PDE).

1.4. Caries dental

La caries dental se puede definir como una enfermedad microbiológica infecciosa que resulta en la destrucción localizada de los tejidos duros calcificados dentarios (esmalte, dentina, cemento). Es causada por la producción de ácidos por las bacterias y se manifiesta por el oscurecimiento y reblandecimiento progresivo de dichos tejidos, con su posterior pérdida (Palma-Cárdenas *et al.*, 2007).

La microflora oral es un ecosistema complejo que contiene una gran variedad de especies microbianas, siendo los predominantes: cocos Gram (+) facultativos, estreptococos, estafilococos, cocos Gram (+) anaeróbicos, cocos Gram (-) anaeróbicos, bacilos Gram (+) facultativos, bacilos Gram (+) anaeróbicos, bacilos Gram (-) facultativos, bacilos Gram (-) anaeróbicos y espiroquetas. Todos estos microorganismos habitan en los diferentes habitats de la cavidad oral en diferentes proporciones, por ejemplo, los cocos Gram (+) facultativos están son un 28.2% de las bacterias en la placa, 44.8% en la lengua, 46.2% en la saliva y 28.8% en los surcos gingivales (Kolenbrander *et al.*, 2010).

Estudios clínicos previos demuestran, en animales y seres humanos, que la formación de placa es un requisito para las enfermedades periodontales y caries dental. Ritz y cols. (1967) describieron una preponderancia de cocos en la población microbiana en el desarrollo de placa temprana. Los estreptococos son el grupo más abundante de bacterias de la boca y se clasifican en alguna de las especies siguientes: *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. salivarius* y *S. gordonii* (Kolenbrander *et al.*, 2010). Cada uno de ellos tiene predilección por colonizar ciertas superficies de la boca y en cierta etapa de la vida. *S. sanguis* y *S. mutans* colonizan preferentemente la superficie dental y prótesis. *S. salivarius* es un colonizador primario de la boca después del nacimiento y *S. sanguis* aparece cuando empiezan a desarrollarse los dientes.

Varios microorganismos son esenciales en la patogénesis de la caries dental. Sin embargo, se ha prestado más atención a la familia de los estreptococos debido a su capacidad para sintetizar polisacáridos extracelulares (glucanos y fructanos), a partir de sacarosa, mediante las enzimas dextransucarasa y fructosiltransferasa. Especialmente los glucanos son considerados críticos en la formación de la placa dental ya que, son insolubles en agua y poseen la capacidad para promover la adherencia sobre superficies sólidas (Hamada y Slade, 1980).

1.5. Regiones apícolas en México

La apicultura es una actividad que representa un papel fundamental en el sector agropecuario del país, ya que constituye la tercera fuente captadora de divisas. Esta actividad se ha enfocado principalmente hacia la producción de miel por la demanda en el extranjero. Sin embargo, en los últimos años los productores han buscado la forma de obtener un mayor valor de actividad, incorporando para ello la obtención de polen, jalea real, propóleos y veneno de abeja, los cuales son vendidos en bruto o bien, transformados por ellos mismos hacia productos farmacéuticos, de belleza, o en complementos alimenticios (SAGARPA, 2010).

Debido a la diferencia de climas y flora, que influye sobre la composición de los productos apícolas, México se divide en cinco regiones apícolas definidas: Norte, Costa del Pacífico, Golfo, Altiplano y Península de Yucatán o Sureste (SAGARPA, 2010). En la **Figura 4** se muestran los estados que pertenecen a cada región.



Figura 4. Regionalización de la producción apícola en México. Tomado de Coordinación General de Ganadería/SAGARPA.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El uso de productos naturales con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. Constituye una tradición en las culturas alrededor del mundo como la China, Tibetana y la medicina Ayurveda de India. En México la utilización de materiales vegetales con fines curativos data desde la época prehispánica. Este conocimiento sobre el uso de las plantas se recopila en los códices Trocortésiano, Mendocino, Florentino y De la Cruz-Badiano. Recientemente, el Instituto Nacional Indigenista emitió una colección de monografías de las plantas medicinales de mayor uso en México bajo el título de “Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana”, el cual fue reeditado en 2009 por el Programa Nación Multicultural de la UNAM dentro de la “Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana”.

En la última década el estudio de los productos naturales ha tomado mayor relevancia debido a que muchos países desarrollados han mostrado interés creciente en los sistemas alternativos o complementarios de la medicina, con el consiguiente aumento del comercio internacional de medicamentos herbarios y otros tipos de medicamentos tradicionales (OMS, 2010). Dichos productos se utilizan para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades tales como, ansiedad, cefaleas, insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, hiperlipidemias, artrosis, dispepsia, gastritis, afecciones inflamatorias e infecciosas de piel y mucosas, resfriado, sinusitis, entre otras (Castillo-García, 2007).

Es importante mencionar que la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por cultura o porque no existen otras opciones. Incluso en los “países ricos” (OMS, 2004), muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales debido a la detección de problemas de seguridad y falta de eficacia en los fármacos de síntesis así como al aumento de interés en lo natural. Por ejemplo, en encuestas de atención primaria de la salud, el 57% de los pacientes toma preparados fitoterápicos en sustitución del tratamiento médico convencional (Castillo-García, 2007).

Por otra parte, existe la necesidad de hallar alternativas para tratar diversas enfermedades que aquejan al hombre. Por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares (ECV) que representan una de las principales causas de muertes en adultos en México y el mundo. Estas afectan por igual a ambos sexos, y a más del 80% de la población en países con bajos ingresos (OMS, 2013). Para el tratamiento, se administran diversos medicamentos alopáticos así como remedios herbolarios. De estos últimos los más usados son aquellos que contienen arándano (*Vaccinium oxycoccus*), rusco (*Ruscus aculeatus*), castaña de Indias (*Aesculus hippocastanum*), ginkgo (*Ginkgo biloba*), danshen (*Salvia miltiorrhiza*), uva (*Vitis vinifera*) y ajo (*Allium sativum*). Su efecto benéfico se debe a las actividades farmacológicas de sus componentes, principalmente a la actividad antioxidante y antiinflamatoria (Heinrich *et al.*, 2012). La actividad antioxidante es una de las principales características de los flavonoides, y es un mecanismo por el cual ejercen su efecto cardioprotector (Kondo *et al.*, 1996).

Además, se encuentran las enfermedades de la cavidad oral que comparten factores de riesgo con las cuatro enfermedades crónicas más importantes, las enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes, ya que todas ellas se favorecen por las dietas no balanceadas, el tabaquismo y el consumo nocivo de alcohol. Las enfermedades de la cavidad oral más comunes son la caries dental y las periodontopatías. Las caries dentales afectan entre un 5 % a 20 % de los adultos y son un factor que produce la pérdida prematura de piezas dentales. La atención de estas enfermedades representa un fuerte gasto en todos los países, incluso en los países de ingresos altos (OMS, 2007). Además, los tratamientos existentes para erradicar los agentes etiológicos no son eficaces, sin mencionar que pueden tener efectos secundarios adversos. Los compuestos derivados de las plantas han resultado ser más atractivos como alternativas naturales a los compuestos sintéticos (Wu-Yuan *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1989).

Entre los remedios naturales que se mencionan con mayor frecuencia para el tratamiento de diversos padecimientos se encuentra el propóleo (Salatino *et al.*,

2011). Esta resina es muy apreciada por sus actividades farmacológicas como: antihipertensivo, agente antimicrobiano, inmunomodulador, antiinflamatorio, analgésico y anticarcinogénico, por mencionar algunas (Daleprane y Abdalla, 2013). Su composición química es compleja, sin embargo, los flavonoides y los derivados del ácido cinámico se han considerado como los compuestos activos (Marcucci, 1995).

Recientemente el uso de este producto natural, bajo distintas formas farmacéuticas, ha tenido un incremento en la población mundial. Por ejemplo, la Administración de Desarrollo e Industria de Mercado Exterior de Brasil estima que la exportación de propóleo en el 2012 fue de 41, 721 Kg. Siendo Japón el país que más consume éste producto (Toreti, 2013). En los Estados Unidos y Canadá, el precio del propóleo oscila de dos a seis dólares por libra. En México tiene un valor de 500 pesos/Kg (López-Ramírez, 2004). Sin embargo, la calidad del propóleo no viene dada por el precio sino por su composición, que a su vez determina la actividad biológica (Toreti, 2013).

Con base en los antecedentes descritos previamente los objetivos generales del proyecto de investigación consisten en identificar los compuestos mayoritarios en muestras de propóleo recolectadas en los estados de Puebla y Guanajuato y determinar su actividad biológica. Para este fin se plantearon los siguientes objetivos para el proyecto:

1. Preparar los extractos etanólicos de propóleo.
2. Realizar el estudio químico de los extractos etanólicos que conlleve al aislamiento de los compuestos fenólicos mayoritarios.
3. Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
4. Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides totales de los extractos etanólicos.

5. Evaluar el potencial antioxidante de los extractos etanólicos por medio del ensayo de decoloración del radical DPPH.
6. Evaluar el potencial para detener la lipoperoxidación mediante el ensayo de decoloración de β -caroteno.
7. Determinar el efecto de los extractos etanólicos sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*.
8. Enviar los extractos etanólicos y los flavonoides mayoritarios a la evaluación del efecto vasorrelajante en el modelo de aorta aislada de rata.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. *Recolección del propóleo*

La primera muestra de propóleo se recolectó en el apiario “Álamo Blanco”, Valsequillo, Puebla en Mayo del 2011. La localidad de Valsequillo se encuentra en el municipio de Puebla a 2060 m de altitud. Su clima es templado subhúmedo.



Figura 5. Localización de Valsequillo y distribución del clima en Puebla.

La segunda muestra de propóleo fue proporcionada por el Dr. Carlos Manuel Bucio Villalobos de Escuela de Agronomía, Universidad La Salle-Bajío, Silao en noviembre de 2013. Silao es un municipio que se localiza en la región centro-oeste del estado de Guanajuato, a una altura sobre el nivel del mar de 1,780 m. El clima es predominantemente cálido.



Figura 6. Localización de Silao y distribución del clima en Guanajuato.

Es importante mencionar que ambas localidades se encuentran en estados que se localizan en la región apícola del Altiplano Central Mexicano.

3.2. Procedimientos generales de análisis

3.2.1. Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 (Merck) y Sephadex LH-20 (Fluka).

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063 - 0.200 mm) en diversos tamaños y sistemas de elución. Se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254$ nm y 315 nm, posteriormente se revelaron con vainillina sulfúrica (a 100 °C).

Las separaciones cromatográficas en placa preparativa se realizaron sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck de 20 × 20 cm y 2 mm de espesor.

3.2.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Los espectros de masas se generaron en un equipo Agilent 6890L por impacto electrónico (IE) a 70 EV y el analizador másico de tiempo de vuelo (TOF).

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron de un equipo Varian, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se disolvieron en CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{MeOH-}d_4$ y acetona- d_6 , según el caso. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al TMS.

3.3. Cuantificación del contenido de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu reportada por Singleton y cols. (1999) con algunas modificaciones. En una placa de 96 pozos, se agregó 160 μL de H_2O desionizada, 20 μL de reactivo Folin (fosfomolibdato y fosfotungstato) y 20 μL de la disolución del extracto etanólico y se mantuvo 8 minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 10 μL una solución de Na_2CO_3 al 20% y se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad por 1 hora. La lectura de la absorbencia se realizó en un espectrofotómetro a 700 nm.

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración 5 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con la finalidad de expresar los resultados en equivalentes de ácido gálico (mg de equivalentes de ácido gálico/g muestra).

Cada determinación, tanto del extracto de propóleo como la curva de calibración, se realizó por triplicado. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones \pm desviación estándar.

3.4. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó de acuerdo a la técnica de Kumazawa y cols. (2004), con algunas modificaciones. En una placa de 96 pozos se agregaron 100 μL de la muestra y 100 μL de una solución etanólica de AlCl_3 al 2%.

Se incubó la mezcla de reacción por 1 h y se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro a 415 nm.

Se realizó una curva de calibración de quercetina en un rango de concentración 10 – 60 µg/mL con la finalidad de expresar los resultados en equivalentes de quercetina (mg de equivalentes de quercetina/g muestra).

Cada determinación, tanto del extracto de propóleo como la curva de calibración, se realizó por triplicado y de manera independiente. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones ± desviación estándar.

3.5. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por medio de la capacidad de neutralización del radical DPPH y del radical peroxilo.

3.5.1. Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Se utilizó el método descrito por Habsah y cols. (2004) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 100 µL de una disolución 0.208 mM de DPPH y 100 µL de una disolución metanólica del extracto total etanólico. Se midió la absorbencia al cabo de 30 minutos en un espectrofotómetro a 540 nm.

3.5.2. Ensayo de decoloración de β-caroteno

Se utilizó el método descrito por Wang y cols. (2008) con modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que consiste en una emulsión de β-caroteno de 1.0 mg/mL en CH₂Cl₂, ácido linolénico, Tween 40 y H₂O desionizada, a la cual se adicionó la disolución acuosa de los extractos etanólicos o de los compuestos aislados, a una concentración de 0.5 mg/mL. Se realizó la lectura inicial en el espectrofotómetro a 470 nm y posteriormente se sometió la mezcla de reacción a Baño María a 50°C por 1 h, al cabo de la cual se realizó la segunda medición, utilizando como blanco una emulsión de ácido linolénico, Tween 40 y H₂O desionizada. Como estándar se usó Trolox® 0.5 mg/mL.

3.6. Determinación del efecto del extracto sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral

3.6.1. Microorganismos de prueba

Se utilizaron los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10499), *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis* (aisladas de pacientes clínicos). Para reactivar las bacterias se inocularon 50 µL de una suspensión de bacterias en glicerol en 5 mL de caldo BHI y se incubaron los tubos por un periodo de 24 h, a 37°C. Posteriormente, se verificó el crecimiento y la pureza de cada cepa, utilizando una tinción de Gram.

3.6.2. Procedimiento general

Se tomaron 50 µL del caldo inoculado con las bacterias de prueba y se transfirieron a un tubo de ensaye con 5 mL de caldo BHI fresco por duplicado (C = 1 %) , posteriormente, se incubaron por 4 horas a 37°C. De este último medio se tomaron 480 µL para diluirlos en 30 mL de caldo BHI, del cual se transfirió 1 mL a una celda de plástico para realizar una lectura en el espectrofotómetro a 600 nm, se obtuvo un porcentaje de absorbencia de % A = 0.012, de modo que cada pozo contenía aproximadamente 1×10^5 UFC.

Se sembró la bacteria de concentración previamente mencionada en caldo BHI y glucosa al 1.0% en presencia de una disolución acuosa del extracto etanólico en una placa ELISA de 96 pozos. Cada muestra se colocó por triplicado y se realizó una dilución seriada con medio BHI.

Como control positivo se utilizó el digluconato de clorhexidina al 0.012%; como control de esterilidad, caldo BHI y como control de disolvente, DMSO al 10%. Se incubó a 37 °C por 24 horas. Los resultados se obtuvieron al cabo de 24 horas de incubación.

3.6.3. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Rivero-Cruz y cols. (2008), utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos. El valor de CMI fue definido como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la absorbencia a 0.05.

3.7. Actividad vasorrelajante de los extractos y compuestos en el ensayo de aorta aislada de rata.

Se emplearon ratas de la cepa Wistar (ambos sexos), las cuales se anestesiaron con cloroformo y se sacrificaron 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 *et al.*, 1999). 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 O₂-CO₂ en una proporción 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. La contracción de la aorta se indujo utilizando fenilefrina (Phe) 1 µM. Posteriormente, transcurridos 20 min se adicionaron los extractos etanólicos de propóleo y los flavonoides mayoritarios en un rango de concentraciones de 1 µg/mL a 1000 µg/mL.

La respuesta inducida por cada una de las concentraciones de la sustancia de prueba en la aorta se registró durante 10 minutos y los cambios en la tensión producida 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 *et al.*, 1999).

3.8. Estudio químico

3.8.1. Preparación de los extractos etanólicos

La muestra de propóleo de Puebla (20 g) se maceró con etanol por 48 h. Posteriormente, se filtró y se evaporó el disolvente con el uso de un rotavapor, hasta sequedad. Se pesó el extracto total seco (4.4 g). Se guardaron 20 mg del extracto total como referencia a 4 °C. Para la extracción de la muestra de propóleo recolectada en Guanajuato se siguió un proceso similar y se obtuvieron 11.3 g de extracto seco.

3.8.2. Fraccionamiento primario de los EEP

3.8.2.1. Fraccionamiento primario del EEP de Puebla

Una porción del extracto etanólico (4.0 g) se disolvió en metanol y se cromatografió en una columna abierta de Sephadex LH-20 (5 × 40 cm). La elución se realizó de manera isocrática con metanol. Se recolectaron 35 fracciones (50 mL) que se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de 10 fracciones primarias. De la fracción primaria Fx-6-8 precipitó un sólido amarillo. Este sólido se recrystalizó con una mezcla de hexano/acetona y se obtuvo un sólido amarillo claro (22.0 mg) que se caracterizó por RMN- H^1 y EM como crisina (5).

3.8.2.2. Fraccionamiento primario del EEP de Guanajuato

El extracto seco se adsorbió en sílica gel y se cromatografió en una columna al vacío (VLC, 10 × 30 cm). La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad creciente con mezclas de CH_2Cl_2 y acetona. Se recolectaron 30 fracciones (50 mL) que se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de 8 fracciones primarias.

3.8.3. Fraccionamiento secundario del EEP y purificación de compuestos

3.8.3.1. Fraccionamiento secundario del EEP de Puebla y purificación de compuestos

Las aguas madres remanentes de la cristalización del compuesto **5** se concentraron a sequedad con la ayuda de un rotavapor. El sólido obtenido (1.0 g) se disolvió en metanol y se recromatografió en una columna abierta de sílica gel y se eluyó con una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH en una proporción 98:2. Se obtuvieron 25 fracciones que fueron reunidas por similitud cromatográfica en siete fracciones. La fracción Fx 1+2 se recrystalizó con metanol en caliente. Como resultado de este proceso se obtuvo un sólido amarillo (8.08 mg) en forma de agujas delgadas que se caracterizó por RMN-H¹ y EM como izalpinina (**1**). Este compuesto también se obtuvo a partir de la fracción 3-7 (Fx 3-7) (4.60 mg).

