



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS QUÍMICO DE UNA MUESTRA DE PROPÓLEO
RECOLECTADA EN CHIHUAHUA, MÉXICO”**

T E S I S

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

PRESENTAN

Nancy Palacios Cruz

Adriana Guadalupe Pérez Ramírez



México D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

Vocal: Dr. José Fausto Rivero Cruz

Secretario: Dra. Gloria Díaz Ruíz

1er. suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2do. suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química, UNAM

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Asesor del tema

SUSTENTANTES

Palacios Cruz Nancy

Pérez Ramírez Adriana Guadalupe

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios de México y la mejor Universidad de Latinoamérica, por enseñarnos y habernos formado no sólo en un aula de estudios o en un laboratorio, sino en la vida cotidiana. Ahí nos formamos como mejores personas en todos los sentidos, educación, cultura, y actividades recreativas, por sus instalaciones: bibliotecas, espacios escultóricos y museos.

A la Facultad de Química por habernos formado como profesionales y a los profesores de la carrera que nos dieron la oportunidad de enriquecer conocimientos y principios imperecederos de calidad educativa.

Al Dr. Fausto por la orientación y ayuda que nos brindó para la realización de la tesis, su apoyo moral y su gran amistad, gracias por siempre motivarnos a seguir adelante.

A los miembros del jurado por su tiempo en haber revisado el presente trabajo, las correcciones efectuadas y los comentarios hacia la tesis.

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

A Ángel López Ramírez por habernos proporcionados las fotografías que ilustran la tesis.

INDICE

I. Lista de Figuras	I
II. Lista de Cuadros	I
III. Lista de Abreviaturas	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 EL PROPÓLEO	2
2.1.1 Definición y generalidades	2
2.2.2 Aspectos históricos	4
2.3 RECOLECCIÓN DE PROPÓLEO	5
2.3.1 Raspado	6
2.3.3. Rejillas	8
2.4 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL PROPÓLEO	9
2.5 TIPOS DE PROPÓLEOS	10
2.5 Composición química	15
2.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA	26
2.6.1 Actividad anticancerígena	26
2.6.2 Actividad antitumoral	27
2.6.3 Actividad Inmunológica	27
2.6.4 Actividad antifúngica	28
2.6.5 Actividad antiparasitaria	28
2.6.6 Actividad antimicrobiana	28
2.6.7 Actividad antiviral	29
2.6.8 Actividad antiinflamatoria y cicatrizante	29
2.6.9 Actividad antioxidante	29
3. JUSTIFICACIÓN	31
4.2 Objetivos particulares	33
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
5.1 Recolección del propóleo	33
5.2 Procedimientos generales de análisis	34
5.2.1 Análisis cromatográficos	34
5.2.2 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas	34
5.3. ESTUDIO QUÍMICO	35
5.3.1 Preparación de los extractos etanólicos	35
5.3.2 Fraccionamiento primario del EEP de Chihuahua	35
5.3.3 Fraccionamiento secundario del EEP de Chihuahua y purificación de compuestos	36
6. RESULTADOS Y DISCUSION	38
6.1 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS	41
6.1.1 Pinocembrina	41
6.1.2 Crisina	42
6.1.3 Alpinetina	42

8. CONCLUSIONES	43
9. PERSPECTIVAS	44
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
11. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	55

I. Lista de Figuras

Figura 1. *Apis mellifera* (Fundación UNAM)

Figura 2. Recolección de propóleo

Figura 3. Métodos de recolección de propóleos

Figura 4. Municipio de Parral, Chihuahua (INEGI)

Figura 5. Resumen del procedimiento experimental del análisis químico de EEP de Chihuahua

Figura 6. Patrón quimio-geográfico de los tipos de propóleos. Tomada de Salatino et al., 2011.

Figura 7. Compuestos aislados del EEP de Chihuahua

II. Lista de Cuadros

Cuadro 1. Tipo de propóleo de acuerdo a la región geográfica y a la fuente vegetal

Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo

Cuadro 3. Fraccionamiento primario del EEP de Chihuahua

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario del EEP de Chihuahua

III. Lista de Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenasa
CPA	Célula presentadora de antígeno
DMSO	Dimetilsulfóxido
EV	Electrón-voltios
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
EET	Extracto Etanólico de Propóleo
CAPE	Feniletíl éster del ácido caféico
G	Gramos
IE	Impacto electrónico
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
L	Litros
λ	Longitud de onda
Nm	Nanómetro
Mm	Milímetros
mL	Mililitros
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
Ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TLR	Toll-like receptor (Receptor tipo Toll)
TOF	Tiempo de vuelo (time of flight)
UV	Ultravioleta
URSS	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VHS	Virus de Herpes Simplex
VLC	Cromatografía líquida al vacío



1. INTRODUCCIÓN

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

Es importante mencionar que México posee una gran riqueza de flora y fauna, por lo que no es de sorprender que las plantas medicinales y otros productos de origen natural formen parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Esto no nada más se da en el medio indígena y rural, sino también entre poblaciones mestizas, en zonas urbanas y suburbanas, como resultado de la diversidad biológica del país y de la necesidad de recursos accesibles frente a los diversos padecimientos (Martínez et al., 2010 (a)).

Las propiedades terapéuticas del propóleo han sido reconocidas por el hombre desde épocas antiguas. De esta forma, el propóleo es uno de los pocos remedios naturales que ha mantenido su popularidad durante un largo periodo de tiempo, muy asombrados hubiesen quedado nuestros apicultores, si hace sólo unos años les hubiésemos explicado que aquella resina oscura y pegajosa que les dificultaba el raspado de las colmenas, era precisamente uno de los productos apícolas más valiosos, solamente superado en cotización internacional por el veneno de abejas y la jalea real. Su valor es actualmente casi 40 veces superior al de la cera y casi 30 veces superior al de la miel, por lo que comprendemos que hemos desechado una verdadera fortuna durante siglos (Martínez et al., 2010 (b)).

Actualmente, el estilo de vida ha ocasionado interés por parte de los consumidores, industriales e investigadores sobre lo que podría denominarse como el retorno a lo natural, buscando la forma de ayudar a mantener la salud humana.



En las últimas décadas han sido publicados varios estudios relacionados con la composición de productos apícolas (miel, polen, jalea real y propóleos) y sus propiedades biológicas, lo cual genera la atención de investigadores.

El propóleo es un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de ciertas plantas, en particular de flores y brotes de hojas, las cuales mezclan con la saliva, enzimas y otras secreciones propias de las abejas (Farré et al., 2004). Es usado como un protector natural contra microorganismos patógenos y hongos; protege contra el frío durante el invierno y actúa como material de sellado en las paredes externas e internas de la colmena para reducir la entrada de insectos (Marcucci et al., 2001; Papotti et al., 2012). Este producto es muy apreciado por sus diversas actividades biológicas (Salatino et al., 2011).

Estas características están relacionadas con su composición química, origen botánico, época de recolección y la especie de abeja recolectora (Manrique y Santana, 2008; Gregoris et al., 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 EL PROPÓLEO

2.1.1 Definición y generalidades

La palabra propóleos 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” (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).



El propóleo es un producto multifuncional que producen las abejas *Apis mellifera* (**Figura 1**) y se utiliza en la construcción, el mantenimiento y la protección de la salud de sus colmenas. La abeja forma parte de la familia *Apidae* y es común en América del Norte con especial prevalencia en algunas partes desérticas tales como matorrales y desiertos de Sonora, Coahuila, Durango y Zacatecas. (Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, UNAM).



Figura 1. *Apis mellifera* (Fundación UNAM)

El propóleo no es solamente un material de construcción, sino también la más importante arma química de las abejas en contra de agentes patógenos (Bankova, 2005). Es también usado para embalsamar pequeños animales muertos evitando su putrefacción cuando no pueden ser retirados de la colmena (Niraldo, 2005).

El uso humano de propóleos tiene una larga historia y es ampliamente utilizado en los productos destinados a aplicaciones tópicas. Hay una base de datos de fondo sobre la actividad biológica y la toxicidad de propóleo que indica que es antibacteriano, antifúngico, antiviral, citotóxico, astringente, colérico, espasmolítico, antiinflamatorio, anestésico, antioxidante y otras propiedades (Burdock, 1998).



2.2.2 Aspectos históricos

El propóleo es tan antiguo como la miel, y ha sido utilizado por el hombre desde hace siglos. Existen registros que indican el uso del mismo por los antiguos egipcios, persas y romanos. Donde era conocido por los sacerdotes, quienes tenían en sus manos la medicina, la química y el arte de embalsamar, utilizando el propóleo como uno de los ingredientes para la conservación de vísceras de los faraones (Kuropatnicki et al., 2013).

Pensadores como Aristóteles, Galeno y Dioscórides, así como médicos de culturas griegas y romanas observaron que poseía propiedades antiinflamatorias, por lo cual fue utilizado para el tratamiento de heridas, úlceras y abscesos (Castaldo et al., 2002; Kuropatnicki et al., 2013).

En la Edad Media el propóleo no era un tema muy popular y su uso en la medicina convencional desapareció. Sin embargo, el conocimiento de las propiedades medicinales de propóleo sobrevivió en la medicina popular tradicional. El interés en el propóleo regresó de Europa, junto con la teoría del renacimiento. En el siglo pasado los científicos fueron capaces de demostrar que el propóleo posee importantes actividades biológicas. La investigación sobre la composición química del propóleo se inició a principios del siglo XX y se continuó después de la Segunda Guerra Mundial. Los avances en los métodos analíticos cromatográficos permitieron la separación y la extracción de varios componentes de propóleos. Al menos 300 compuestos diferentes se han identificado hasta el momento. Su capacidad antibacteriana, antiséptica, antiinflamatoria, antifúngica, anestésica, y propiedades curativas han sido confirmadas. El propóleo ha sido utilizado con eficacia en tratamientos dermatológicos, problemas ginecológicos, enfermedades neurodegenerativas, en la cicatrización de heridas y en el tratamiento de quemaduras y úlceras (Kuropatnicki et al., 2013).

Los Incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y en el continente Europeo fue utilizado por los franceses en los siglos XIV y XVIII para el



tratamiento de llagas. Su máximo empleo se dio durante la guerra de “Boers” (granjeros), en África del Sur, alrededor de 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante. El uso del propóleo se intensificó durante la Segunda Guerra Mundial por la ex-URSS para el tratamiento de heridas. Con el descubrimiento de la penicilina (1928) y el advenimiento de los modernos antibióticos se comenzó a dejarlo de lado, paradójicamente en la actualidad esa tendencia ha comenzado a revertirse (Adanero, 2000; Kuropatnicki et al., 2013).

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

Los usos de este producto natural se han mantenido durante siglos, hasta llegar a nuestros días, en que se están realizando investigaciones científicas sobre el propóleo en los campos de la biología, la medicina humana y la medicina veterinaria. Sin embargo, se requiere más investigación que conduzca a nuevos descubrimientos de su composición y posibles aplicaciones.