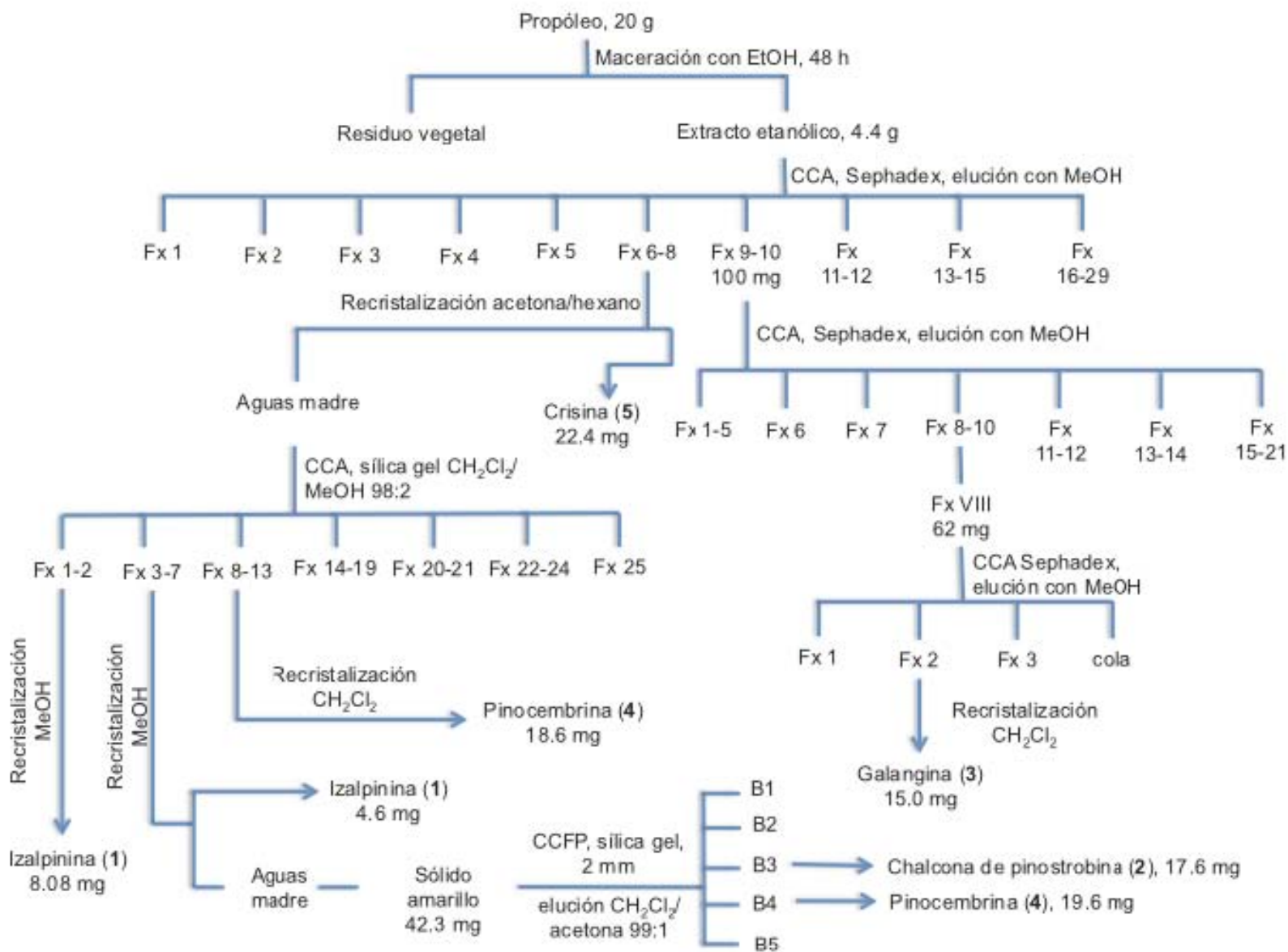
Las aguas madres de la recrystalización de Fx 3-7, se llevaron a sequedad obteniendo un sólido amarillo (42.3 mg). Los componentes presentes en la mezcla se purificaron utilizando cromatografía en capa fina preparativa. En este proceso la placa se eluyó dos veces en un sistema CH₂Cl₂/acetona en una proporción 99:1 y se obtuvieron 5 bandas (B1, B2, B3, B4, B5) que se desadsorbieron con acetona y concentraron por separado a presión reducida. A partir de la banda B3 cristalizaron 17.6 mg de un sólido color amarillo. Este sólido se caracterizó por RMN-H¹ y EM como 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**).

A partir de la fracción 8-13 se cristalizó, por tratamiento con CH₂Cl₂ en caliente, un sólido blanco (18.6 mg) que fue soluble en metanol. Este sólido se caracterizó por RMN-H¹ y EM como pinocembrina (**4**). También se aisló de las aguas madres de la recrystalización de Fx 3-7.

La fracción 9-10 (100 mg) se disolvió en metanol y se sometió a un segundo fraccionamiento por medio de una columna abierta con Sephadex LH-20 como adsorbente y una elución isocrática con metanol. Se recolectaron 30 fracciones que

se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de siete fracciones. La fracción 8-10 se nombró Fx VIII (62.0 mg) y se cromatografió nuevamente en una columna abierta Sephadex LH-20 con metanol como eluyente. A partir de la fracción 2 mediante sucesivas recristalizaciones utilizando CH_2Cl_2 se obtuvieron 15.0 mg de un sólido amarillo en forma de agujas que se caracterizó por RMN- H^1 y EM como la galangina (**3**).

Figura 7. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico del EEP de Puebla.



4.8.3.1. Fraccionamiento secundario del EEP de Guanajuato y purificación de compuestos

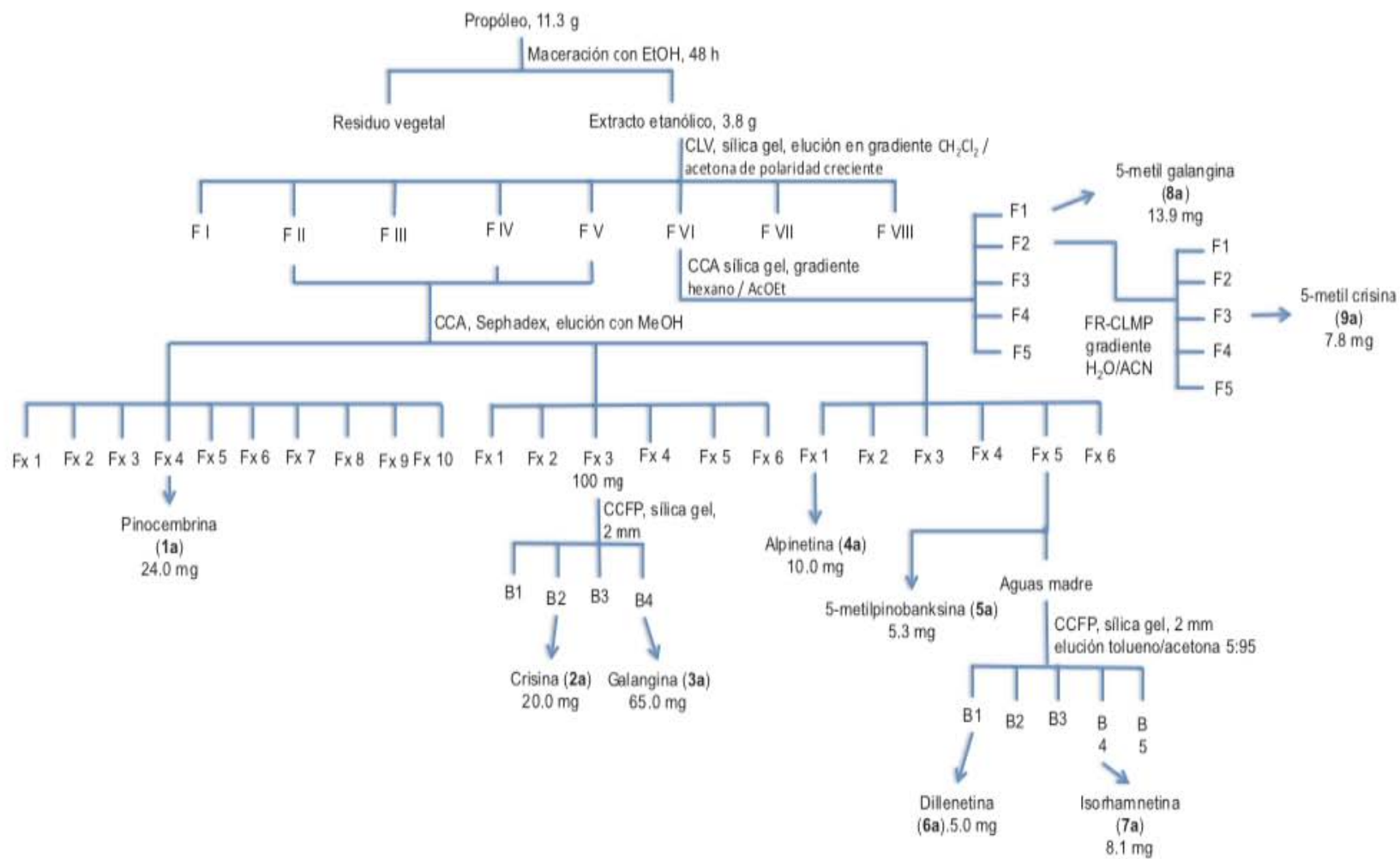
La fracción FII se disolvió en metanol y cromatografió en una columna de Sephadex LH-20. Se eluyó isocráticamente con metanol, reuniendo 10 fracciones en total. De la fracción 6-8 se obtuvo un sólido blanco (24.0 mg) que fue caracterizado como pinocembrina (**1a**). La fracción FIV también se cromatografió sobre una columna de Sephadex LH-20 que se eluyó con metanol. De este último proceso se obtuvieron seis fracciones secundarias (FIV1-FIV6). Los componentes de la fracción FIV3 (100 mg) se purificaron mediante cromatografía en capa fina preparativa. La placa se eluyó con una mezcla CH₂Cl₂/acetona en una proporción 98:2. Se obtuvieron 4 bandas (B1, B2, B3, B4) que fueron desadsorbidas con acetona y se concentraron a presión reducida. A partir de la banda B2 se obtuvieron 20.0 mg de un sólido amarillo que se caracterizó por RMN-H¹ y EM como crisina (**2a**) y a partir de la banda B4 65.0 mg de un sólido amarillo caracterizado como la galangina (**3a**).

La fracción FV se sometió a cromatografía en una columna de Sephadex LH-20, con metanol como eluyente. Se obtuvieron seis fracciones, de las cuales se obtuvieron cristales blancos en la fracción 1 (F1-V) (10.0 mg) y en la fracción 5 (F5-V) (5.3 mg) que fueron caracterizados por RMN-H¹ y EM como alpinetina (**4a**) y 5-O-metil pinobanksina (**5a**). Las aguas madres de la F5-V se concentraron a presión reducida, disolvieron en acetona y purificaron mediante cromatografía en capa fina preparativa. La placa se eluyó con una mezcla de acetona/tolueno en proporción 5:95. Se obtuvieron 5 bandas (B1, B2, B3, B4, B5) que fueron desadsorbidas y se concentraron a presión reducida. A partir de la banda B1 se obtuvieron 5.0 mg de un polvo amarillo que se caracterizó por RMN-H¹ y EM como dillenetina (**6a**) y de la banda B5, 8.1 mg de cristales amarillos que se caracterizaron por RMN-H¹ y EM como isorhamnetina (**7a**), respectivamente.

La fracción FVII se sometió a una columna abierta de sílica gel. La elución se realizó en gradiente con una mezcla de hexano/AcOEt. Se recolectaron cinco fracciones de las cuales, en la fracción 1 (F1-VII) se obtuvo un sólido amarillo (13.9 mg) que fue

caracterizado por RMN-H¹ y EM como 5-O-metilgalangina (**8a**). La fracción 2 (F2-VII) se sometió a cromatografía líquida de mediana presión en fase reversa (FR-CLMP). Se utilizó un gradiente de una mezcla de agua/acetonitrilo y se recolectaron cinco fracciones. En la fracción 3 (F3-2-VII) se obtuvo un polvo amarillo claro (7.8 mg) que se caracterizó por RMN-H¹ y EM como 5-O-metilcrisina (**9a**).

Figura 8. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico del propóleo de Guanajuato.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto de investigación se realizó el estudio químico de dos propóleos recolectados en la región del Altiplano Mexicano. La primera muestra fue recolectada utilizando el método de raspado en Valsequillo, Puebla. La segunda muestra se recolectó en Silao, Guanajuato utilizando el método de trampa.

Los propóleos objeto de estudio se seleccionaron con base en sus usos en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades de los seres humanos el criterio etnomédico (Buss y Butler, 2010; Salatino *et al.*, 2011; Kuropatnicki *et al.*, 2013). A la fecha varias muestras de propóleo han sido estudiadas alrededor del mundo (Bankova *et al.*, 2000; Salatino *et al.*, 2011), sin embargo, hay pocos estudios conducentes a la caracterización de propóleos mexicanos (Velázquez *et al.*, 2012)

Las muestras de propóleo fueron desecadas y sometidas a maceración para obtener los extractos etanólicos. Posteriormente estos fueron sujetos a la determinación de fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante (captura del radical DPPH y decoloración de β -caroteno), efecto sobre el crecimiento de bacterias cariogénicas y efecto sobre la aorta aislada de rata.

Por otra parte, los extractos etanólicos de cada propóleo se sometieron a un estudio químico y los compuestos aislados a partir de cada uno de ellos se identificaron por sus constantes espectroscópicas y espectrométricas. A los compuestos mayoritarios, se evaluó su capacidad antioxidante y su efecto sobre la aorta aislada de rata, con los mismos ensayos empleados para los extractos.

4.1. Contenido de fenoles totales

El método de Folin-Ciocalteu es considerado uno de los mejores y más antiguos métodos para cuantificar el contenido de fenoles en productos naturales (Prior *et al.*, 2005). Se contruyó una curva de calibración que permitió obtener la ecuación

ajustada $A = 0.0041 C + 0.0324$ ($r^2 = 0.9939$). En esta ecuación se interpoló el valor de absorbencia obtenido para los extractos etanólicos del propóleo a una concentración de 0.1 mg/mL. Como resultado se obtuvo que los extractos etanólicos de propóleo de Puebla y Guanajuato contienen 149.4 ± 1.5 y 38.3 ± 3.8 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, respectivamente. Estos resultados son comparables con los obtenidos previamente para propóleos recolectados en el Altiplano mexicano (Zarco, 2012) y cumplen con las especificaciones de control de calidad establecidas por las normas de calidad elaboradas por el Instituto Argentino de Normalización-Subcomité de Productos agroalimentarios del NOA (Norma 15935-1 Esquema 1, 2004) y el Ministerio de Agricultura de Brasil-Apacame (Reglamento técnico para fijar la identidad y calidad de propóleos, 1999) en los cuales se establece que el contenido mínimo de fenoles totales debe ser mayor a 40 mg de equivalentes de ácido gálico/g muestra.

4.2. Contenido de flavonoides totales

Para la determinación de los flavonoides totales se contruyó una curva de calibración permitió obtener la ecuación ajustada $A = 0.0069 C - 0.0739$ ($r^2 = 0.9924$). En esta ecuación se interpoló el valor de absorbencia obtenido para los extractos etanólicos de propóleo de Puebla y Guanajuato, a una concentración de 0.1 mg/mL. Como resultado se obtuvo que los extractos etanólicos de propóleo de Puebla y Guanajuato contienen 29.7 ± 0.53 y 3.1 ± 1.7 mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto, respectivamente. Estos resultados son comparables con los obtenidos previamente para propóleos recolectados en el Altiplano mexicano y en el caso del EEP Puebla cumple con las especificaciones de control de calidad establecidas por las normas de calidad previamente mencionadas, en las cuales se establece que el contenido mínimo de flavonoides totales debe ser mayor a 5 mg de equivalentes de quercetina/g muestra.

4.3. Estudio químico de los EEP

Salatino y cols. (2011) clasifican a los propóleos en diferentes tipos según su composición química, la cual, se encuentra ligada a la fuente natural y a la zona

geográfica de recolección. Los propóleos de tipo I son aquellos de clima templado que se caracterizan por contener flavonoides sin sustitución en el anillo B y ésteres de fenilpropanoides. Los de tipo II están representados por el propóleo verde brasileño que contiene fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoilquínicos. Los tipo III son aquellos derivados del género *Clusia*, con benzofenonas polipreniladas. Los tipo IV son los que provienen del género *Macaranga*, contienen geranil flavonoides. Los tipo V son propóleos originarios de Grecia, Creta y Turquía que contienen principalmente diterpenoides o antraquinonas. La distribución geográfica de los tipos de propóleos se ilustra en la **Figura 9**.



Figura 9. Patrón quimio-geográfico de los tipos de propóleos. Tomada de Salatino y cols. (2011).

4.3.1 Estudio químico del propóleo de Puebla

En el EEP de Puebla se encontró una composición típica de los propóleos de zonas templadas (Ghisalberti, 1979). Cabe resaltar que se aisló pinocembrina (**4**) en cantidad considerable y su presencia es considerada el marcador de propóleos derivados de árboles del género *Populus* (Salatino *et al.*, 2011; Velázquez *et al.*, 2012).

Como se observa en la **Figura 9**, los propóleos mexicanos se incluyen en los tipo I donde las fuentes vegetales predominantes son las especies del género *Populus* sección *Aigeiros* (Salicaceae) (Salatino *et al.*, 2011).

Por otra parte, es importante mencionar, que en este estudio se aisló una chalcona, la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**). Este resultado contrasta con la descripción de los metabolitos característicos para los propóleos del tipo I, realizada por Salatino y cols. (2011). Estos investigadores mencionan que los metabolitos característicos en los propóleos tipo I provienen de árboles de *Populus* de la sección *Aigeiros*, sin embargo, las chalconas son considerados metabolitos característicos en los exudados de árboles de la sección *Tacamahaca* (English *et al.*, 1991; Christov *et al.*, 2006). Este hallazgo permite afirmar que las abejas utilizan como fuente vegetal para la producción de propóleo árboles de la sección *Tacamahaca* como la *Betula* (abedules), *Alnus* (aliso) y *Aesculus* (castaña de Indias).

Por último, cabe mencionar que en Puebla Ayala y Soriano (2011) describen como vegetación dominante a *Salix bonplandiana* y *Salix humboldtiana* que han sido descritas como fuentes de propóleo.

4.3.2. Estudio químico del propóleo de Guanajuato

El estudio químico del EEP de Guanajuato permitió el aislamiento de compuestos marcadores descritos para los propóleos de tipo I (propóleos obtenidos a partir de especies de la sección *Aigeiros*) como la pinocebrina, la crisina y la galangina (English *et al.*, 1991). Sin embargo, los flavonoides, dillenetina e isorhamnetina, no concuerdan con el tipo de flavonoides descritos como marcadores para este tipo de propóleo (Salatino *et al.*, 2011). English y cols. (1991) describen que los flavonoides característicos de los propóleos tipo I son compuestos que carecen de la función catecol en el anillo B. Este hallazgo permite proponer que el propóleo recolectado por las abejas en Guanajuato posee múltiples especies vegetales. En este sentido, es importante destacar que en el sitio donde se encuentra ubicado el Instituto de Ecología de Guanajuato señala que la flora predominante son los árboles de *Bursera*

spp. (Copal blanco), *Ceiba aesculifolia* (Pochote) y *Acacia pennatula* (Tepame). Mientras que el INEGI (2011) reporta que predominan los pastizales, encinos y bosque de coníferas. Estas especies podrían constituir fuentes de obtención de las resinas recolectadas por las abejas.