2.3 RECOLECCIÓN DE PROPÓLEO

Existen numerosos métodos de producción o recolección de los propóleos (**Figura 2 y 3**) pero los más utilizados son el raspado del material apícola y el empleo de mallas plásticas colocadas en la parte superior de la última alza (Sahinler, 2005).

Para una buena recolección depende fundamentalmente del comportamiento de las abejas en la colmena. Si se altera las condiciones dentro de ésta, se puede acelerar la producción y mejorar la calidad de los propóleos, utilizando diferentes dispositivos con estos fines (Giralt, 2001).



Figura 2. Recolección de propóleo.
Foto proporcionado por Angél López Ramírez.

2.3.1 Raspado

Tradicionalmente se ha venido utilizando el sistema de raspado de cabezales, cajones, etc. Este método es cada vez más desaconsejable, debido a que el propóleo contiene mayores impurezas y posibles contaminantes (resultados de algunos estudios realizados sobre calidad no recomiendan este método de extracción). Cuando se procede a recolectar propóleos por la técnica del raspado, es conveniente emplear elementos o espátulas de poco filo y de acero inoxidable; cuando se emplean elementos de hierro, este componente forma complejos con los principios activos del propóleo, disminuyendo su calidad (Papotti et al., 2012).

También es importante tener en cuenta la ubicación del mismo en la colmena: el propóleo de piquera, a pesar de su fácil obtención y acceso, es un propóleo que ha perdido gran parte de sus propiedades, ya que al estar expuesto al medio ambiente, la acción del aire y el sol produce oxidaciones que disminuyen su calidad. También el propóleo de techo suele estar acompañado de mucha cera, mientras el propóleo de piso, contiene demasiadas impurezas (Papotti et al., 2012).



Es conveniente tomar el propóleo depositado en las paredes internas de la colmena o de los laterales y cabezales de los cuadros, ya que poseen mayor concentración de resinas y se encuentra más protegido. Nunca raspar en las zonas donde haya pintura sobre la madera, ya que contaminaría el producto (Papotti et al., 2012).

2.3.2 Mallas

La recolección debe ser efectuada mediante el empleo de mallas que optimicen el proceso y garanticen la obtención de un producto exento de impurezas y contaminantes.

Podemos optar entonces por el uso de mallas matrizadas plásticas en espacios de 4,5 mm, fabricadas específicamente para el almacenamiento de propóleos; éstas se utilizan sobre los cabezales de los cuadros debajo de la entretapa de la colmena o bien la típica tela mosquitera plástica que tiene el mismo resultado.

Este último tipo de trampa es el más empleado, se ubica igualmente en la parte superior de la última alza, por debajo del techo. Como la abeja propolizará los espacios intermarcos, es bueno cortar la malla un poco más ancha de la superficie de la colmena de modo que cuando sellen los primeros espacios podamos correrla y así completar toda su superficie. Es ideal contar con dos mallas por colmena para así efectuar el intercambio cuando realizamos la recolección. Sobre todo si no volveremos al colmenar por unos días.

La producción con mallas tiene la ventaja de no producir ninguna modificación en el resto de las producciones de la colmena, invitando a la abeja a propolizar sin alterar el funcionamiento normal de la misma. Contamos con el propóleo suficiente para su protección y además un excedente para nuestra producción de mayor calidad (Asis, 1993). La utilización de mallas a su vez permite obtener un propóleo más granulado lo que facilita el proceso de extracción con solventes como el etanol.

2.3.3. Rejillas

Consiste en láminas de plástico con ranuras que las abejas rellenan con propóleo, lo que permitirá su fácil retirada y colección. Se colocan debajo de la tapa de la colmena y una vez cubierta de propóleo, estas rejillas deben ser congeladas para facilitar su extracción con una simple presión y desprender el propóleo de las ranuras (González y Bernal, 2002).



a)



b)



c)



d)

Figura 3. Métodos de recolección de propóleo: a) método de raspado b) método de rejillas c) método de mallas d) mallas matrizadas plásticas.

Proporcinado por Angél López Ramírez



2.4 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL PROPÓLEO

La calidad del propóleo está directamente relacionada con los métodos de recolección, almacenamiento y conservación (Farré et al., 2004). En este sentido la calidad del propóleo depende del tipo de flora y características ambientales de tal manera que es fundamental el trabajo del apicultor. Entonces la calidad del producto está directamente asociado con los siguientes factores:

- ✓ Almacenamiento y conservación
- ✓ Lugar de procedencia
- ✓ Flora predominante en la zona
- ✓ Región de la colmena desde donde se extrajo
- ✓ Método de recolección utilizado

La calidad de este producto natural va a estar estrechamente ligada por la cantidad de principios activos que pueden extraerse de ellos, si el propóleo se conserva por más de un año, su actividad biológica comienza a decrecer. Una forma sencilla de determinar la calidad de una muestra, consiste en oprimir una pequeña parte entre los dedos índice y pulgar, si la consistencia percibida es terrosa es de menor calidad por poseer abundantes partículas no orgánicas, si es demasiado maleable tendrá una cantidad excesiva de ceras por lo tanto su calidad será también inferior. Para que las propiedades del propóleo recogido no se pierdan o alteren, es recomendable almacenarlo en frascos de vidrio color ámbar, hasta su utilización. Se debe tener la precaución de no almacenar grandes volúmenes, para evitar que se compacte (Farré et al., 2004).