4.4. Caracterización estructural de metabolitos aislados

El estudio químico del extracto etanólico del propóleo de Puebla condujo al aislamiento de los flavonoides izalpinina (**1**), 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), galangina (**3**), pinocembrina (**4**) y crisina (**5**). En el caso del EEP de Guanajuato se aislaron pinocembrina (**1a**) crisina (**2a**) y galangina (**3a**), y alpinetina (**4a**), 5-O-metilpinobanksina (**5a**), dillenetina (**6a**), isorhamnetina y 5-O-metilcrisina (**7a**). Para la caracterización de las estructuras químicas de los compuestos aislados se usaron métodos espectroscópicos y espectrométricos. A continuación se discutirá, a modo de ejemplo, la caracterización estructural de los compuestos izalpinina (**1**) y 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**). Los datos de RMN¹H para ambos compuestos se muestran en las **Tablas 2 y 3, respectivamente**.

4.4.1. Caracterización estructural de la izalpinina (1).

La izalpinina (**1**) cristalizó en forma de agujas largas de color amarillo y presentó una alta solubilidad en CH₂Cl₂. Su fórmula molecular se estableció como C₁₆H₁₂O₅ con base en su espectro de masas que mostró un ión molecular de *m/z* 284. Es importante mencionar que su espectro de RMN-¹H mostró el perfil típico para un flavonoide (Moon *et al.* 2005; Yoon *et al.*, 2011). A continuación se describen las características más importantes de su espectro de RMN-¹H:

1. En δ_H 12.32 y δ_H 9.79 se observaron dos singuletes asignables a protones de grupos hidroxilos quelatados.
2. En la región de los protones aromáticos se observó un conjunto de señales para un anillo monosustituido asignable a cinco protones en δ_H 8.17 (2H, dd, $J = 8.0$, Hz, H-2' y H-6') y en δ_H 7.57-7.47 (3H, m, H-3'-H-5'). Estas señales

son asignables a los protones H-2', H-3', H-4', H-5' y H-6' del anillo B del flavonoide.

3. En la misma región se observaron dos dobles centrados en δ_H 6.76 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6) y en δ_H 6.35 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8) que corresponden a un sistema de acoplamiento AB. Estas señales son asignables a los protones H-6 y H-8 del anillo A del flavonoide.
4. En la región alifática se observó un singulete en δ_H 3.85 (3H, s) asignable a un grupo metoxilo. Para determinar la posición de este grupo en el anillo aromático se realizó un NOE diferencial en una dimensión (1D-NOE) (**Figura 10b**). En este experimento al irradiar la señal centrada en δ_H 3.85, se observa el efecto NOE de esta señal con las señales en δ_H 6.35 y δ_H 6.76. Por lo tanto, el grupo metoxilo se ubicó en la posición C-7 del anillo A del flavonoide.

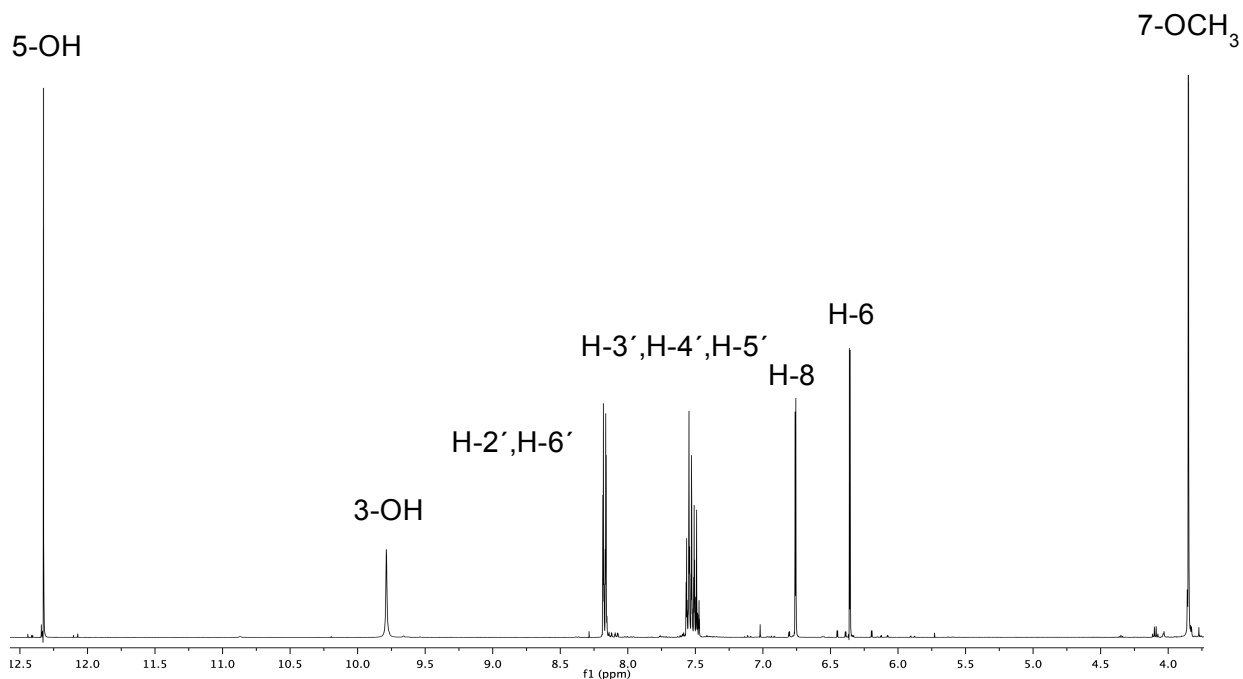


Figura 10a. Espectro RMN-¹H de la izalpinina (1), DMSO-*d*₆, 400 MHz.

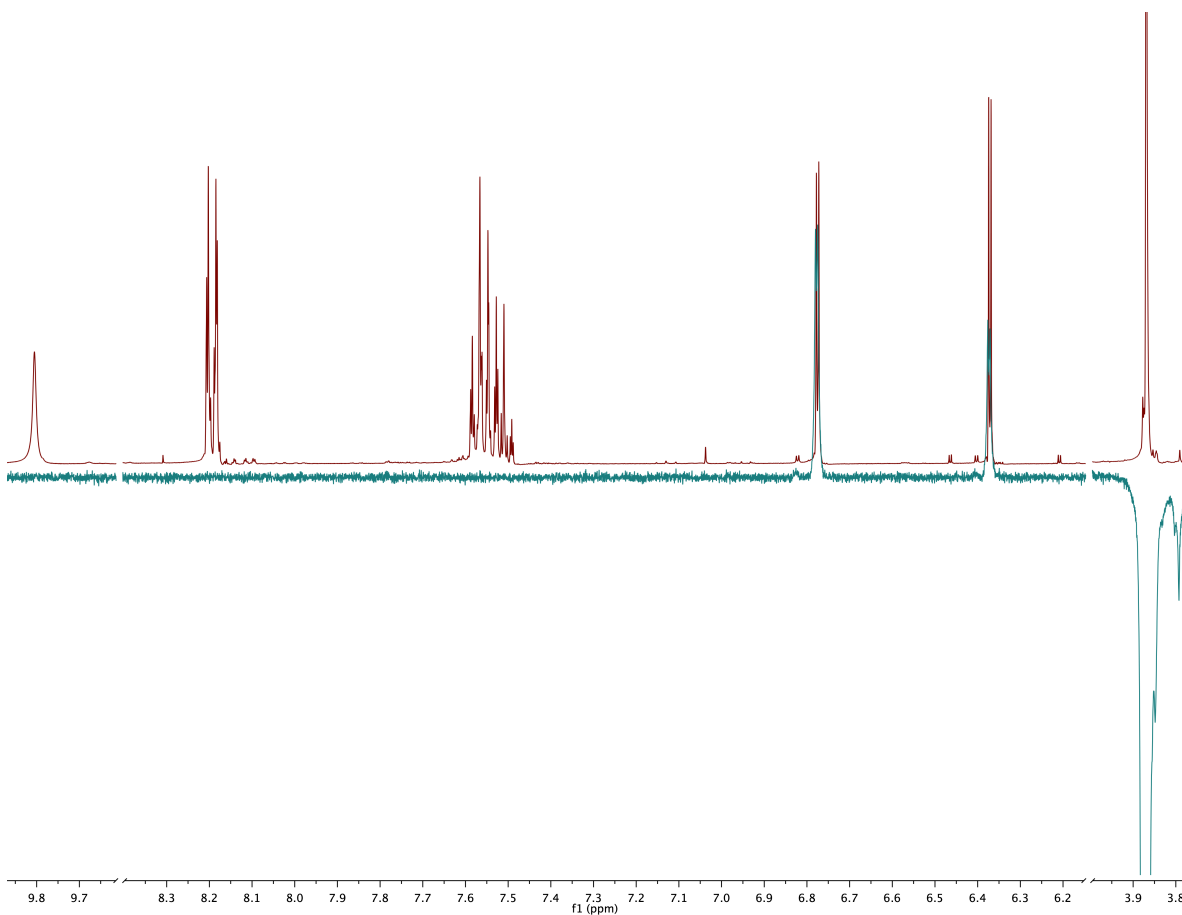
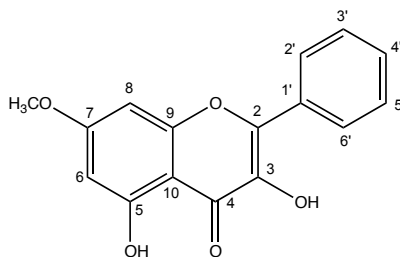


Figura 10b. Espectro 1D-NOE diferencial de la izalpinina (**1**) DMSO- d_6 , 400 MHz.

Con base en las evidencias descritas previamente este compuesto se caracterizó como la izalpinina (**1**). En la **Figura 10a** se presenta su espectro de RMN- ^1H y en la **Tabla 2**, su estructura química y el resumen de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas (Guzmán-Avenidaño *et al.*, 2011).

Tabla 2. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (1).



Izalpinina (1)

(DMSO-*d*₆, 400 MHz)

¹ H	δ (J Hz)
3-OH	9.79 (1H, s)
5-OH	12.32 (1H, s)
6	6.35 (1H, d, 2.0)
7-OCH ₃	3.85 (3H, s)
8	6.76 (1H, d, 2.0)
2', 6'	8.17 (2H, d, 8.0)
3', 4', 5'	7.47-7.57 (3H, m)
PM (m/z)	284
Fragmentos	284 [M ⁺] (93), 255 (16), 241 (22), 105 (97), 77(100)

La izalpinina o 7-O-metilgalangina (1) ha sido aislada y caracterizada previamente a partir de las hojas y flores de *Smallanthus pyramidalis* (Triana) H. Rob. (Guzmán-Avenidaño *et al.*, 2011). Mientras que Yang y cols. (2011) la aislaron de un propóleo chino. Banskota y cols. (2002) identificaron la izalpinina en propóleos de los países bajos y probaron su actividad antiproliferativa en células de cáncer murinas y humanas. Markham y cols. (1996) la identificaron utilizando CL-EM y CG-EM en una muestra de propóleo de Nueva Zelanda. Li y cols. (2010) la aislaron a partir de un propóleo mexicano y encontraron que posee efecto citotóxico en células cancerosas de ratón y de humano.

4.4.2. Caracterización estructural de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (2).

La 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona se aisló como un sólido color amarillo intenso, soluble en metanol y acetona. Su fórmula molecular se estableció como C₁₆H₁₄O₄

con base en su espectro de masas que mostró un ión molecular de m/z 270 y en sus espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C . Cabe mencionar que el espectro de RMN- ^1H muestra un perfil típico de una chalcona (Lin, *et al.*, 2009; Sri-Nurestri *et al.*, 2011). A continuación se describen las características más importantes de sus espectros de RMN:

1. En δ_{H} 8.27 (1H, dd, $J= 16.0$, H- α) y δ_{H} 7.80 (1H, dd, $J= 16.0$, H- β) se aprecian las señales características de la doble ligadura de una chalcona (Sri-Nurestri *et al.*, 2011). Estas señales mostraban un acoplamiento en el espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H (**Figura 13**). Por otra parte, en el experimento bidimensional de correlación heteronuclear ^{13}C - ^1H (HSQC) las señales δ_{H} 8.27 y 7.80 mostraron acoplamientos con las señales en δ_{C} 127.5 (C- α) y 142.0 (C- β) (**Figura 14**). Para corroborar la presencia del esqueleto de chalcona se analizó el experimento HMBC (**Figura 15**). Las correlaciones importantes se describen a continuación y se ilustran en la **Figura 16**. El protón H- α muestra acoplamientos con C-2', C-6' y el carbono de carbonilo. En tanto que el H- β muestra acoplamientos con C-2, C-6 y con el carbono de carbonilo. Por otra parte, H-2 y H-6 correlacionan con C- β , no así con el C- α .
2. En δ_{H} 7.70 (2H, $J= 8.0, 2.0$, H-2 y H-6) una señal doble y en δ_{H} 7.43-7.45 (3H, m, H-3 – H-5) un multiplete las cuales deben corresponder a cinco protones (H-2 – H-6) del anillo B de la chalcona. La señal en δ_{H} 7.70 muestra acoplamientos con las señales a δ_{C} 128.3 (C-2 y C-6), mientras que el multiplete muestra acoplamientos con las señales a δ_{C} 128.9 (C-3 y C-5) y δ_{C} 130.1 (C-4) en el experimento HSQC.
3. En δ_{H} 6.05 (2H, sa) un singulete ancho que integra para dos protones y debe corresponder a los protones H-3' y H-5' del anillo A de la chalcona. Esta señal muestra acoplamientos en el experimento HSQC con la señal en δ_{C} 93.7.

4. Por último, en δ_H 3.82 (3H, s) una señal que corresponde a un metoxilo aromático. Esta señal muestra acoplamiento con la señal a δ_C 55.0 en el experimento HSQC (**Figura 14**). Para asignar la posición del metoxilo en el anillo A de la chalcona se analizaron los experimentos HMBC y 1D-NOE diferencial. En el experimento HMBC se encontró que los protones del metoxilo (δ_H 3.82) muestran acoplamiento únicamente con el C-4' (δ_C 166.6). Por otra parte, en el experimento 1D-NOE diferencial al irradiar la señal en δ_H 3.82 se encontró un efecto NOE con los protones en δ_H 6.04 (H-3' y H-5') (**Figura 17**).

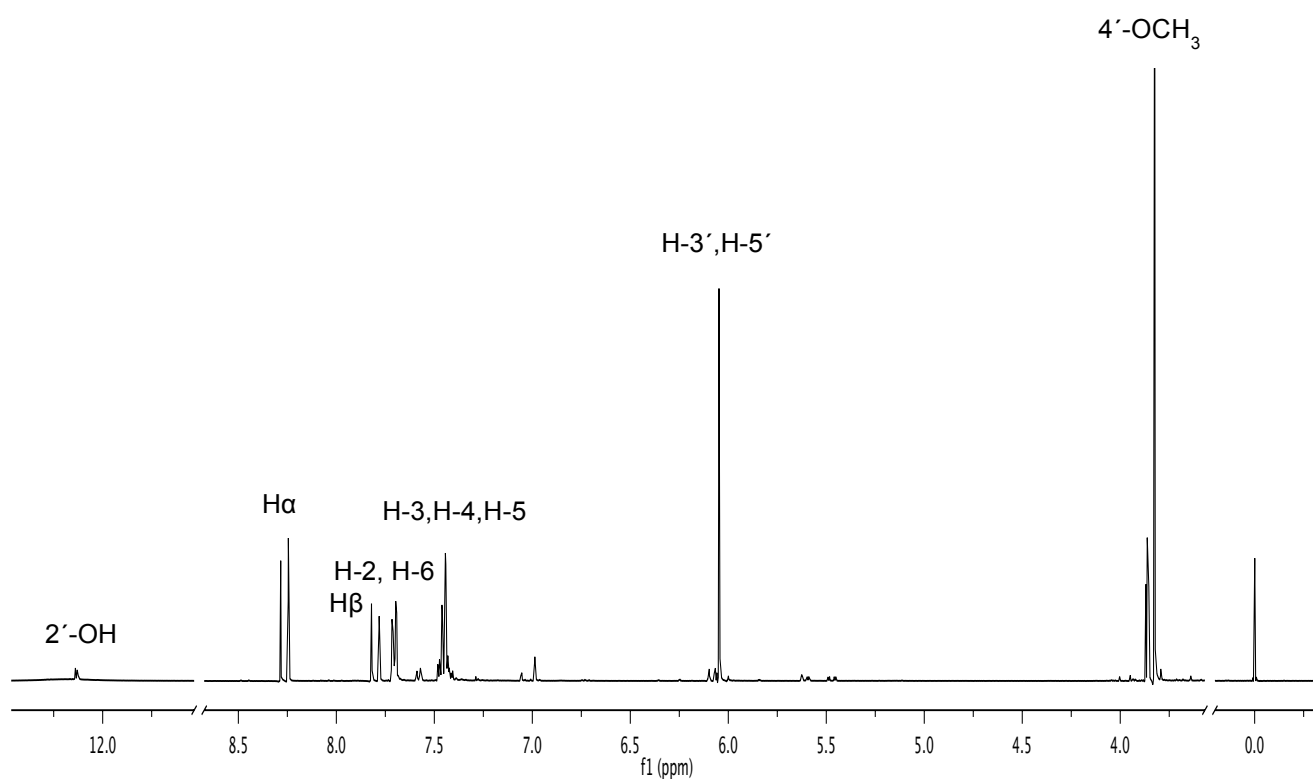


Figura 11. Espectro RMN- ^1H de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), acetona- d_6 , 400MHz.