Existen variados y múltiples tipos de propóleos, sus propiedades dependen de sus componentes siendo este un argumento válido para justificar la necesidad de una correcta evaluación de la calidad, a través de muchos parámetros oficiales que han sido establecidos en distintos países para dicha evaluación, en este sentido son escasos los métodos reportados para medir su actividad biológica (Hernández,



2005). Para que la calidad de un propóleo se considere aceptable debe cumplir con los siguientes requisitos:

- ✓ Estar libre de contaminantes tóxicos
- ✓ Contener bajos porcentajes de cera, materia insoluble y cenizas
- ✓ Definir su procedencia botánica para determinar el tipo de compuestos activos
- ✓ Presentar una amplia variedad de principios activos

Resulta complicado establecer los lineamientos adecuados para determinar la calidad del propóleo, ya que exhibe una amplia variedad de colores, olores y una composición compleja. La mayoría de los propóleos frescos presentan olores resinosos. Para ser de apariencia aceptable y ser considerado de buena calidad el propóleo deberá tener el menor contenido de cera y estar libre del mayor contenido de impurezas y contaminantes (Bankova et al., 1995; Krol et al., 2013; Popova et al., 2012).

2.5 TIPOS DE PROPÓLEOS

El conocimiento de la actividad biológica de los propóleos es un estímulo para investigar la química de sus fuentes vegetales con mayor profundidad. Varias sustancias vegetales ganaron amplio interés solamente después de que se han evaluado la actividad de los constituyentes del propóleo. Actualmente es aceptado y químicamente demostrado que en las zonas templadas como Europa, Norte América y regiones no tropicales de Asia, la principal fuente de propóleo son los exudados de los brotes de las especies *Populus* y sus híbridos (Salatino et al., 2011). En el **Cuadro 1** se resumen algunos de los componentes químicos de acuerdo a la fuente vegetal y región geográfica.

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 *Populus tremula*; en las regiones



mediterráneas de *Populus nigra* y de las hojas de *Cistus spp.* En Venezuela y Cuba de la resina floral del género *Clusia* (Farooqui et al., 2012).

La biodiversidad de propóleos a nivel mundial es inmensa, en cada región se pueden encontrar diferentes compuestos, por ejemplo, en los propóleos europeos, se han encontrado flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres, así como ácido caféico, ácido ferúlico, los cuales se han recolectado en zonas templadas de los brotes de álamos (Bankova, 2005).

En Brasil abundan la *Baccharis dracunculifolia*, los álamos y una mezcla de plantas tropicales y en sus propóleos han sido encontrados flavonoides (quercetina, galangina, etc.) y el CAPE (Bankova, 2005).

Dentro de los propóleos de Cuba se han encontrado prenilados y benzopironas mayormente en aquellos que contienen resinas de *Clusia rosea*. En los propóleos de Taiwán se encontraron prenilados y benzopironas. Se han identificado varios metabolitos de la serie de los lignanos, a partir de muestras de Islas Canarias, Chile y Brasil. La fuente vegetal de donde provienen aún no ha sido determinada (Bankova, 1995).

Cuadro 1. Tipo de propóleo de acuerdo a la región geográfica y a la fuente vegetal (Salatino et al., 2011).

Región geográfica	Tipo de propóleo	Fuente vegetal probable	Componentes químicos principales	Referencia bibliográfica
Regiones templadas	Álamo	Sección del <i>Populus</i> Aigeiros	Los flavonoides con anillo B sustituido, ésteres de ácido caféico	Bankova et al., 2000



Cuadro 1. Tipo de propóleo de acuerdo a la región geográfica y a la fuente vegetal (continuación).

Región geográfica	Tipo de propóleo	Fuente vegetal probable	Componentes químicos principales	Referencia bibliográfica
América del sur				
Brasil		<i>Araucaria spp.</i>	Diterpenoides	Bankova et al., 1996
Brasil, centro y sureste	Verde	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Diterpenos, Fenilpropanoides prenilados	Banskota et al., 1998; Kumazawa et al 2003
Brasil, el noreste	Rojo	<i>Ecastophyllum Dalbergia</i>	Isoflavonoides, neoflavonoides, lignanos	Trusheva et al., 2006; Dausch et al., 2007; Awale et al., 2008
Brasil, Amazonas		<i>Clusia spp.</i>	Benzofenonas polipreniladas	Salatino et al., 2011
Chile			Lignanos	Valcic et al., 1998
Cuba	Rojo	<i>Leguminosae</i>	Isoflavonoides	Cuesta-Rubio et al., 2007
Cuba	Café	<i>Clusia spp.</i>	Benzofenonas polipreniladas	Cuesta-Rubio et al., 2007
Cuba	Amarillo		Flavonoides polimetoxilados	Hernández et al., 2010; Cuesta-Rubio et al., 2007
Venezuela	Rojo	<i>Clusia spp.</i>	Benzofenonas polipreniladas	Tomas-Barberan et al., 1993; Trusheva et al., 2004
Colombia		Coníferas	Diterpenoides Labdanos	Meneses et al., 2011

Cuadro 1. Tipo de propóleo de acuerdo a la región geográfica y a la fuente vegetal (continuación).

Región geográfica	Tipo de propóleo	Fuente vegetal probable	Componentes químicos principales	Referencia bibliográfica
Central y Norte de América				
El Salvador		Coníferas	Glucósidos Labdano, Chalconas	Popova et al., 2011
México		<i>Populus</i>	Los flavonoides con un anillo no sustituido, ésteres fenilpropanoico	Li et al., 2010
Canadá		Álamo	Flavonoides, ésteres fenilpropanoico, <i>p</i> -hidroxiacetofenona	García-Viguera et al., 1993; Christov R. et al., 2006
Estados Unidos			Flavonoides	Johnson et al., 1994
África				
Islas Canarias			Lignanos	Bankova et al., 1998
Kenia		<i>Macaranga spp.</i>	Lignanos, Flavonoides geranilo	Petrova et al., 2010
Egipto		<i>Macaranga spp.</i>	Flavononas geranilo, Antraquinonas	Bassuony et al., 2009



Cuadro 1. Tipo de propóleo de acuerdo a la región geográfica y a la fuente vegetal (continuación).