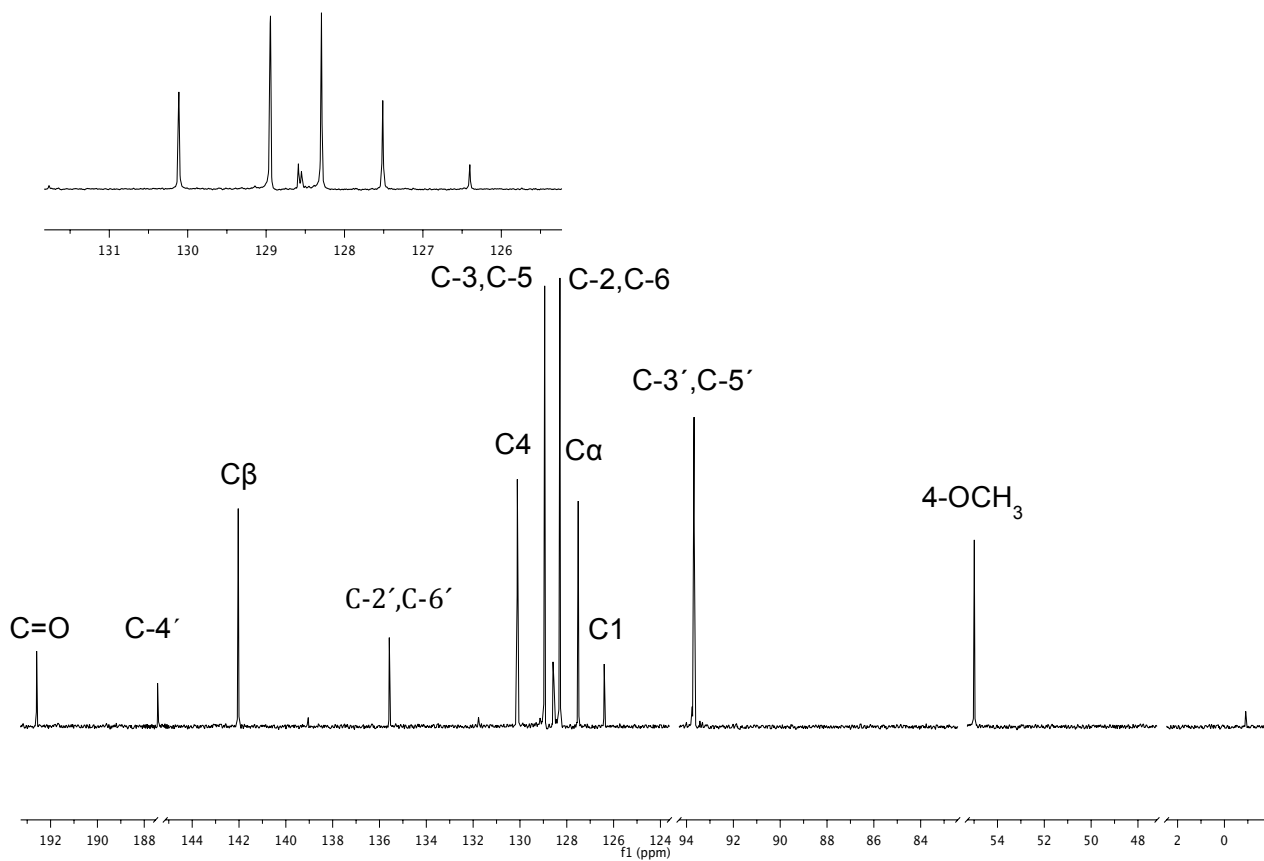


Figura 12. Espectro RMN- ^{13}C de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), acetona- d_6 , 400MHz.

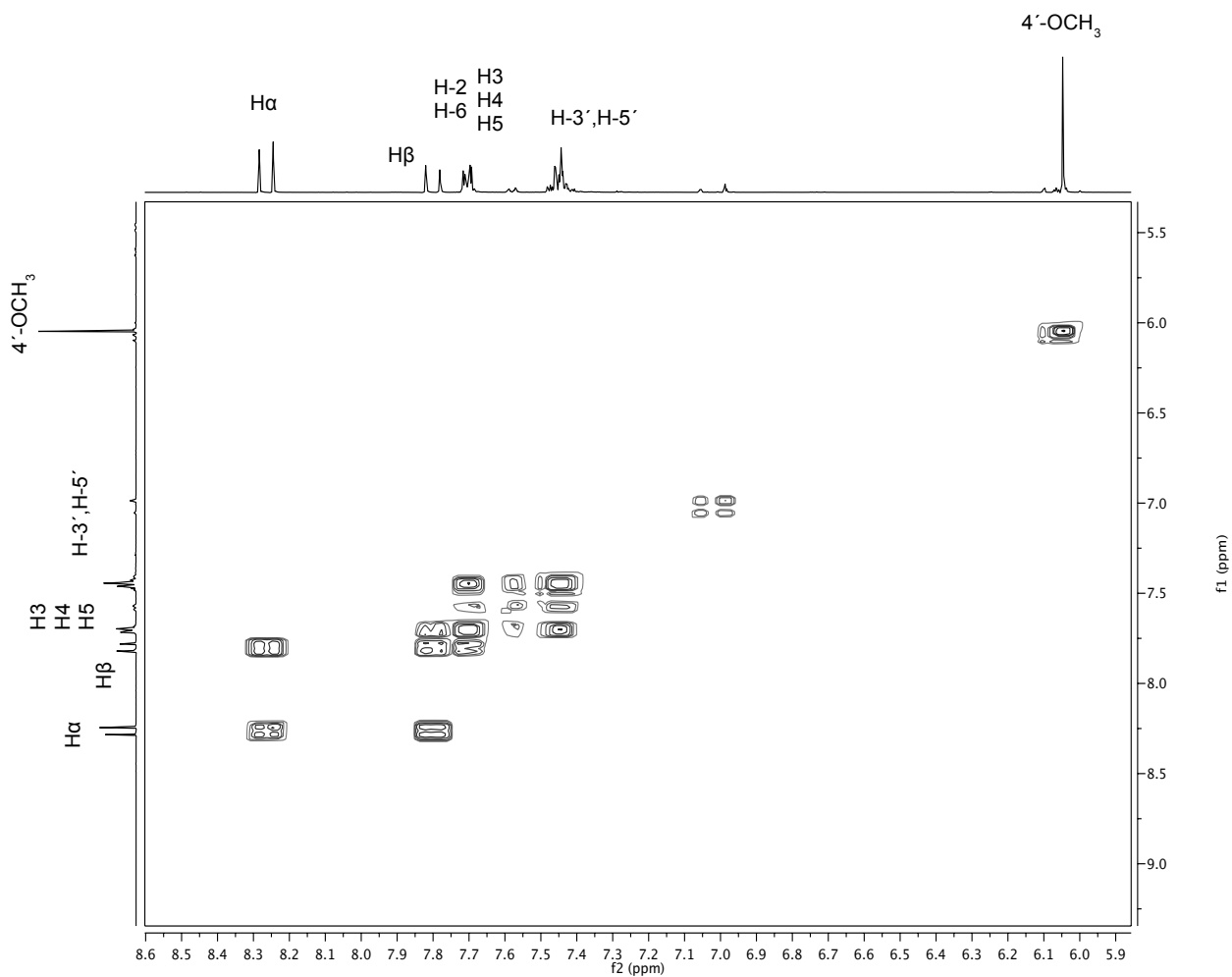


Figura 13. Espectro COSY de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), acetona-*d*₆, 400MHz.

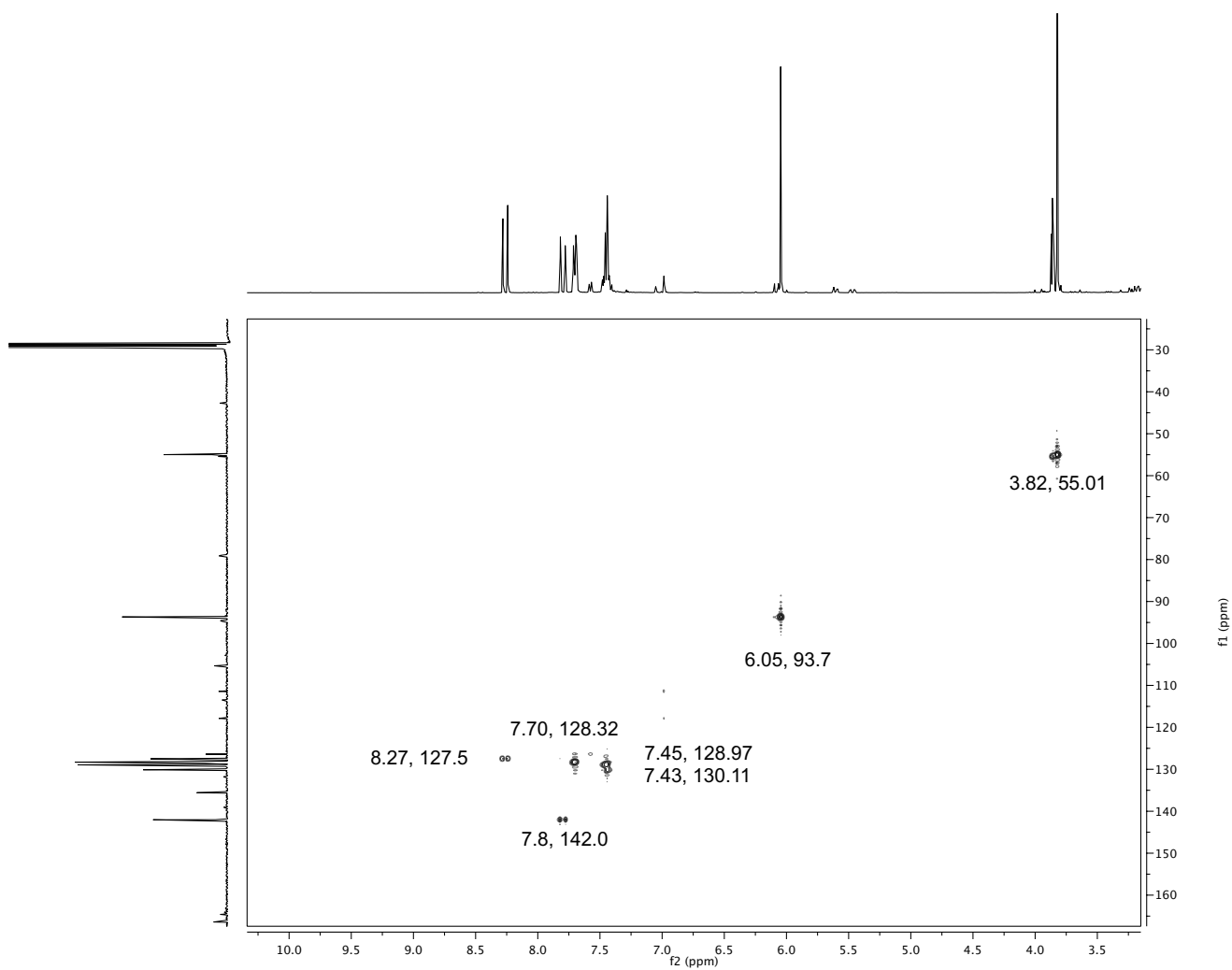


Figura 14. Espectro HSQC de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), acetona- d_6 , 400MHz.

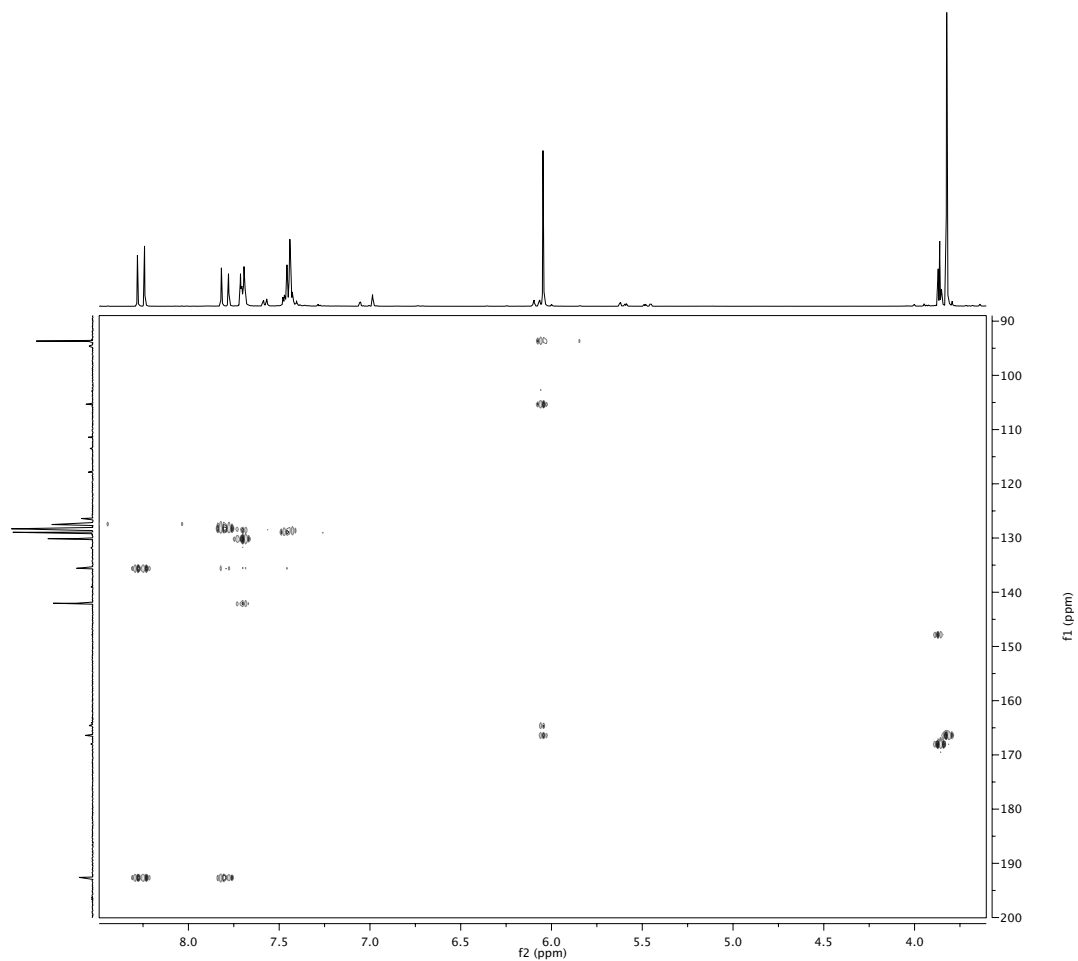


Figura 15. Espectro HMBC de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), acetona- d_6 , 400MHz.

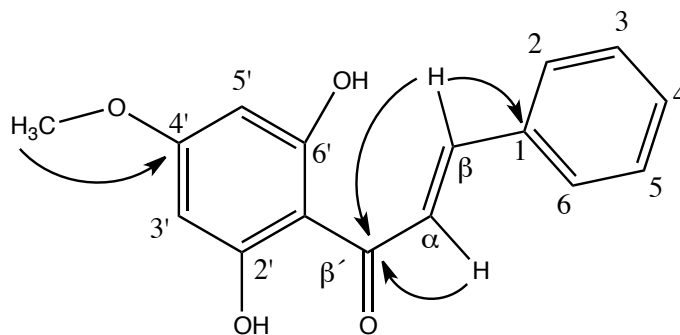


Figura 16. Correlaciones importantes en HMBC en la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), Acetona- d_6 , 400MHz.

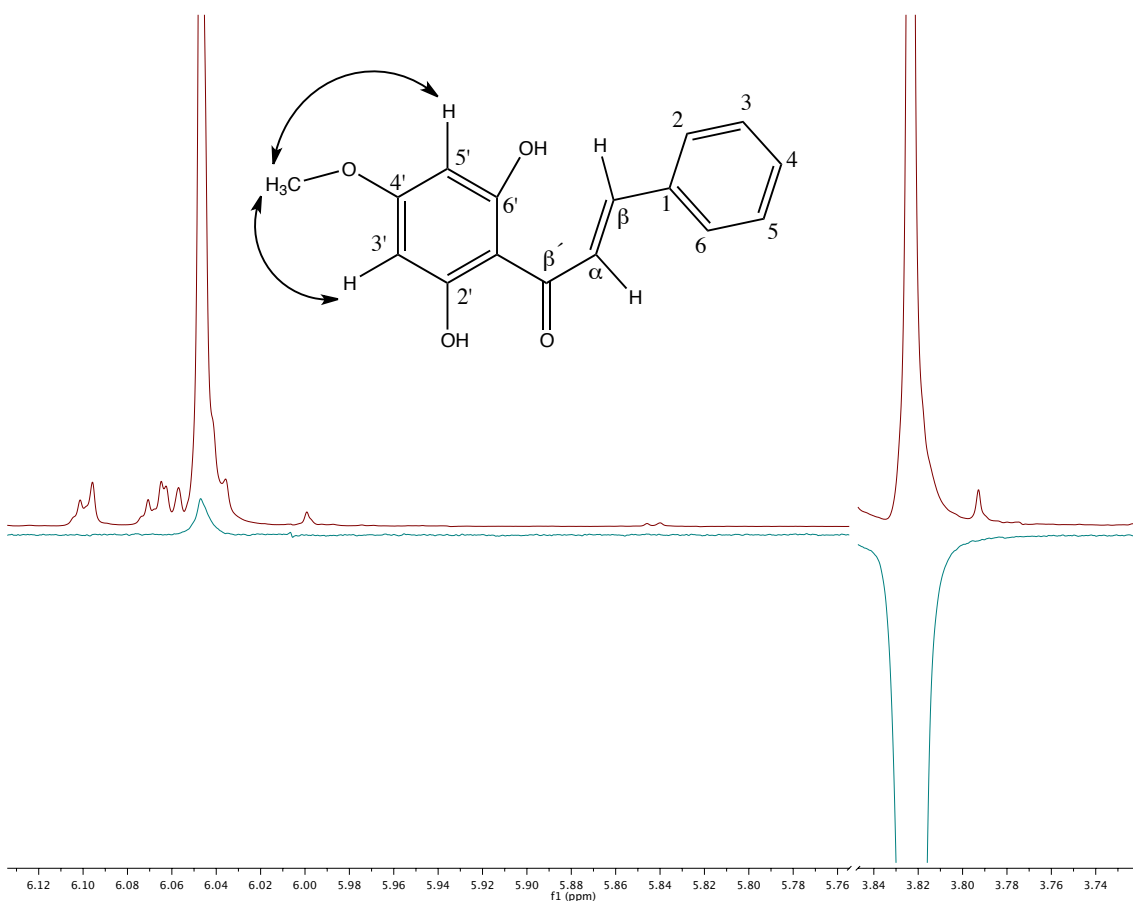
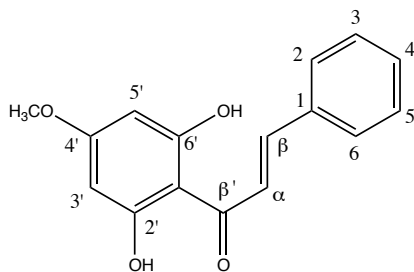


Figura 17. Espectro 1D-NOE diferencial de la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), acetona- d_6 , 400MHz.

Con base en las evidencias descritas previamente el compuesto **2** se identificó como la como 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**). En en la **Tabla 3** se resumen sus constantes espectroscópicas y espectrométricas. Estos resultados están de acuerdo a los obtenidos en la literatura por Sri-Nurestri y cols. (2011).

Tabla 3. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto (**2**).



2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**)

(Acetona-*d*₆, 400MHz)

	¹ H δ (J Hz)	¹³ C δ
α	8.27 (1H, dd, 16)	127.5
β	7.80 (1H, dd, 16)	142.0
2'-OH	12.11	--
2', 6'	--	135.6
3', 5'	6.05 (2H, sa)	93.7
4'	--	166.6
4'-O-CH ₃	3.82 (3H, s)	55.0
2, 6	7.70 (1H, d, 16)	128.3
3, 4, 5	7.43-7.45 (3H, m)	--
3, 5	--	128.9
4	--	130.1
C=O	--	192.6
PM (m/z)	270	
Fragmentos	270 [M ⁺] (46), 193 (100), 166 (76), 138 (68), 95 (57)	

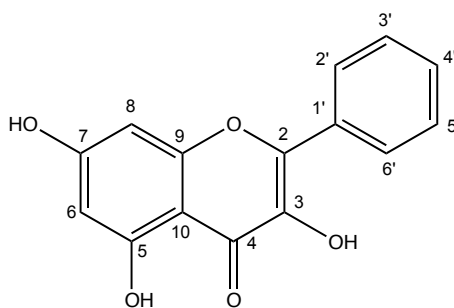
La 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**) ha sido aislada de los rizomas de *Alpinia mutica* (Sri-Nurestri *et al.*, 2011), *Alpinia pricei* (Lin, *et al.*, 2009) y de la raíz de *Piper methysticum* (Xuan *et al.*, 2008). Por otra parte, esta chalcona ha sido identificada por CG-EM en propóleos recolectados en distintos países: Egipto (Zaghloul *et al.*, 2011), Argelia (Lahouel *et al.*, 2010), Albania (Bankova *et al.*, 1994), Canadá (Christov *et al.*, 2006), Reino Unido (Greenaway *et al.*, 1990) y por CL-EM se ha detectado en el propóleo de Brasil (Park *et al.*, 2002). Asimismo, se ha encontrado en exudados de árboles de *Populus* (Bankova *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2002; Christov *et al.*, 2006). Otros estudios reportan sus actividades biológicas y farmacológicas como citotoxicidad contra células de cáncer humano KB, MCF-7 y CaSki (Sri-Nurestri *et al.*,

2011), antiinflamatorias por inhibición de la producción de mediadores de NO (Lin *et al.*, 2009), como atrapadora de radicales libres y disminución del estrés oxidativo renal por aumento en la síntesis de GSH (Lahouel *et al.*, 2010).

4.4.3. Caracterización estructural de los compuestos 3 - 9a

La galangina (**3**) es un flavonol que se ha encontrado en *Glycyrrhiza glabra* (Batirov *et al.*, 1986) e identificado por CL-EM en propóleos argentinos (Volpi y Bergonzini, 2006), italianos (Pappotti *et al.*, 2012), canadienses (García-Viguera, 1993), croatas (Kosalec *et al.*, 2007) y mexicanos (Hernández *et al.*, 2007). Este flavonoide se aisló como un sólido amarillo en forma de agujas. El espectro de masas mostró un ión molecular en m/z 270 y su fórmula se calculó como $C_{15}H_{10}O_5$ con base en su espectro de masas y de RMN- 1H . En la **Tabla 4** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN- 1H para el compuesto (**3**) (Batirov *et al.*, 1986; Bertelli *et al.*, 2012).

Tabla 4. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- 1H del compuesto (**3**).

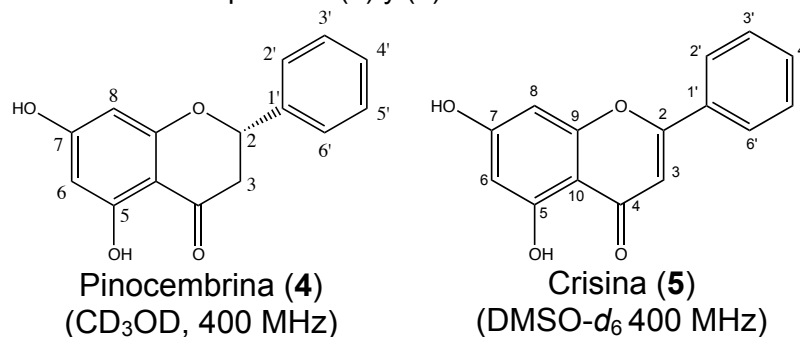


Galangina (**3**)
(CD_3OD , 400 MHz)

1H	δ (J Hz)
5-OH	12.3 (1H, s)
3-OH	9.5 (1H, s)
6	6.19 (1H, d, 4.0)
8	6.40 (1H, d, 4.0)
2', 6'	8.17-8.19 (2H, d, 8.0)
3', 4', 5'	7.42-7.51 (3H, m)
PM (m/z)	270 [M^+]

La pinocembrina (**4**) es una flavanona que se ha identificado por CL-EM en propóleos canadienses (García-Viguera, 1993), croatas (Kosalec *et al.*, 2007), rumanos (Marghitas *et al.*, 2013), turcos (Popova *et al.*, 2007) y mexicanos (Hernández *et al.*, 2007). Tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Candida*, *Saccharomyces* y *Cryptococcus* (Metzner *et al.*, 1977). En este trabajo la pinocembrina se aisló en forma de cristales blancos y su fórmula molecular se estableció como C₁₅H₁₂O₄ con base en su espectro de masas que mostró un ión molecular de *m/z* 256. En la **Tabla 5** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN-¹H para el compuesto (**4**) (Bertelli *et al.*, 2012).

Tabla 5. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H de los compuestos (**4**) y (**5**).



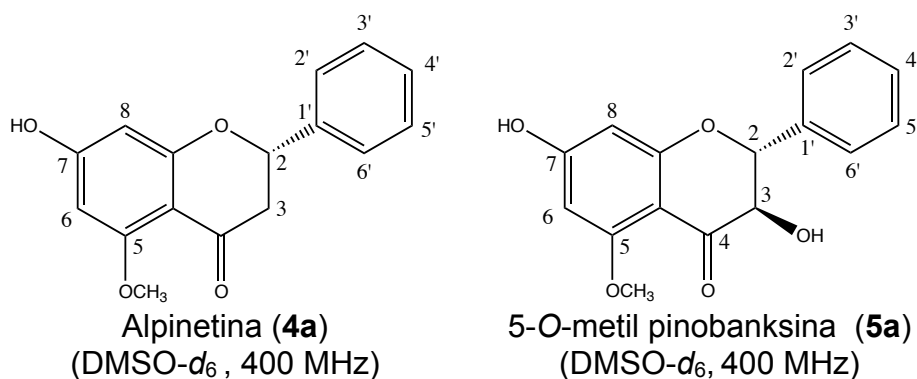
¹ H	δ (J Hz)	δ (J Hz)
2	5.44 (1H, dd, 16.0, 4.0)	--
3	3a 2.76 (1H, dd, 4.0, 16.0) 3b 3.10 (1H, dd, 16.0, 12.0)	6.95 (1H, s)
5-OH	12.32 (1H, s)	--
6	5.90 (1H, d, 4.0)	6.22 (1H, d, 4.0)
8	5.93 (1H, d, 4.0)	6.52 (1H, d, 4.0)
2', 6'	7.48 (2H, dd, 8.0, 4.0)	7.60 (2H, d, 8.0)
3' - 5'	7.35-7.41 (3H, m)	7.56- 7.57 (3H, m)
PM (m/z)	256 [M ⁺]	254 [M ⁺]

La crisina (**5**) es una flavona que se ha aislado previamente a partir de *Scutellaria sp.* (Springer, 2013), así como en especies de *Populus* (Wang *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002). Además se ha identificado por CL-EM como componente de propóleos de diferentes orígenes: en propóleo portugués (Falção *et al.*, 2010), búlgaro (Bankova *et al.*, 1983), de los países bajos (Banskota *et al.*, 2002), argentino (Lima *et al.*, 2009) y mexicano (Hernández *et al.*, 2007). Este flavonoide se aisló como un sólido amarillo

claro. El peso molecular del compuesto fue determinado por espectrometría de masas mediante la técnica de impacto electrónico revelando un ión molecular de m/z 254. Su fórmula molecular se estableció como $C_{15}H_{10}O_4$. En la **Tabla 5** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN- 1H para el compuesto (**5**) (Bertelli *et al.*, 2012).

La alpinetina (**4a**) ha sido aislada de plantas como *Vitex leptobotrys* (Pan *et al.*, 2014) y *Alpinia katsumadai* Hayata (Lu *et al.*, 2014). También se ha identificado en propóleos de distintos países por medio de CL-EM de Francia (Boisard *et al.*, 2014), Portugal (Falção *et al.*, 2010) y China (Luo *et al.*, 2013). Esta flavanona se aisló como cristales blancos y su fórmula molecular se estableció como $C_{16}H_{14}O_4$ por medio de su espectro de masas y RMN- 1H , mostró un ión molecular en m/z 270. En la **Tabla 6** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN- 1H para el compuesto (**4a**) (Burke y Nair, 1986; Katerere *et al.*, 2004).

Tabla 6. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- 1H del compuesto (**4a**) y (**5a**).



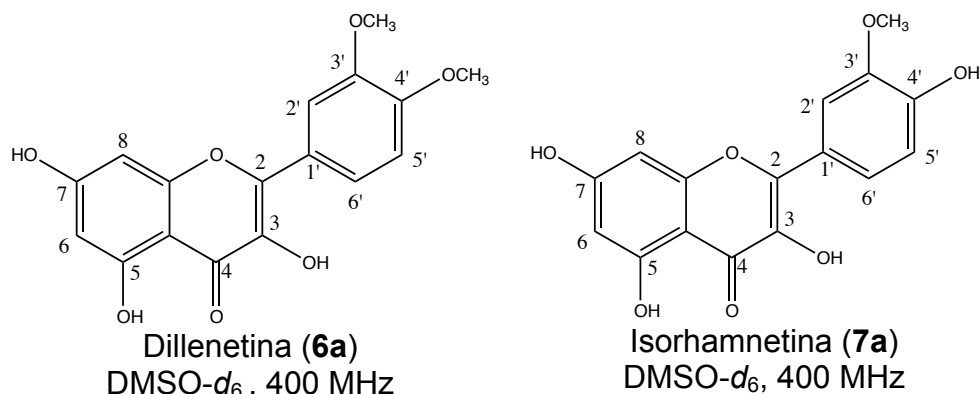
1H	δ (J Hz)	δ (J Hz)
2	5.46 (1H, dd, 16.0, 4.0)	3.32 (1H, d, 12.0)
3	3a 2.96 (1H, dd, 4.0, 16.0) 3b 2.61 (1H, dd, 16.0, 12.0)	5.06 (1H, d, 12.0)
5-OCH ₃	3.70 (3H, s)	3.75 (3H, s)
6	5.98 (1H, d, 2.0)	5.93 (1H, d, 2.0)
8	6.05 (1H, d, 2.0)	6.08 (1H, d, 2.0)
2', 6'	7.46-7.48 (2H, m)	7.46 (2H, d, 8.0)
3', 4', 5'	7.34-7.41 (3H, m)	7.34-7.41 (3H, m)
PM (m/z)	270 [M^+]	286 [M^+]

La 5-O-metilpinobanksina (**5a**) se ha reportado previamente como componente de miel de Serbia (Gasic *et al.*, 2014), e identificado por CL-EM en los propóleos de China (Hatana *et al.*, 2012), México (Li *et al.*, 2007), Grecia (Melliou y Chinou, 2004), Uruguay (Kumazawa *et al.*, 2002) y Checoslovaquia (Nagy *et al.*, 1988). Este compuesto fue aislado y cristalizó en forma de agujas blancas. Su fórmula molecular se estableció como C₁₆H₁₄O₅ por medio de su espectro de masas y RMN-¹H, mostró un ión molecular en *m/z* 286. En la **Tabla 6** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN-¹H para el compuesto (**5a**) (Ching *et al.*, 2007).

La dillenetina (**6a**) se ha aislado a partir de las flores de *Combretum lanceolatum* (Araujo *et al.*, 2013), *Eupatorium odoratum* (Na *et al.*, 2012) y *Rubus parviflorus* (Wollenweber y Doerr, 2008) por mencionar algunos ejemplos. Este flavonol derivado de la quercetina, se aisló como un polvo amarillo. Su fórmula molecular se estableció como C₁₇H₁₄O₇ por medio de su espectro de masas y de RMN-¹H. En la **Tabla 8** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN-¹H para el compuesto (**6a**) (Na *et al.*, 2006).

La isorhamnetina (**7a**) está presente en hojas de *Ginkgo biloba* (Feng *et al.*, 2013) y ha sido identificada por CL-EM en un propóleo chino (Zhao *et al.*, 2012) y uno croata (Sobocanec *et al.*, 2011). Además se ha investigado su actividad biológica, al respecto se ha encontrado que es capaz de inducir apoptosis en células de cáncer de pulmón (Lee *et al.*, 2010) e induce la activación de la ONS en células endoteliales de aorta humana (Shen *et al.*, 2012). Este flavonoide es otro derivado de la quercetina y cristalizó como agujas amarillas. El espectro de masas presentó un ión molecular en 316 *m/z* congruente con la fórmula molecular C₁₆H₁₂O₇. En la **Tabla 7** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN-¹H para el compuesto (**7a**) (Na *et al.*, 2006).

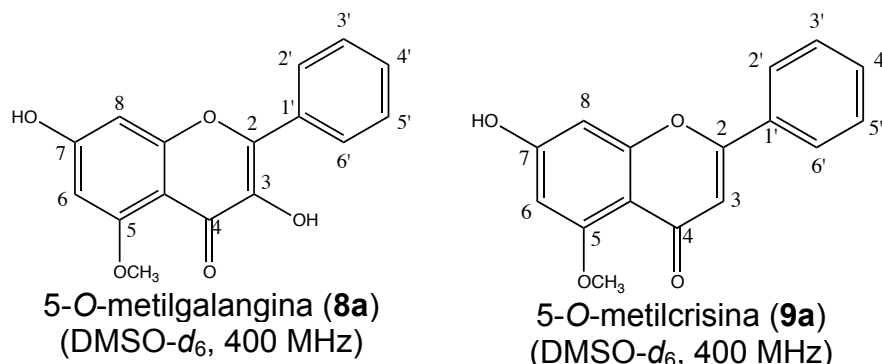
Tabla 7. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H de los compuestos (**6a**) y (**7a**).



¹ H	δ (J Hz)	δ (J Hz)
5-OH	12.55 (1H, s)	12.44 (1H, s)
6	6.18 (1H, d, 2.0)	6.17 (1H, d, 2.0)
8	6.45 (1H, d, 2.0)	6.40 (1H, d, 2.0)
2'	7.62 (1H, s)	7.76 (2H, s)
6'	7.67 (1H, d, 8.0)	7.65 (1H, d, 8.0)
3'-OCH ₃	3.84 (3H, s)	3.82 (3H, s)
4'-OCH ₃	3.78 (3H, s)	--
5'	6.94 (1H, d, 8.0)	6.92 (1H, d, 8.0)
PM (<i>m/z</i>)	330 [M ⁺]	316 [M ⁺]

La 5-O-metilgalangina (**8a**) se ha encontrado en frutos de *Catalpa ovata* (Wollenweber y Doerr, 2008), y se ha identificado por CL-EM en propóleos de Checoslovaquia (Nagy *et al.*, 1988), Portugal (Falçao *et al.*, 2013), propóleos originarios de África (Zhang *et al.*, 2014), China (Shi *et al.*, 2012) e Italia (Pellati *et al.*, 2011). Este flavonol se aisló como un sólido amarillo. Su fórmula molecular se estableció como C₁₆H₁₂O₅ por medio de su espectro de masas, con un ión molecular en *m/z* 284, y de su espectro de RMN-¹H. En la **Tabla 8** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN-¹H para el compuesto (**8a**) (Nagy, 1987).

Tabla 8. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN ¹H de los compuestos (**8a**) y (**9a**).



¹ H	δ (J Hz)	δ (J Hz)
3	--	6.68 (1H, s)
3-OH	9.5 (1H, s)	--
5-OCH ₃	3.81 (3H, s)	3.78 (3H, s)
6	6.34 (1H, d, 2.0)	6.38 (1H, d, 4.0)
7-OH	10.0 (1H, s)	--
8	6.47 (1H, d, 2.0)	6.55 (1H, d, 4.0)
2', 6'	8.11 (2H, d, 8.0)	7.98 (2H, d, 8.0)
3', 4', 5'	7.43-7.54 (3H, m)	7.43- 7.54 (3H, m)
PM (m/z)	284 [M ⁺]	268 [M ⁺]

La 5-O-metilcrisina (**9a**) ha sido identificada por CL-EM en propóleo portugués (Falção *et al.*, 2013), italiano (Pellati *et al.*, 2011) y checo (Nagy *et al.*, 1989). De su actividad biológica se conoce su capacidad para inhibir la aldosa reductasa (Patra y Chua, 2011), esta es una enzima que lleva a complicaciones microvasculares en la *diabetes mellitus*. Esta flavona fue aislada como un polvo amarillo. El espectro de masas por impacto electrónico mostró un ión molecular en *m/z* 268 y su fórmula molecular se estableció como C₁₆H₁₂O₄ por medio de su espectro de masas y de RMN-¹H. En la **Tabla 8** se resumen los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en RMN-¹H para el compuesto (**9a**) (Nagy, 1989).

4.5. Evaluación de la actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos y de los compuestos aislados se determinó utilizando los ensayos de captura del radical DPPH y de decoloración de β-caroteno.

4.5.1. Ensayo de decoloración del radical DPPH

La sustancia de referencia que se utilizó para comparar y cuantificar la capacidad antioxidante de los EEP y compuestos aislados es el ácido (+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2- carboxílico (Trolox®). Se construyó una curva de calibración con este antioxidante, de la que se obtuvo una ecuación ajustada $A = -0.0049 C + 0.587$ ($r^2 = 0.9945$). Los valores de absorbencia registrados se interpolaron en la ecuación y se calculó la TEAC (Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity). En esta versión de punto final del método de DPPH, se mide el potencial de donar H en una muestra y se expresa mediante la CI_{50} (Roginsky y Lissi, 2005) y se define como la concentración, del antioxidante o compuesto de prueba requerido para reducir la cantidad de DPPH en un 50% de su concentración original y permite caracterizar el poder antioxidante de la muestra (Roginsky y Lissi, 2005; Habsah *et al.*, 2004). Cuando no fue posible calcular el TEACs o la CI_{50} , se calculó el porcentaje de DPPH neutralizado por cada compuesto.

A partir de la curva de calibración construida con el antioxidante comercial Trolox® se obtuvo la ecuación de la recta utilizando un modelo de regresión lineal ajustada. En esta ecuación se interpolaron las absorbencias obtenidas de los extractos etanólicos de propóleo de Puebla y Guanajuato, con la finalidad de obtener los TEACs. El EEP de Puebla tuvo un TEAC mayor (107.1 ± 0.12 mM Trolox®/g extracto) al del EEP de Guanajuato (18.10 ± 2.46 mM Trolox®/g extracto). Los TEACs se correlacionan con la cantidad de fenoles totales cuantificados utilizando el método de Folin-Ciocalteu ya que ambos miden la capacidad reductora de una muestra mediante el mecanismo de transferencia de electrones que es un mecanismo de acción de los antioxidantes (Prior *et al.*, 2005). Para el EEP de Puebla se obtuvo una $CI_{50} = 100$ µg/ mL. En el caso del EEP de Guanajuato no fue posible determinar la CI_{50} debido a que la concentración más alta empleada (1.0 mg/mL) no alcanzó el 50% de inhibición del radical DPPH.

Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los compuestos mayoritarios aislados. Para estos sólo se calculó el porcentaje de DPPH neutralizado. Se

utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular el % DPPH neutralizado (Cheng *et al.*, 2006):

$$\%DPPH^{\cdot}_{\text{remanente}} = (A_{\text{muestra}} / A_{DPPH^{\cdot}}) \times 100$$

$$\%DPPH^{\cdot}_{\text{neutralizado}} = 100 - \%DPPH^{\cdot}_{\text{remanente}}$$

Los flavonoides que capturaron el radical DPPH fueron la crisina (4.6%), galangina (50.5%) y la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (33.0%). La diferencia en el porcentaje de inhibición de radical se explica por la estructura de los flavonoides como lo describen varios autores. Las funcionalidades más importantes en los flavonoides es el grupo catecol o pirogalolil (O-trihidroxi) en el anillo B ya que donan un hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y dando lugar a un radical flavonoide relativamente estable (Heim *et al.*, 2002; Procházková *et al.*, 2011). Por su parte, Procházková y cols. (2011) que enlistan una serie de requerimientos estructurales en los flavonoides para un atrapamiento eficiente de los radicales, de las cuales la galangina cumple con la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 que proveen puentes de hidrógeno al grupo carbonilo. Van Acker y cols. (1996) mencionan que la importancia del 3-OH en la galangina es su capacidad para oxidarse, y presenta buena actividad antioxidante aunque no tenga la función catecol en el anillo B. La pinocembrina no neutralizó los radicales y la crisina lo hizo en baja cantidad, porque ambos flavonoides carecen de sustitución en el anillo B y de hidroxilo en la posición 3; la poca neutralización observada se debe a la presencia de hidroxilos del anillo A (Heim *et al.*, 2002) que da como resultado la formación de radicales inestables, por lo que se consideran atrapadores débiles (Burda *et al.*, 2001).

4.5.2. Ensayo de decoloración de β -caroteno

La lipoperoxidación es un proceso cuya propagación está mediada por radicales libres en los ácidos grasos poliinsaturados. Esta reacción involucra la generación de varios tipos de radicales libres y su terminación ocurre vía enzimática o por atrapamiento de los radicales por los antioxidantes (Heim *et al.*, 2002). En este

ensayo se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (%AA) de los extractos etanólicos y los compuestos aislados. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular el %AA:

$$\%AA = 100 \frac{DR_c - DR_s}{DR_c}$$

Donde:

DR_c= Rapidez de degradación del control

DR_s=rapidez de degradación en presencia de la muestra

Para el EEP de Puebla se obtuvo un %AA= 44.2 ± 1.4% y el EEP de Guanajuato no inhibió la peroxidación. La pinocebrina (**4**), galangina (**3**) y la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**) inhibieron la lipoperoxidación en 3.7 ± 1.3 %, 27.8 ±1.5% y 10.7 ± 5.2%, respectivamente. El EEP de Puebla y la galangina (**3**) tienen una actividad comparable al Trolox® (33.5 ± 2.3%). Estos resultados son congruentes por los reportados por Shah y cols. (2013) en un estudio sobre el potencial para atrapar radicales libres por el extracto de *Sida cordata* y por los descritos por Kumazawa y cols. (2004) en muestras de propóleo de distintos orígenes.

La importancia de la capacidad antioxidante de los extractos y de sus componentes radica en su potencial para neutralizar los radicales producidos en el cuerpo cuando los mecanismos antioxidantes fallan (Ríos de Molina, 2003). Los radicales libres son especies muy reactivas que pueden causar daño a componentes de la célula como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y están asociadas a varias enfermedades (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

4.6. Determinación del efecto de los extractos sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral

Las bacterias empleadas en el estudio antimicrobiano fueron *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis*. Pertenecen al género *Streptococcus* y se caracterizan por presentar una

disposición en cadena así como tinción Gram (+). Constituyen un grupo complejo que probablemente sea la causa de más enfermedades y que provoque una diversidad de dolencias mayor que cualquier otro grupo de bacterias (Tortora *et al.*, 2007). En particular, las bacterias usadas son consideradas como bacterias cariogénicas primarias ya que forman la placa dental por adhesión a la superficie dental mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986).

Respecto a la técnica empleada, Reller y Weinstein (2009) señalan que la microdilución se considera un buen método para probar de manera rápida y simultánea un gran número de muestras, además es adecuada para comparar extractos de propóleo y da resultados consistentes. En la **Tabla 9** se resumen las CMI's obtenidas para los EEP de Puebla y Guanajuato para los diferentes microorganismos de prueba.

Tabla 9. CMI's obtenidas para los EEP de Puebla y Guanajuato para los diferentes microorganismos de prueba.

Bacteria	CMI ($\mu\text{g/mL}$) Puebla	CMI ($\mu\text{g/mL}$) Guanajuato
<i>S. mutans</i>	2000	2050
<i>S. sanguinis</i>	250	4100
<i>S. oralis</i>	500	2050

Ríos y cols. (1988) consideran que un extracto vegetal es activo si su CMI es menor a 1.0 mg/mL cuando se utiliza el método de microdilución en placa. En este estudio, se encontró que el EEP de Puebla no tiene efecto sobre el crecimiento de *S. mutans*, y sí es capaz de inhibir el crecimiento de *S. sanguinis* y *S. oralis*. Mientras que el EEP de Guanajuato no resultó activo contra ninguna de las bacterias evaluadas. Estos resultados son comparables con los encontrados por Park y cols. (1998) y Duarte y cols. (2003) reportan la inhibición del crecimiento de *S. mutans* y *S. sobrinus in vitro* por EEP a una concentración de 0.080 mg/mL, así como disminución

de caries en ratas e inhibición de las glucosiltransferasas (>80% a una concentración de 0.5 mg/mL).

La capacidad antimicrobiana del EEP se atribuye a su composición variable y compleja, por lo que también se puede inferir que su actividad viene dada por la combinación de los mecanismos de acción que forman la mezcla y que actúan sinérgicamente (Fokt *et al.*, 2010).

Los compuestos polifenólicos, principalmente las agliconas de flavonoides, se consideran las sustancias con mayor actividad antibacteriana en el propóleo (Ghisalberti, 1979; Grange y Davey, 1990; Bonheví *et al.*, 1994). Es importante destacar que a partir de las dos muestras estudiadas se aislaron los flavonoides galangina (**3**) y pinocembrina (**4**) que en un estudio previo Takaisi-Kikuni y Schilcher (1994) describen como inactivadores de la ARN-polimerasa de *S. mutans*.

Otro tipo de flavonoides con actividad antibacteriana descrita son las chalconas (Nielsen *et al.*, 2004; Ávila *et al.*, 2008). A partir del propóleo de Puebla se aisló una chalcona, la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), la cual tiene el anillo C abierto y es precisamente esta característica lo que confiere una mayor actividad antibacteriana (Cushnie y Lamb, 2011). Por otra parte, en otro estudio Ávila y cols. (2008) y Liu y cols. (2008) describen que la presencia de hidroxilos en las posiciones 2' y 4' mejoran su actividad respecto a los flavonoides con anillo C.

En la literatura se han descrito otros mecanismos mediante los cuales los flavonoides ejercen su acción antibacteriana. Entre los mecanismos destacan: daño a la membrana citoplasmática (causada por perforación y/o reducción de la fluidez de la membrana), inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (por inhibición de la topoisomerasa) e inhibición de la energía metabólica (por inhibición de la reductasa de NADH-citocromo C) (Mori *et al.* 1987; Bernard *et al.*, 1997; Haraguchi *et al.*, 1998; Tsuchiya *et al.*, 2000; Plaper *et al.*, 2003).

Por último, es importante destacar que las bacterias cariogénicas se encuentran implicadas en diversos padecimientos entre los cuales se puede destacar por su frecuencia a la endocarditis bacteriana. Esta enfermedad tiene alta morbilidad y mortalidad y en el 90% de los casos se aíslan a partir de pacientes infectados tres grupos de bacterias, que comparten la capacidad de adherirse al endocardio: *Staphylococci*, *Streptococci* y *Enterococci* (López *et al.*, 2005). Los estreptococos del grupo *Viridans* ocasionalmente acceden al sistema vascular y causan endocarditis. La principal bacteria causante de la endocarditis era *S. sanguis*, sin embargo, recientemente ha sido desplazada por *Staphylococcus aureus*. Estudios que usan modelos de endocarditis en animales han mostrado que *S. sanguis* tiene la habilidad de adherirse y activar a las plaquetas (Fitzgerald *et al.*, 2006). Como consecuencia hay desarrollo de la inactividad trombotica de las válvulas cardíacas que a su vez resulta en falla cardíaca (Tilley *et al.*, 2013).

4.7. Actividad vasorrelajante de los extractos y compuestos en el ensayo en aorta aislada de rata

Este ensayo consistió en medir el efecto sobre la musculatura lisa vascular de los extractos etanólicos en el modelo de aorta aislada de rata, siguiendo la metodología descrita por Ibarra y cols. (2002). La relativa facilidad del ensayo lo hacen apropiado para la evaluación preliminar del efecto farmacológico de los extractos de prueba.

La construcción de las curvas concentración-respuesta se realizaron mediante un programa de ajuste no lineal (PRISMA 3.0) (**Figura 18**). De estas curvas se calcularon: el efecto máximo (%E_{máx}) y la concentración efectiva media (CE₅₀) para cada extracto etanólico, de los compuestos aislados y del control positivo acetilcolina. Para el propóleo de Puebla se obtuvo un %E_{máx}= 23.9 ± 1.2 y CE₅₀= 7.52 ± 2.1 µg/mL, mientras que para el propóleo de Guanajuato, %E_{máx}= 115.7 ± 2.7 % y CE₅₀= 231.9 ± 18.3 µg/mL. Se observa que el EEP de Guanajuato es más eficaz que el EEP de Puebla, sin embargo se requiere una mayor cantidad de extracto para lograrlo (menos potente). En cuanto a los flavonoides mayoritarios, pinocembrina (**4**)

y crisina (5) se encontró que produjeron la relajación de la aorta con $E_{m\acute{a}x} = 35.4 \pm 3.6$ %, $CE_{50} = 4.37 \pm 0.002$ $\mu\text{g/mL}$ y $E_{m\acute{a}x} = 96.7 \pm 2.6$, $CE_{50} = 59.1 \pm 3.7$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

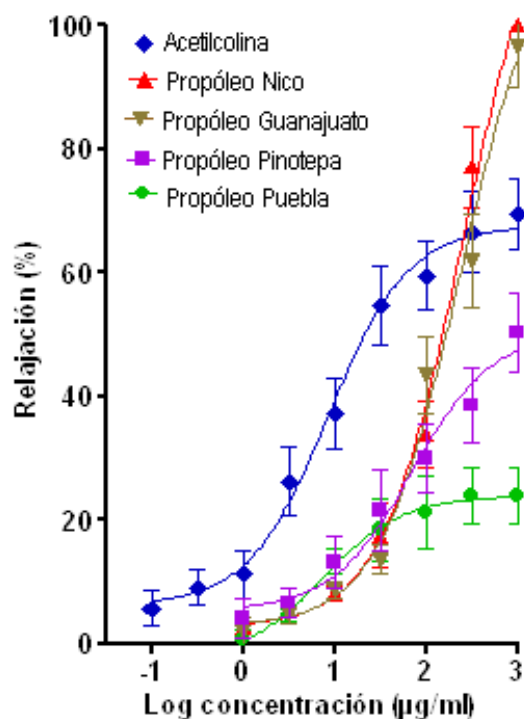


Figura 18. Curva de concentración – respuesta para algunos EEP.

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos reducen la presión arterial en ratas y aumentan el proceso de relajación (Iijima *et al.*, 2000; Diebolt *et al.*, 2001; Bernatova *et al.*, 2002). Para entender los posibles mecanismos por los cuales los flavonoides mejoran la propiedad de relajación de la pared arterial, Andriambelason y cols. (1997) y Fitzpatrick y cols. (1993) han usado los anillos de aorta de rata como modelo experimental. Los resultados de estos estudios muestran que los compuestos fenólicos tienen un efecto directo sobre la producción de NO por las células endoteliales.

Morello y cols. (2006) estudiaron el efecto de la galangina sobre la contractilidad de anillos de aorta de rata, encontraron que ejerce esta acción mediante un mecanismo dependiente de endotelio, que involucra NO y puede inducir relajación independiente

de endotelio por inhibición del movimiento de calcio a través de las membranas celulares.

En experimentos *in vitro* sobre aorta aislada de rata se ha demostrado que la crisina puede inducir relajación vía endotelio y dependiente de NO, por medio de la inactivación de $O_2^{\cdot-}$ y por potenciación de vasodilatación vía de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Duarte *et al.*, 2001)

Las flavanonas tienen bajo efecto relajante comparadas con otros flavonoides (quercetina, campferol, apigenina, luteolina, crisina, genisteína) debido a la ausencia de la doble ligadura C2-C3, ya que ésta proporciona una conformación coplanar del anillo benzopirano y parece ser requerido para la actividad vasodilatadora (Herrera *et al.*, 1996).

CONCLUSIONES

El estudio químico del propóleo recolectado en el apiario de “Álamo blanco”, en Valsequillo, Puebla permitió el aislamiento de los flavonoides: izalpinina (**1**), 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), galangina (**3**), pinocembrina (**4**) y crisina (**5**). Por otra parte, del EEP derivado de una muestra recolectada en Silao, Guanajuato se aislaron los flavonoides: pinocembrina (**1a**), crisina (**2a**), galangina (**3a**), alpinetina (**4a**), 5-O-metilpinobanksina (**5a**), dillenetina (**6a**) isorhamnetina (**7a**), 5-O-metilgalangina (**8a**) y 5-O-metilcrisina (**9a**).

El contenido de fenoles totales y flavonoides totales en el EEP de Puebla fue de 149.4 ± 1.5 mg equivalente de ácido gálico por gramo de extracto y 29.7 ± 0.53 mg equivalentede quercetina por gramo de extracto, respectivamente. Estos contenidos cumplen con las normas de calidad establecidas por Argentina y Brasil para medir la calidad de los propóleos, > 40 mg de equivalentes de ácido gálico/g muestra para fenoles totales y > 5 mg de equivalentes de quercetina/g muestra para flavonoides totales.

El propóleo de Guanajuato contiene 38.3 ± 3.8 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto y 3.1 ± 1.7 mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto. Es importante mencionar que la cantidad de flavonoides encontrada en esta muestra no cumple con las normas previamente mencionadas.

El EEP de Puebla presentó una moderada capacidad antioxidante con una $CI_{50} = 100$ $\mu\text{g/mL}$, $TEAC = 107.1 \pm 0.12$ mM Trolox®/g extracto en el ensayo de DPPH y una actividad equiparable al Trolox® (%AA= $44.2 \pm 1.4\%$) en el ensayo de blanqueamiento de β -caroteno. Por otra parte, presentó efecto moderado sobre el crecimiento de las bacterias *S. sanguinis* (CMI= $250 \mu\text{g/mL}$) y *S. oralis* (CMI= $500 \mu\text{g/mL}$). Por último, presentó efecto relajante de la musculatura lisa vascular en el ensayo de aorta aislada de rata con una $\%E_{m\acute{a}x} = 23.9 \pm 1.2$ y $CE_{50} = 7.52 \pm 2.1$

µg/mL. Estos resultados fueron comparables con los obtenidos para el control positivo acetilcolina con una $\%E_{m\acute{a}x} = 67.6 \pm 3.3 \%$ y una $CE_{50} = 8.6 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$

El EEP de Guanajuato tuvo una pobre capacidad antioxidante y no se pudo calcular su Cl_{50} , TEAC= $18.10 \pm 2.46 \text{ mM Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto y no fue capaz de inhibir la peroxidación en el ensayo de blanqueamiento de β -caroteno. Por otra parte, no presentó efecto sobre el crecimiento de las bacterias evaluadas ($\text{CMI} > 2.0 \mu\text{g/mL}$). Finalmente, en el ensayo *in vitro* conducente a determinar su actividad vasorrelajante en el modelo de aorta aislada de rata se encontró un $\%E_{m\acute{a}x} = 115.7 \pm 2.7 \%$ y una $CE_{50} = 231.9 \pm 18.3 \mu\text{g/mL}$. Estos valores fueron considerablemente menores a los obtenidos para el control positivo acetilcolina.

Con base en los resultados obtenidos en las evaluaciones biológicas se puede afirmar que el método y la zona de recolección de las muestras influye directamente en la composición de los propóleos. En este sentido el propóleo de Puebla obtenido por el método de raspado resultó ser de mejor calidad que el de Guanajuato obtenido mediante trampas.

La evaluación de la capacidad antioxidante en el ensayo de DPPH permitió determinar que los flavonoides 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), galangina (**3**), pinocembrina (**4**) y crisina (**5**) atrapan este radical en un porcentaje de 33.0%, 50.5%, 0% y 4.6%, respectivamente. Las diferencias encontradas en la capacidad antioxidante pueden explicarse por las diferencias en la disposición y presencia de los grupos funcionales que presentan los flavonoides estudiados. Es necesaria la presencia de la doble ligadura en C2-C3 y el hidroxilo en el C3, tal como se ha descrito previamente en la literatura (Heim *et al.*, 2002; Prochazková *et al.*, 2011).

La evaluación del efecto de los flavonoides aislados en el ensayo del blanqueamiento de β -caroteno permitió determinar que la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**2**), galangina (**3**) y pinocembrina (**4**) inhibieron la lipoperoxidación en los siguientes

porcentajes $10.7 \pm 5.2\%$, $27.8 \pm 1.5\%$ y $3.7 \pm 1.3\%$. Sin embargo, estos resultados no son equiparables a la actividad del Trolox®.

En el ensayo de aorta aislada de rata se evaluó el efecto de los flavonoides pinocembrina (**4**) y crisina (**5**). Se encontró que produjeron la relajación de la aorta con $E_{m\acute{a}x} = 35.4 \pm 3.6 \%$, $CE_{50} = 4.37 \pm 0.002 \mu\text{g/mL}$ y $E_{m\acute{a}x} = 96.7 \pm 2.6 \%$, $CE_{50} = 59.1 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

PERSPECTIVAS

Continuar con el estudio químico que conlleve al aislamiento de los compuestos minoritarios presentes en las muestras de propóleo.

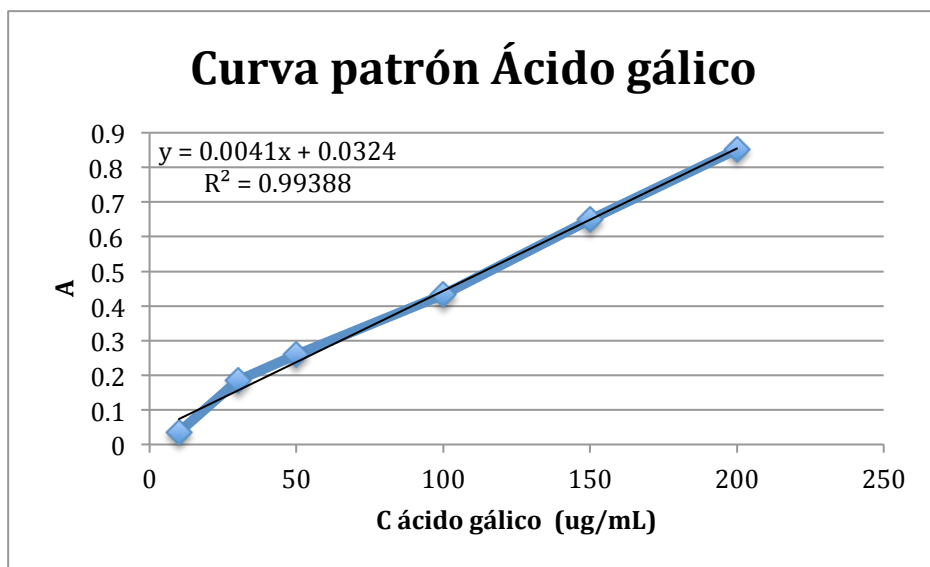
Evaluar si los extractos etanólicos de propóleo de Puebla y Guanajuato tienen la capacidad de neutralizar las especies reactivas: anión superóxido, radical hidroxilo, oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y peroxinitrito.