Región geográfica	Tipo de propóleo	Fuente vegetal probable	Componentes químicos principales	Referencia bibliográfica
Europa				
Mediterráneo (Bulgaria, Grecia, Argelia, Turquía)		<i>Populus Aigeiros</i>	Los ésteres del ácido caféico, ácido ferúlico, flavonoides con un anillo B sustituido	Velikova M. et al., 2000
Turquía		<i>Populus alba</i> , <i>Populus tremuloides</i> , <i>Salix alba</i>	Flavonoides con anillo B no sustituido, vainillina, crisofanol (antraquinona)	Silici S. et al., 2005
Grecia, Chipre, Creta		Álamos, <i>Cupressaceae</i>	Flavonoides con anillo B sustituido, antraquinonas, diterpenos	Kalogeropoulos N. et al., 2009; Popova M. P. et al., 2010; Popova M. P. et al., 2009
Países Bajos		Álamo	Flavonoides con anillo B no sustituido, ésteres de glicerol y ácido cinámico.	Banskota A. H. et al., 2002
Asia				
Nepal		Álamo	Isoflavonas, neoflavonas, Flavonoles	Shrestha et al., 2007
Taiwán		<i>Macaranga spp.</i>	Flavonoides	Huang et al., 2007
China	Álamo	Álamo	Flavonoides con un anillo B sustituido	Usia et al., 2002



Cuadro 1. Tipo de propóleo de acuerdo a la región geográfica y a la fuente vegetal (continuación).

Región geográfica	Tipo de propóleo	Fuente vegetal probable	Componentes químicos principales	Referencia bibliográfica
Corea			Ésteres de ácido caféico, Flavonoides con un anillo B sustituido	Ahn et al., 2004
Japón		Álamo	Ésteres de ácido caféico	Hamasaka et al., 2004

2.5 Composición química

El propóleo es el material resinoso que las abejas recogen de diversas fuentes de ciertas plantas y se mezclan con cera, para su uso como un sellador antimicrobiano en la colmena. Su composición química es cualitativo y cuantitativamente variable (Bankova et al., 2007; Salatino et al., 2011).

La fuente de la planta, el olor, el color, es el principal determinante de la composición química y como consecuencia de las propiedades biológicas del propóleo de una región en particular. El control de la procedencia geográfica es crucial para asegurar una composición coherente de propóleo y lograr la mejor estandarización posible, también interfiere el método de recolección (Bankova et al., 2007; Sforcin y Bankova, 2011).

En numerosos estudios se ha determinado que, los constituyentes principales del propóleos son: cera, resinas, bálsamos, aceites esenciales, polen, además de impurezas orgánicas e inorgánicas denominadas genéricamente impurezas mecánicas (Ribeiro, 2003; Chaillou, 2005).



Además, se ha determinado que los componentes del propóleo se originan de tres fuentes: los exudados de las plantas que colectan las abejas, las sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y los materiales que se introducen durante la elaboración del propóleo (Farooqui et al., 2012). La proporción de éstos es variable y depende de factores como la época de recolección, el origen vegetal de la resina y también es importante la raza de abejas (Chaillou, 2005).

Un análisis primario de cualquier muestra de propóleos permitirá determinar, en líneas generales, la presencia de cera, íntimamente mezclada en proporciones de 20-30%. Las muestras obtenidas por raspado de cuadros presentan mayores cantidades de cera, además de resinas y bálsamos aromáticos (40-50%), aceites esenciales (5-10%), polen (4-5%) y materia no orgánica (10- 30%). Estas últimas se encuentran en los propóleos empleados con fines constructivos (Chaillou, 2005; Papotti et al., 2012). Químicamente, se han identificado en el propóleo, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos y sus ésteres, alcoholes, aldehídos, agliconas, hidrocarburos, cetonas, terpenoides, vitaminas, minerales, flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, estilbenos, esteroides, aldehídos aromáticos, etc. Los componentes principales son compuestos fenólicos, que presentan en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Chaillou, 2005).

Estos compuestos polifenólicos constituyen mezclas complejas que contienen compuestos representativos de diversos grupos estructurales, destacándose entre los mismos los flavonoides y las agliconas, a los cuales se les atribuye las propiedades antibacterianas, funguicidas, antivirales, y antioxidantes, así como también los ácidos fenólicos y sus ésteres (Papotti et al., 2012). En el **Cuadro 2** se resumen algunos de los compuestos químicos más representativos descritos en el propóleo.



Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (Salatino et al., 2005; Salatino et al., 2011).