Evaluar el efecto vasorrelajante sobre la aorta aislada de rata de los flavonoides minoritarios aislados en el presente estudio.

ANEXO

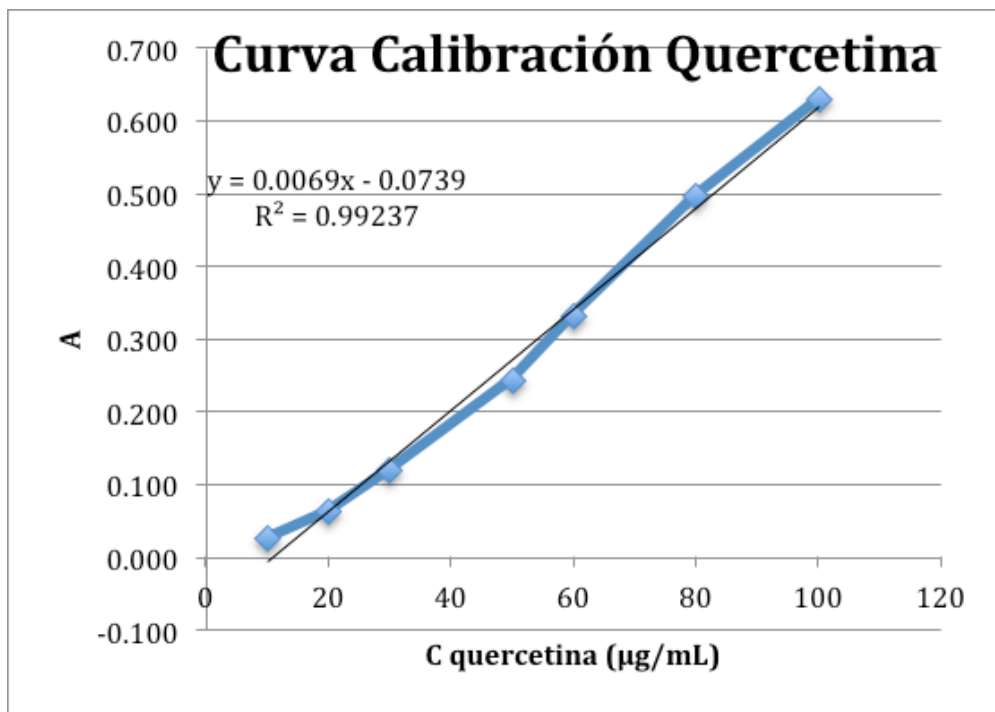
1. Curva calibración fenoles totales

C (µg/mL) ácido gálico	A
5	0.0192
10	0.0359
30	0.1858
50	0.2583
100	0.4329
150	0.6493
200	0.8518



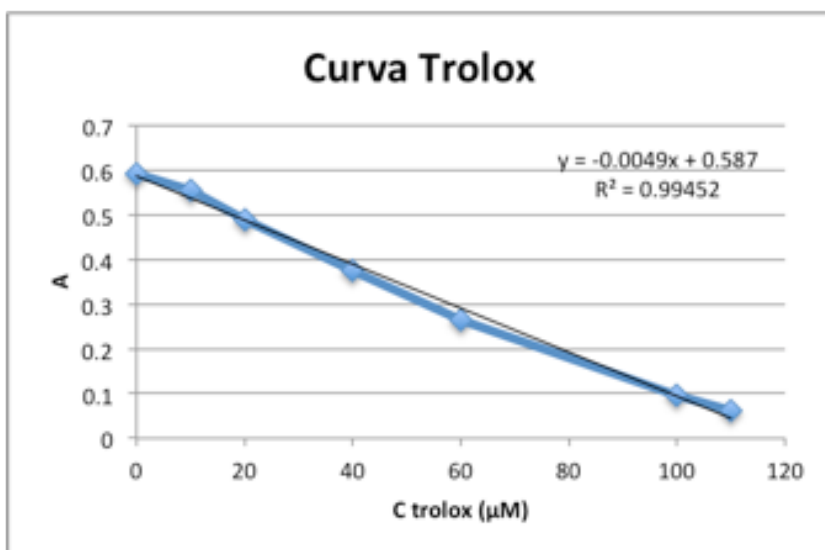
2. Curva calibración flavonoides totales

C (µg/mL) quercetina	A
5	0.012
10	0.026
20	0.063
30	0.119
50	0.245
60	0.333
80	0.497
100	0.630



3. Curva de calibración con Trolox® para el ensayo de decoloración de DPPH.

C (µM) Trolox ®	A
0	0.591
10	0.556
20	0.488
40	0.376
60	0.265
100	0.095
110	0.062



4. Cálculo de %DPPH remanente y neutralizado.

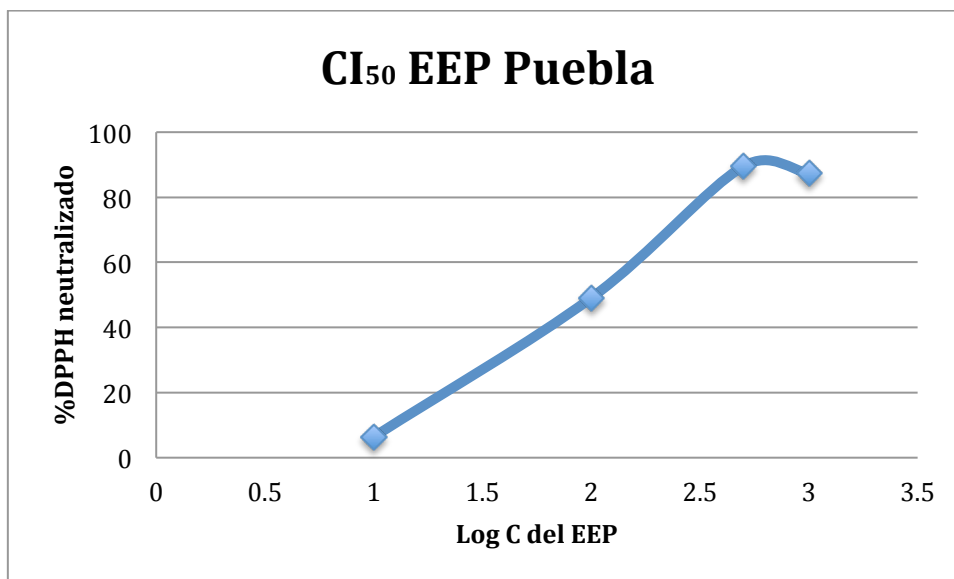
	% DPPH remanente	%DPPH neutralizado	Promedio %DPPH neutralizado
AB1	95.4	4.6	6.4
AB1	93.4	6.6	
AB1	91.9	8.1	
AB2	49.2	50.8	49.1
AB2	51.1	48.9	
AB2	52.3	47.7	

AB3	10.5	89.5	89.5
AB3	10.7	89.3	
AB3	10.5	89.5	
AB4	12.5	87.5	87.5
AB4	12.5	87.5	
AB4	12.4	87.6	
PG1	115.4	-15.4	-13.0
PG1	110.3	-10.3	
PG1	113.2	-13.2	
PG2	101.9	-1.9	-2.0
PG2	101.9	-1.9	
PG2	102.4	-2.4	
PG3	86.5	13.5	15.7
PG3	84.1	15.9	
PG3	82.4	17.6	
PG4	65.7	34.3	34.0
PG4	68.4	31.6	
PG4	64.1	35.9	
PIN	100.8	-0.8	-1.9
PIN	102.9	-2.9	
PIN	102.0	-2.0	
CRIS	93.9	6.1	4.6
CRIS	94.8	5.2	
CRIS	97.5	2.5	
GAL	50.8	49.2	50.5
GAL	49.2	50.8	
GAL	48.4	51.6	
B3	66.5	33.5	33.0
B3	67.9	32.1	
B3	66.7	33.3	

AB=EEP Puebla, PG= EEP Guanajuato, PIN=pinoembrina, CRIS=crisina, GAL= galangina, B3= 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona.

5. Curva de CI_{50} en el ensayo de decoloración de DPPH

C ($\mu\text{g/mL}$)	Log C	%DPPH neutralizado
1000	3	87.5
500	2.7	89.5
100	2	49.1
10	1	6.4



6. Cálculos para el %AA en el ensayo de decoloración de β -caroteno.

t=0			t=60 min			
	a			b		
Réplica #	1	2	3	1	2	3
control	0.577	0.549	0.566	0.4	0.381	0.436
EEP Puebla	0.561	0.571	0.579	0.459	0.464	0.381
EEP Guanaj	0.559	0.565	0.569	0.35	0.395	0.385
pinocemb	0.57	0.571	0.5	0.384	0.419	0.406
crisina	0.506	0.561	0.467	0.332	0.404	0.416
galangina	0.563	0.555	0.559	0.426	0.455	0.408
chalcona	0.561	0.552	0.56	0.41	0.393	0.352
Trolox [®]	0.57	0.569	0.499	0.459	0.464	0.381

Réplica #	a/b			Ln a/b		
	1	2	3	1	2	3
control	1.44	1.44	1.30	0.366	0.365	0.261
EEP Puebla	1.22	1.23	1.52	0.201	0.208	0.419
EEP Guanaj	1.60	1.43	1.48	0.468	0.358	0.391
pinocemb	1.48	1.36	1.23	0.395	0.310	0.208
crisina	1.52	1.39	1.12	0.421	0.328	0.116
galangina	1.32	1.22	1.37	0.279	0.199	0.315
chalcona	1.37	1.40	1.59	0.314	0.340	0.464
Trolox [®]	1.24	1.23	1.31	0.217	0.204	0.270

DR= (Ln a/b)/60				CONTROL - MUESTRA		
Réplica #	1	2	3	CONTROL		
control	0.0061	0.0061	0.0043	-	-	-
EEP Puebla	0.0033	0.0035	0.0070	0.452	0.432	-0.1456
EEP Guanaj	0.0078	0.0060	0.0065	-0.278	0.020	-0.0694
pinocemb	0.0066	0.0052	0.0035	-0.078	0.153	0.4299
crisina	0.0070	0.0055	0.0019	-0.150	0.101	0.6834
galangina	0.0046	0.0033	0.0052	0.239	0.456	0.1380
chalcona	0.0052	0.0057	0.0077	0.144	0.070	-0.2710
Trolox®	0.0036	0.0034	0.0045	0.409	0.442	0.2614

Control: agua desionizada

	%AA	DE
EEP Puebla	44.2	1.44
EEP Guanajuato	0	0
pinocembrina	3.7	1.3
crisina	0	0
galangina	27.8	1.5
chalcona	10.7	5.2
Trolox®	33.5	2.3

%AA= porcentaje de actividad antioxidante,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I. (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂ induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica*, 62:388–396.

Amoros, M., Simões, C.M.O., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes Simplex virus Type1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55:1732–1740.

Andriambelason, E., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R. (1999). Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 33:248–254.

Ahn, M.R., Kunimasa, K., Ohta, T. (2007). Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters*, 252:235–243.

Araujo, C.J., da Silva, V.C, Dall'Oglio, E.L., Teixeira de Sousa Jr, P. (2013). Flavonoids from *Combretum lanceolatum* Pohl. *Biochemical Systematics and Ecology*, 49:37–38.

Ávila, H.P., Smânia-Ede, F.A., Monache, F.D., Smânia-Júnior, A. (2008). Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 16:9790–9794.

Bankova, V.S., Popov, S.S., Marekov, N.L. (1983). A study on flavonoids of propolis. *Journal of Natural Products*, 46:471–474.

Bankova, V., Popov, S., Bocari, G., Haxhialushi, E. (1994). Phenolics in Albanian poplar buds and their relationship to propolis. *Fitoterapia*, 65:326–330.

Bankova, V., Christov, R., Delgado-Tejera, A. (1998). Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry*, 49:1411–1415.

Bankova, V.S., De Castro, S.L., Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apodologie*, 31:3–15.

Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A.G., Kadota, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72:239–246.

Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands

propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80:67–73.

Batirov, E.K., Kiyamitdinova, F., Malikov, V.M. (1986). Flavonoids of the epigeal part of *Glycyrrhiza glabra*. *Chemistry of Natural Compounds*, 22:107–108.

Bernard, F.X., Sable, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J.F., Crouzet, J. (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:992–998.

Bertelli, D., Pappotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, G.L., Plessi, M. (2012). ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extract. *Phytochemical Analysis*, 23:260–266.

Bernatova, I., Pechanova, O., Babal, P., Kysela, S., Stvrtina, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology*, 282:942–948.

Bogdanov, S. (2012). Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, *Bee Product Science*, Enero:1–35.

Boisard, S., Le Ray, A., Gatto, J., Aumond, M.C., Blanchard, P., Derbre, S., Flurin, C., Richomme, P. (2014). Chemical Composition, Antioxidant and Anti-AGEs Activities of a French Poplar Type Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:1344–1351.

Bonheví, J.S., Coll, F.V., Jordà, R.E. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71:529–532.

Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O., Savoia, D. (2000). *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31:174–177.

Boyanova, L., Derejian, S., Koumanova, R., (2003). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth *in vitro* by Bulgarian propolis: Preliminary report. *Journal of Medical Microbiology*, 52:417–419.

Burda, S., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:2774–2779.

Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4):347–363.

Burke, B., Nair, M. (1986). Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from the fruits of Jamaican Piper species. *Phytochemistry*, 25:1427–1430.

Buss, A.S. y Butler, M.S. (2010) *Natural Product Chemistry for drug discovery*, RSC Biomolecular Sciences, Royal Society of Chemistry.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen-toxicity, *Annual Review of Biochemistry*, 58:79–110.

Castaldo, S. y Caspasso F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 Suppl. 1:S1–S6.

Castillo-García, E. y Martínez-Solís, I. (2007) *Manual de Fitoterapia*, editorial Elsevier Doyma, Barcelona, España.

Chang, J., Young, B., Ho-Jae, L., Hwan, S. (2003). Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *Han'guk Sikp'um Yongyang Kwahak Hoechi*, 32:501–505.

Chen, C.P., Lin, C.C., Namba, T. (1989). Screening of Taiwanese crude drugs for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 27:285–295.

Cheng, Z., Moore, J., Yu, L. (2006). High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:7429–7436.

Chia-Nana, C., Chia-Lib, W., Jen-Kuna, L. (2004). Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome C release in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 67:53–66.

Ching, A.Y., Wah, T.S., Sukari, M.A., Lian, G.E., Rahmani, M., Khalid, K. (2007). Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L). *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 11:154-159.

Christov, R., Bankova, V., Hegazi, A., Abd-El-Hady, F., Popov, S. (1998). Chemical composition of Egyptian propolis, *Zeitschrift für Naturforschung*, 53:197–200.

Christov, R., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Delgado-Tejera, A. (1999). Antibacterial furofuran lignans from Canary Island propolis. *Fitoterapia*, 70:89–92.

Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Bertrand, M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural Product Research*, 20:531–536.

Cirasino, L., Pisati, A., Fasani, F. (1987). Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, 16:110–111.

Crane, E. (1997) *The past and present importance of bee products to man in Bee products - Properties, Applications and Apitherapy*, A. Mizrahi and Y. Lensky Editors, Plenum Press, New York, USA.

Crane, E. (1999) *History of other products from bees. The World history of beekeeping and honey hunting*, Gerald Duckworth y Co.

Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B.A., Ramírez-Apan, T., Cárdenas, J. (2002). Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis, Biological Activity of Nemorosone, *Zeitschrift für Naturforschung*, 57:372–378.

Cushnie, T.P. y Lamb, A.J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38:99–107.

Daleprane, J.B. y Abdalla, D.S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2013:1–8.

Diebolt, M., Bucher, B., Andriantsitohaina, R. (2001). Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 38:159–165.

Drogovoz, S.M., Tikhonov, A.I., Slyshkov, V.V., Salnikova, S.I. (1994). Examining the hepatoprotective properties of pediatric propolis dosage form in animals of various age groups. *Experimental and Clinical Pharmacology*, 57:39–42.

Duarte, J., Pérez-Vizcaíno, F., Utrilla, P., Jiménez, J., Tamargo, J., Zarzuelo, A. (1993). Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology: The Vascular System*, 24:857–862.

Duarte, J., Jiménez, R., Villar, I.C., Pérez-Vizcaíno, F., Jiménez, J., Tamargo, J. (2001). Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta Medica*, 67:567–569.

Duarte, S., Koo, H., Bowen, W.H., Hayacibara, M. F., Cury, J. A., Ikegaki, M., Rosalen, P.L. (2003). Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. *Biological y Pharmaceutical Bulletin*, 26:527–531.

English, S., Greenaway, W., Whatley, F.R. (1991). Analysis of phenolics of *Populus trichocarpa* bud exudates by GC-MS. *Phytochemistry*, 30:531–533.

Falçao, S.I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L.M., Barros, C., Domingues, M.R.M., Cardoso, S.M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396:887–897.

Falçao, S.I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M.R.M., Freire, C., Cardoso, S.M., Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS

Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*, 24(4):309–318.

Falçao, S.I., Tomas, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*, 49:805–812.

Farooqui, T., Farooqui, A.A. (2010). Molecular mechanisms underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Current Nutrition y Food Science*, 6:186–199.

Farooqui, T., Farooqui, A.A. (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in Bioscience*, E4:779–793.

Fearnley, J. (2001) *Bee propolis: natural healing from the hive*, Souvenir Press, London.

Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B., 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*, 56:243–253.

Feng, P., Sun, M., Zhang, L. (2013). Extraction technics of five flavonoids in ginkgo leaves. *Yingyong Huagong*, 42:1089–1091.

Ferrer-Viant, D., Jorge-Fonseca, C., Cutiño-Clavel, I., García-Rodríguez, R. E., Arce-Gómez, L. (1999). Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal, *MEDISAN*, Instituto Superior de Ciencias Médicas, 3:5–11.

Fitzgerald, J.R., Timothy J.F., Cox, D. (2006). The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature Reviews on Microbiology*, 4:445–457.

Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L., Coffey, R.G. (1993). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American Journal of Physiology*, 265:774–778.

Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A.M., Cunha, A., Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Reserch Teching y Educational Topics in Applied Microbiology and Biotechnology*, 1:481–493.

Gasic, U., Keckes, S., Dabic, D., Trifkovic, J., Milojkovic-Opsenica, D., Natic, M., Tesic, Z. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food chemistry*, 145:599–607.

García-Viguera, C., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. (1993). Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Zeitschrift für Naturforschung*, 48:731–735.

Ghisalberti, E.L. (1979). Propolis: a review, *Bee World*, 60:59–84.

Grange, J.M., Davey, R.W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83:159–160.

Grecianu, A., Enciu, V. (1976). Activity *in vitro* of propolis against bacterial strains of animal origin. *Medicima Veterinara*, 90–92.

Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T., Whatley, F.R. (1990). Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 46:111–121.

Guzmán-Avenidaño, A.J. y Barrera-Adame D.A. (2011). Estudio fitoquímico de hojas y flores de *Smalanthus pyramidalis* (Triana) H. Rob. (arboloco) y su uso en la recuperación de los humedales de Bogotá. *Colombia Forestal* 14 (1):41–50.

Habsah, M., Abas, F., Permana, D., Lajis, N.H., Ali, A.M., Sukari, M.S., Taufiq Y.Y., Kikuzaki, H., Nakatani, N. (2004). DPPH Free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak (Zingiberaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:811–815.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Journal of Biochemistry*, 219:1–14.

Hamada, S. y Slade H. (1980). Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44:331–384.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48:125–129.

Hatana, A., Nonaka, T., Yoshino, M., Ahn, M., Tazawa, S., Araki, Y., Kumazawa, S. (2012). Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. *Food Science and Technology Research*, 18:577–584.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572–584.

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. (2012) *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2ª edición, Churchill Livingstone, Elsevier.

Hernández, I. M., Fernandez, M. C., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli A. L., Rastrelli, L. (2005). Polyphenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 68:931–934.

Hernández, J., Goycoolea, F., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Moreno, L., Velasquez, E., Astiazaran, H., Lugo, E., Velasquez, C. (2007). Sonoran propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, 73:1469–1474.

Herrera, M. D., Zarzuelo, A., Jimenez, J., Marhuenda, E., Duarte, J. (1996). Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. *General Pharmacology*, 27:273–277.

Hicks, J.J., Torres, R.Y., Sierra, V.M. (2006). Estrés oxidante, Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 4:223–226.

Higashi, K.O. y De Castro, S.L. (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 46:55–58.

Huang, W., Davidge, S.T. Wu, J. (2013). Bioactive Natural Constituents from Food Sources-Potential Use in Hypertension Prevention and Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:615–630.

Ibarra, M., Perez-Vizcaino, F., Cogolludo, A., Duarte, J., Zaragoza-Arnaez, F., Lopez-Lopez J.G., Tamargo, J. (2002). Cardiovascular effects of isohamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rata atria. *Planta Medica*, 68:307–310.

Iglesias-Neira, J. (2009) *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*, Tesis Doctorado, Universidad Santiago de Compostela, España.

Iijima, K., Yoshizumi, M., Hashimoto, M., Kim, S., Eto, M., Ako J., Liang, Y.Q., Sudoh, N., Hosoda, K., Nakahara, K., Toba, K., Ouchi, Y. (2000). Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*, 101:805–811.

Instituto Argentino de Normalización, Esquema 1 De Norma IRAM-INTA 15935-1, Productos del Noroeste Argentino: Propóleos, 2004.

Katerere, D.R., Gray, A.I., Kennedy, A.R., Nash, R.J., Waigh, R.D. (2004). Cyclobutanes from *Combretum albopunctatum*. *Phytochemistry*, 65:433–438.

Keshavarz, M., Mostafaie, M.A., Mansouri, K., Shakiba, Y., Motlagh, H.R.M. (2009). Inhibition of corneal neovascularization with propolis extract. *Archives of Medical Research*, 40:59–61.

Kimoto, T., Arai, S., Kohguchi, M. (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention*, 22:506–515.

- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K. (2002). Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1302.
- Kolenbrander, P.E., Palmer R.J., Periasamy, S., Jakubovics, N.S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7):471–480.
- Kondo, K., Hirano, R., Matsumoto, A., Igarashi, O., Itakura, H. (1996). Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet*, 348:1514–1518.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepelnjak, S., Knežević, S. (2007). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 54:65–72.
- Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsz, G., Czuba, Z. (1993). Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-Forschung Drug Resolution*, 43:607–609.
- Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W. Historical aspects of propolis research in modern times, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2013:1–11.
- Kumazawa, S., Hayashi, K., Kajiya, K., Ishii, T., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2002). Studies of the Constituents of Uruguayan Propolis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:4777–4782.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84:329–339.
- Lagouri, V., Prasianaki, D., Krysta, F. (2014). Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts. *International Journal of Food Properties*, 17(3):511–522.
- Langenheim, J.H. (2003) *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, Ethnobotany*, Timber Press, Cambridge, U.K.
- Lahouel, M., Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M. (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4:712–720.
- Landmesser, U. y Harrison, D.G. (2001). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coronary Artery Disease*, 12:455–461.
- Lee, H., Lee, H., Lee, E., Ko, S., Bae, H., Kim, C., Ahn, K., Lu, J, Kim, S. (2010). Mitochondria-cytochrome C-caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis. *Cancer Letters*, 270:342–353.

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H., Kadota, S. (2010). Study on the constituents of Mexical propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal Natural Products*, 73:623–627.

Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M.P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N.S., Wunderlin, D.A., Feresin, G.E. (2009). Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:2691–2698.

Lima-Hernández, L. B. (2002) *Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos*, Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, La Habana, Cuba.

Lin, S.C., Lin, Y., Chan, C., Chung, C.Y., Hsu, S. (1997). The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *American Journal of Chinese Medicine*, 25:325–332.

Lin, C., Senthil-Kumar, K.J., Tseng, Y., Wang, Z., Pan, M., Xiao, J., Chien, S., Wang, S. (2009). Anti-inflammatory Activity of Flavokawain B from *Alpinia pricei* Hayata. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:6060–6065.

Liu, X.L., Xu, Y.J., Go, M.L. (2008). Functionalized chalcones with basic functionalities have antibacterial activity against drug sensitive *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43:1681–1687.

Loesche, W.J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50:353–380.

López, J., San Román, J.A., Revilla, S., Vilacosta, I., Luaces, M., Sarriac, C., Gómez, I., Fernández-Avilés, F. (2005). Perfil clínico, ecocardiográfico y pronóstico de las endocarditis izquierdas por *Streptococcus viridans*. *Revista Especialidades en Cardiología*, 58:153–158.

López-Ramírez, A. (2004). Propóleo: composición y beneficios, *Imagen Veterinaria*, 4:41–44.

Lotfy, M. (2006). Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7:22–31.

Lu, H.T., Zou, Y.L., Deng, R., Shan, H. (2014). Extraction, Purification and Antiradical Activities of Alpinetin and Cardamomin from *Alpinia katsumadai* Hayata. *Asian Journal of Chemistry*, 25:9503–9507.

Luo, Z., Dong, J., Zhao, L., Zhang, H. (2013). Analysis of polyphenolics in propolis from Henan province. *Shipin Kexue* (Beijing, China), 34:139–143.

Marcucci, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26:83–99.

Marghitas, L., Laslo, L., Dezmirean, D., Moise, A., Maghear, O. (2007) *Total phenolics and antioxidant activity of Romanian propolis*, International Conference Agricultural and Food Sciences, Progresses and Technologies, Sibiu.

Markham, K.R., Mitchel, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J.A., Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42:205–211.

Melliou, E. y Chinou, I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis, *Planta Medica*, 70:515–519.

Metzner, J., Schneidewind, E.M., Friedrich, E. (1977). Effects of propolis and pinocembrin on yeasts. *Pharmazie*, 32:730.

Mirzoeva, O.K. y Calder, P.C. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55:441–449.

Molan, P. (2001). Why honey is effective as a medicine. Part 2. The scientific explanation of its effects. *Bee World*, 82:22–40.

Moon, B., Lee, Y., Ahn, J., Lim, Y. (2005). Spectral Assignments and Reference Data, Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR data of some flavonol derivatives. *Magnetic Resonance Chemistry*, 43:858–860.

Morello, S., Velleco V., Alfieri, A., Mzscolo, N., Cicala, C. (2006). Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, 18:825–830.

Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26:2231–2234.

Ministerio de Agricultura de Brasil - APACAME (1999) Reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos, Brasil, *Revista Mensagem Doce*, 52:1–2.

Na, Z., Feng, Y., Xu, Y. (2012). Chemical constituents from aerial parts of *Eupatorium odoratum*. *Zhongcaoyao*, 43:1896–1900.

Nagy, M., Suchy, V., Uhrín, D., Ubik, K., Budesinsky, M., Grancai, D. (1987). Constituents of propolis of Czechoslovak origin IV. *Chemical Papers*, 42:691–696.

Nagy, M., Suchy, V., Uhrin, D., Ubik, K., Budesinsky, M., Grancai, D. (1988). Constituents of propolis of Czechoslovak origin V, *Chemical Papers*, 42:691–696.

Nagy, M., Suchy, V., Uhrin, D., Ubik, K., Grancai, D. (1989). Components of propolis of Czechoslovak origin VII. *Cesko-Slovenska Farmacie*, 38:171–172.

Nielsen, S.F., Boesen, T., Larsen, M., Schonning, K., Kromann, H. (2004). Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 12:3047–3054.

Oliveri, R. (2005). Disfunción endotelial en la insuficiencia cardíaca, ¿víctima o victimario? *Revista Argentina de Cardiología*, 73:53–63.

Organización Mundial de la Salud. *Prevención de las enfermedades cardiovasculares*. Guía de bolsillo para la estimación y el manejo del riesgo cardiovascular. Ginebra, 2007.

Organización Mundial de la Salud (2010) *Situación Reglamentaria de los medicamentos*. Una reseña mundial, MS/TRM/98.1.

Orsatti, C.L. y Sforcin, J.M. (2012). Propolis immunomodulatory activity on TLR-2 and TLR-4 expression by chronically stressed mice. *Natural Product Research*, 26:446–453.

Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., Shimizu, M.T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44:375–378.

Palma-Cárdenas, A. y Sánchez-Aguilera, F. (2007) *Técnicas de ayuda odontológica y estomatológica*, Editorial Paraninfo.

Pan, W., Liu, K., Guan, Y., Tan, G.T., Nguyen, V., Nguyen, M., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H. S., Zhang, H. (2014). Bioactive compounds of *Vitex leptobotrys*, *Journal of Natural products*, 77(3):663–667.

Pappotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., Plessi, M. (2012). Chemical and Functional Characterization of Italian Propolis Obtained by Different Harvesting Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:2852–2862.

Park, Y.K., Koo, M.H., Abreu, J.A.S., Ikegaki, M., Cury, J.A., Rosalen, P.L. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Currents in Microbiology*, 36:24–28.

Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L. (2002). Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:2502–2506.

Patra, J. y Chua, B.H. (2011). Artificial neural network-based drug design for *Diabetes mellitus* using flavonoids. *Journal of Computational Chemistry*, 32:555–567.

Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D., Benvenuti, S. (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55:934–948.

Piccinelli, A.L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R.P., Rastrelli, L. (2013). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:5080–5088.

Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306:530–536.

Popova, M.P., Bankova, V.S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G.L., Sabatini, A.G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38:306–311.

Porro, J. (2002) *Cardiovascular disease and endothelium*, Breakthroughs in Bioscience: A series of articles for general audiences, Federation of American Societies for Experimental Biology.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4290–4302.

Procházková, D., Bousková, I., Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82:513–523.

Qian, W. L., Khan, Z., Fearnley, J. (2008). Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:78–83.

Reller, L. B. y Weinstein, M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical and Infectology Disease*, 49:1749–1755.

Renaud, S. y De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339:1523–1526.

Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23:127–149.

Ríos de Molina, M. C. (2003) El estrés oxidativo y el destino celular, *Revista Química Viva*, 2:17–28.

Ritz, H.L. (1967). Microbial population shifts in developing human plaque. *Archives of Oral Biology*, 12:1561–1568.

Rivero-Cruz, J.F., Zhu, M., Kinghorn, A.D., Wu, C.D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters*, 1:151–154.

Roginsky, V. y Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2):235–254.

SAGARPA (2010). Situación actual y perspectiva de la apicultura en México, *Claridades Agropecuarias*, 199:33–39.

Salatino, A., Weinstein-Teixeira, E., Negri, G., Message, D. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, 2:33–38.

Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Products Reports*, 28:925–936.

Salomão, K., Pereira, P.R., Campos, L.C., Borba C.M., Cabello, P.H., Marcucci, M.C., De Castro S.L. (2008). Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 5:317–324.

Serkedjieva, J., Manolova, N., Bankova, V. (1992). Antiinfluenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products*, 55:294–297.

Shah, N.A., Khan, M.R., Ahmad, B., Noureen, F., Rashid, U., Khan, R.A. (2013). Investigation on flavonoid composition and anti free radical potential of *Sida cordata*. *Complementary and Alternative Medicine*, 13:276.

Shaheen, S.A., Abu-Zarga, M., Nazer, I., Darwish, R., Hala I.A. (2011). Chemical constituents of Jordanian propolis. *Natural Product Research, Formerly Natural Product Letters*, 25:1312–1318.

Shen, Y., Croft, K.D., Hodgson, J.M., Kyle, R., Lee, I.E., Wang, Y., Stocker, R., Ward, N. (2012). Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. *Biochemical Pharmacology*, 84:1036–1044.

Shi, H., Yang, H., Zhang, X., Yu, L. (2012). Identification and Quantification of Phytochemical Composition and Anti-inflammatory and Radical Scavenging Properties of Methanolic Extracts of Chinese Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:12403–12410.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152–178.

Sobocanec, S., Balog, T., Saric, A., Macak-Safranko, Z., Stroser, M., Zarkovic, K., Zarkovic, N., Stojkovic, R., Ivankovic, S., Marotti, T. (2011). Antitumor effect of Croatian propolis as a consequence of diverse sex-related dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) protein expression. *Phytomedicine*, 18:852–858.

Sri-Nurestri, A.M., Chung, W.P., Halijah, I., Norhanom, A.W., Kae-Shin S. (2011). *Molecules*, 16, 583-589

Stangaciu S. (1998). Cuidados para la producción y extracción de propóleos, *Espacio Apícola*, 33:24–29.

Starzyk, J., Scheller, S., Szaflarski, J., Moskwa, M., Stojko, A. (1977). Biological properties and clinical application of propolis II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittelforschung*, 27:1198–1199.

Summya, R., Nemat, A., Sana, N., Shiek Tanveer, A., Kazim, S., Sarwat, S. (2013). Abrogation of 5-fluorouracil induced renal toxicity by bee propolis via targeting oxidative stress and inflammation in Wistar rats. *Journal of Pharmacy Research*, 7:189–194.

Takaisi-Kikuni, N.B. y Schilcher, H. (1994). Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, 60:222–227.

Tilley, D.O., Smolenski, A., Cox, D., O'Donnell, J.S., Douglas, C.W., Watson, S.P., Kerrigan, S.W. (2013). Glycoprotein Ib α and Fc γ R11a play key roles in platelet activation by the colonizing bacterium, *Streptococcus oralis*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11:941–950.

Toreti, V., Sato, H., Pastore, G., Park, Y. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case C.L. (2007) *Introducción a la microbiología*, Editorial Médica Panamericana.

Touyz, R.M. y Schiffrin, E.L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*, 122:339–352.

Tsuchiya, H., Iinuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7:161–165.

Valcic, S., Montenegro, G., Timmermann, B.N. (1998). Lignans from Chilean propolis. *Journal of Natural Products*, 61:771–775.

Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J.C., Salas-Reyes, M., Jimenez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E., Henandez, J., Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131:645–651.

Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.S.E.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A.A.L.T. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology y Medicine*, 20:331–342.

Vecchi, E., Drago, L. (2007). Propolis' antimicrobial activity: what's new? *Le Infezioni in Medicina*, 15:7–15.

Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131:645–651.

Velázquez-Paniagua, M., Prieto-Gómez, B., Contreras-Pérez, R. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *Revista de Ciencias*, 75:36–43.

Venéreo-Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*, 31:126–133.

Vokhonina, T.V., Breeva, L.G., Bodrova, R.N., Dushkova, E.S. *Some physical and chemical antimicrobial characteristics of propolis and extracts*, 22nd International Beekeeping, Congress Summer, 1969.

Volpi, N., Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42:354–361.

Wagh, V.D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials, *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013.

Wang, X., Wang, H., Wang, Q. (2000). Chemical constituents of male inflorescence of *Populus canadensis* Moench. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 31:171–173.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108:1019–1022.

Widlansky, M.E., Gokce, N., Keaney, J.F., Vita, J.A. (2003). The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 42:1149–1160.

Wollenweber, E. y Doerr, M. (2008). Flavonoid aglycones from the lipophilic exudates of some species of Rosaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36:481–483.

Wu-Yuan, C.D., Chen, C.Y., Wu, R.T. (1988). Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. *Journal of Dental Research*, 67:51–55.

Xuan, T.D., Fukuta, M., Wei, A.C., Elzaawely, A.A., Khanh, T.D., Tawata, S. (2008). Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. *Journal of Natural Medicines*, 62(2):188–194.

Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, 16: 3444–3455.

Yoon, H., Eom, S., Hyun, J., Jo, G., Hwang, D., Lee, S., Yong, Y., Park, J.C., Lee, Y.H., Lim, Y. (2011). ¹H and ¹³C NMR Data on Hydroxy/methoxy Flavonoids and the Effects of Substituents on Chemical Shifts. *Bulletin of Korean Chemistry Society*, 32:1–6.

Zalba, G., San-Jose, G., Moreno, M.U., Fortuno, M.A., Fortuno, A., Diez J. (2001). Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*, 38:1395–1399.

Zarco-Espinosa, G.L. (2012) *Estudio químico y biológico de propóleos recolectados en la zona melífera del altiplano*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.

Zaghloul, A., Mourad, K., El-Ansary, O., Kassem, F.A. (2011). Analysis of the Egyptian propolis collected by different strain hybrids of honey bee (*Apis mellifera* L.:Hymenoptera:Apidae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 76:247–259.

Zhang, T., Ruwida, O., Weam, S., Sultan, A., Clements, C., Fearnley, J., Edrada-Ebel, R., Watson, D. (2014). Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta*, 120:181–190.

Zhao, L., Wang, G., Chen, P., Dong, J., Zhang, H. (2012). Composition analysis in ethanol extracts of propolis samples from Northern China. *Shipin Kexue* (Beijing, China), 33:143–148.

Zhou, S., Lin, M., Wang, Y., Liu, X., Yu-Kaifa, Y. (2002). Study on the chemical constituents of *Populus davidiana* Dode. *Zhongcaoyao*, 14:43–45.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

[<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>] Consultada el día 03 de diciembre.

[<http://mexico.pueblosamerica.com/i/el-oasis-valsequillo/>] Consultada el día 28 enero 2014.

[<http://www.puebla.gob.mx/index.php/acerca-de-puebla/datos-geograficos/item/38-clima>] Consultada el día 28 enero 2014.

[<http://189.254.227.35/index.php/ven-y-siente-silao/turismo>] Consultada el día 29 enero 2014.

INEGI, Anuario Estadístico de Guanajuato, 2011 a través de [http://www.ciberhabitat.gob.mx/monografias/informacion/gto/territorio/recursos_naturales.aspx?tema=me&e=11] Consultada el día 19 marzo, 2014.

Instituto de Ecología de Guanajuato a través de [<http://ecologia.guanajuato.gob.mx/sitio/areas-naturales-protegidas/44/Cerro-de-Arandas>] Consultada el día 19 marzo, 2014.

OMS a través de [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>] Consultada el día 30 enero, 2014. Salud Bucodental. Nota informativa N°318. Febrero de 2007

OMS a través de [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>] Consultada el día 30 enero, 2014. Enfermedades cardiovasculares. Nota descriptiva. Marzo de 2013

Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013. DOI: 10.1007/SpringerReference_350973 2012-12-04 09:34:00 UTC] a través de [www.springerreference.com]