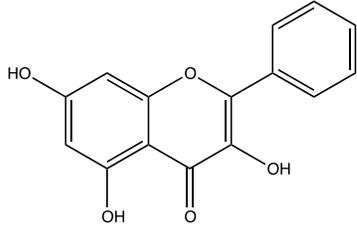
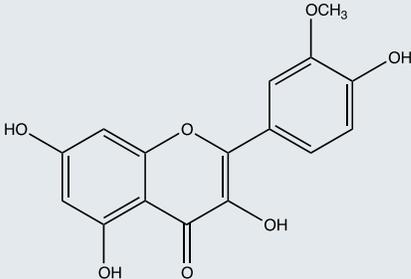
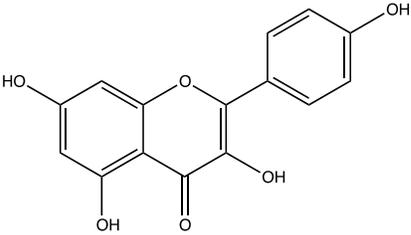
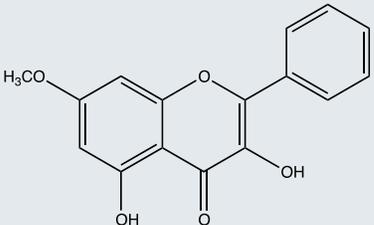
Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
FLAVONONAS			
Pinocembrina		España México Argentina Portugal Rumania Croacia China Turquía Jordania Nueva Zelanda	Kumazawa et al., 2004 Salatino et al., 2005 Volpi y Bergonzini 2006 Falçao et al., 2010 Marghitas et al., 2013 Kosalec et al., 2007 Ahn et al., 2007 Shaheen et al., 2011 Lima et al., 2009 Markham et al., 1996
Naringenina		Croacia Jordania Argentina	Kosalec et al., 2007 Shaheen et al., 2011 Volpi y Bergonzini 2006
Pinostrobrina		Nueva Zelanda Rumania	Markham et al., 1996 Marghitas et al., 2013
Alpinetina		China Francia Portugal	Luo et al., 2013 Boisard et al., 2014 Falçao et al., 2010

Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

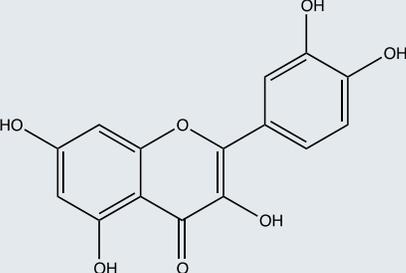
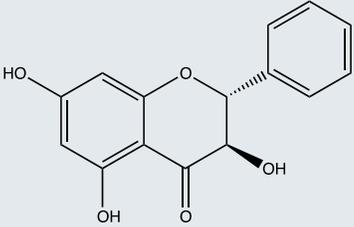
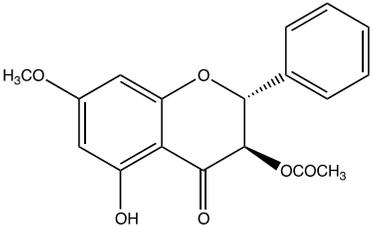
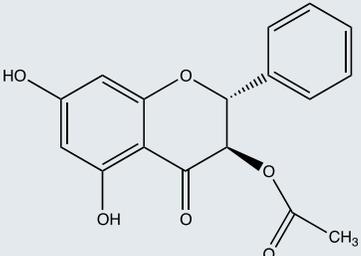
Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
FLAVONAS			
Acacetina		México Argentina	Valencia et al., 2012 Volpi y Bergonzini 2006
Crisina		México España Bulgaria Argelia Portugal Rumania China Argentina Turquía Nueva Zelanda	Valencia et al., 2012 Kumazawa et al., 2004 Bankova et al., 1983 Piccinelli et al., 2013 Falçao et al., 2010 Marghitas et al., 2013 Ahn et a., 2007 Volpi y Bergonzini 2006 Popova et al., 2007 Markham et al., 1996
Apigenina		Argentina Argelia Portugal Grecia Jordania	Volpi y Bergonzini, 2006 Picchinelli et al., 2013 Falçao et al., 2010 Lagouri et al., 2014 Shaheen et al., 2011
5-O-metilcrisina		Portugal	Falçao et al., 2010



Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
FLAVONOLES			
Galangina		Argentina Jordania Turquía Grecia Rumania China España Croacia	Volpi y Bergonzini 2006 Shaheen et al., 2011 Popova et al., 2007 Lagouri et al., 2014 Marghitas et al., 2013 Ahn et al., 2007 Kumazawa et al., 2004 Kosalec et al., 2007
Isorhamnetina		Bulgaria	Bankova et al., 1983
Campferol		Argentina Argelia Bulgaria	Volpi y Bergonzini 2006 Piccinelli et al., 2013 Bankova et al., 1983
7-O-metilgalangina		Nueva Zelanda Países bajos China	Markham et al., 1996 Banskota et al., 2002 Ahn et al., 1996

Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

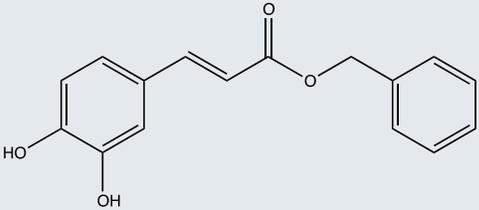
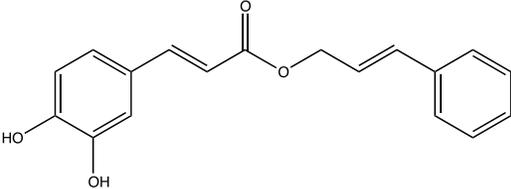
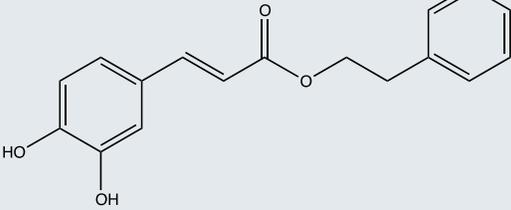
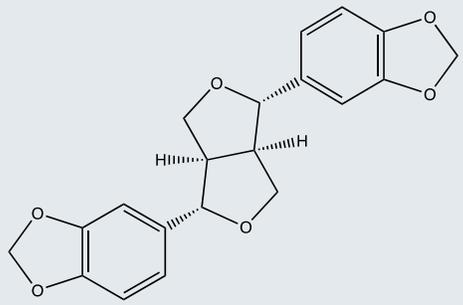
Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
Quercetina		Bulgaria Grecia	Bankova et al., 1983 Lagouri et al., 2014
BIOFLAVONOIDES			
Pinobanskina		China Argelia España Argentina Portugal Turquía Nueva Zelanda	Ahn et al., 2007 Piccinelli et al., 2013 Kamazawa et al., 2004 Lima et al., 2009 Falção et al., 2010 Popova et al., 2007 Markham et al., 1996
Alpinona		Jordania	Shaheen et al., 2011
Pinobanskina-3-O-acetil		México España Portugal China Jordania Turquía Nueva Zelanda	Valencia et al., 2012 Kamazawa et al., 2004 Piccinelli et al., 2013 Ahn et al., 2007 Shaheen et al., 2011 Popova et al., 2007 Markham et al., 1996

Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

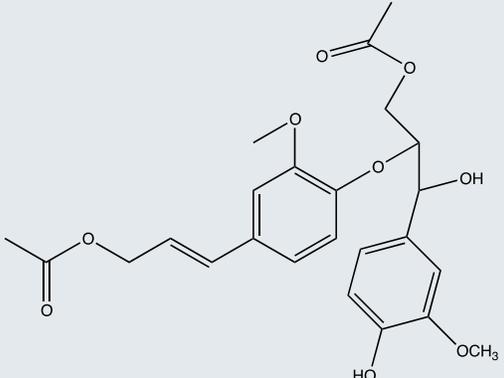
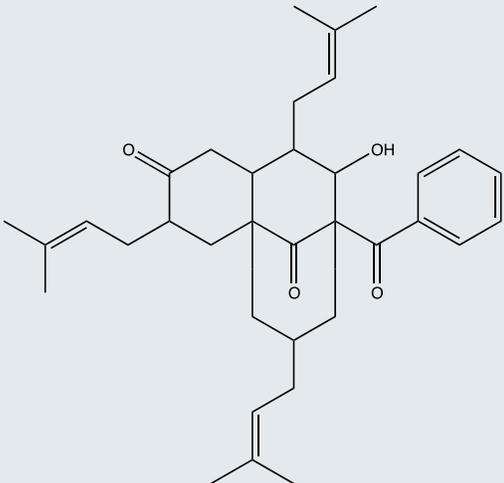
Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
ISOFLAVONOIDES			
Genisteína		Argentina	Volpi y Bengonzini 2006
ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÉSTERES			
Ácido ferúlico		Turquía España Rumania Grecia China Países Bajos	Popova et al., 2007 Kumazawa et al., 2004 Marghitas et al., 2013 Lagouri et al., 2014 Ahn et al., 2007 Banskota et al., 2002
Ácido caféico		Turquía Grecia España Portugal Rumania China	Popova et al., 2007 Lagouri et al., 2014 Kumazawa et al., 2004 Falção et al., 2010 Marghitas et al., 2013 Ahn et al., 2007
Ácido <i>p</i> -cumárico		Turquía Grecia Portugal Rumania China España	Popova et al., 2007 Lagouri et al., 2014 Falção et al., 2010 Marghitas et al., 2013 Ahn et al., 2007 Kumazawa et al., 2004



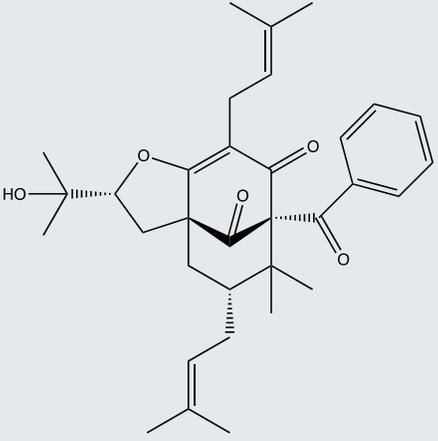
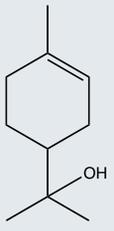
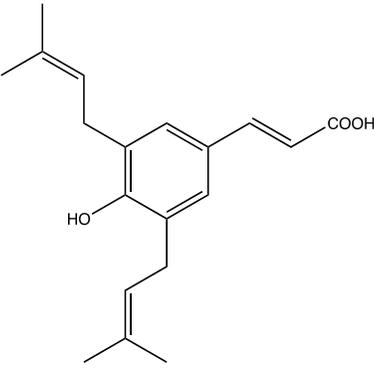
Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
Cafeato de Bencilo		Turquía China	Popova et al., 2007 Ahn et al., 2007
Cafeato de Cinamilo		China España	Ahn et al., 2007 Kumazawa et al., 2004
Feniletil éster del ácido caféico (CAPE)		Japón España México Portugal	Salatino et al., 2011 Kumazawa et al., 2004 Valencia et al., 2012 Falçao et al., 2010
LIGNANOS			
Sesamina		Islas Canarias	Christov et al., 1999

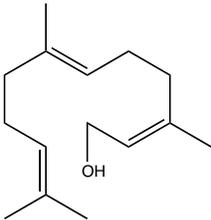
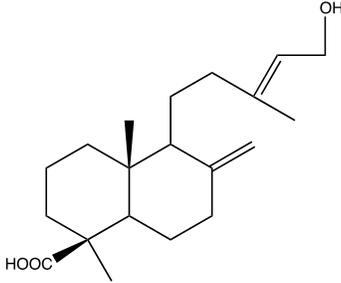
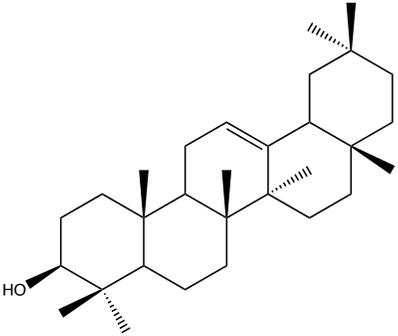
Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
Dímero del alcohol coniferílico		Chile	Valcic et al., 1998
BENZOFENONAS PRENILADAS			
Nemorosona		Cuba	Salatino et al., 2011

Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
Propolona D		Cuba	Hernández et al., 2005
MONOTERPENOS			
Terpineol		Brasil	Koo et al., 2002
Artepillin C		Brasil	Salatino et al., 2011

Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
SESQUITERPENOS			
Farnesol		Brasil	Salatino et al., 2005
DITERPENOS			
Ácido isocuprésico		Brasil	Salatino et al., 2011
TRITERPENOS			
β-amirina		Egipto	Christov et al., 1998



Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (continuación).

Nombre del compuesto	Estructura química	Procedencia	Referencia bibliográfica
ÁCIDOS GRASOS			
Ácido oleico	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7$	Corea	Chang et al., 2003
Ácido palmítico	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	Corea	Chang et al., 2003
Ácido mirístico	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	Corea	Chang et al., 2003

2.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA

En los últimos años se ha publicado un gran número de estudios en relación a las propiedades biológicas presentes en el propóleo, los cuales señalan que la combinación de distintos componentes es esencial para que se presente alguna actividad biológica considerable (Bankova, 2005).

2.6.1 Actividad anticancerígena

La actividad anticancerígena es quizá la actividad biológica más estudiada en los productos naturales, principalmente en los propóleos. La búsqueda de nuevos compuestos de origen natural con actividad anticancerígena es uno de los



principales objetivos de los grupos de investigación en el tratamiento del cáncer. Se han realizado investigaciones en diversas partes del mundo en las que se concluye que efectivamente estos productos naturales poseen actividad antiproliferativa contra varios tipos de células cancerígenas tanto de humano como de ratón e incluso se han logrado aislar e identificar algunos de los compuestos responsables de dicha actividad (Banskota et al., 2002).

Existen diversas investigaciones que aprueban el efecto anticancerígeno mediante ensayos con animales y cultivos celulares, donde se manifiesta que el consumo de propóleo podría ser preventivo para el cáncer (Ribeiro y Salvadori, 2003).

2.6.2 Actividad antitumoral

Varias investigaciones han reportado la propiedad antitumoral del propóleo *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha demostrado que presenta actividad antiproliferativa en tumores celulares (Rao et al., 1995; Banskota et al., 2001). La propiedad quimiopreventiva del propóleo se ha analizado en modelos con animales y cultivos celulares, observando su amplia capacidad para inhibir la síntesis de ADN en células tumorales. Se ha aislado una sustancia activa de un propóleo brasileño y ha sido caracterizada y se observa que inhibe el crecimiento de células hepáticas y detiene las células tumorales. Los extractos de propóleo se han examinado en varios estudios para evaluar su actividad citotóxica, comprobando que el CAPE tiene una acción antitumoral (Orsolic, 2010).

2.6.3 Actividad Inmunológica

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



En los modelos de inmunosupresión, la administración de extractos acuosos de propóleo en ratones previenen los efectos de la ciclofosfamida y mejora la tasa de supervivencia de los animales (Dimov et al., 1991).

2.6.4 Actividad antifúngica

El aumento en la prevalencia de las micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos empleados en la actualidad y los efectos secundarios que estos últimos provocan en los pacientes son, sin duda, algunos indicadores de la necesidad de encontrar o desarrollar nuevos compuestos que cumplan con los requerimientos de un antifúngico ideal. De acuerdo a varios autores el propóleo es el producto apícola que presentó la mayor actividad antifúngica, según un estudio donde se examinaron diferentes productos apícolas frente a 40 cepas de levaduras, de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Trichosporon spp.* (Koc et al., 2011).

2.6.5 Actividad antiparasitaria

El propóleo actúa en contra de muchos parásitos, de esta manera ha llamado la atención de algunos científicos, ya que podría actuar como protector intestinal contra parásitos como *Schistosoma mansoni* y *Giardia duodenalis* (Freitas et al., 2006; Issa, 2007).

2.6.6 Actividad antimicrobiana

Las propiedades antimicrobianas del propóleo han sido estudiadas desde finales de la década de los cuarenta. En ensayos *in vitro* se ha demostrado que los extractos de propóleos son activos frente a numerosos microorganismos, siendo más eficaces en un gran número de bacterias Gram positivas, pero con limitada actividad sobre Gram negativas (Marcucci et al., 2001; Choi et al., 2006). En otros estudios se describe la actividad antimicrobiana de extractos de propóleo de Corea y se encontraron que estos tenían actividad sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhimurium* y *Candida albicans*, atribuyendo esta actividad al contenido de compuestos fenólicos como los flavonoides (Velázquez et al., 2007).



2.6.7 Actividad antiviral

Propiedades antivirales de propóleos se han conocido durante muchos años. En estudios sobre la infección por Virus de Herpes Simplex (VHS) *in vitro*: el 0,5% del extracto de propóleo provocó una inhibición del 50% de la infección por VHS, mientras que *in vivo* el 5% el propóleo ayudó a prevenir la aparición y el desarrollo de los síntomas de la infección de VHS-1 en ratones. También aplica en el estudio para demostrar la eficacia en la infección por herpes genital (VHS tipo 2) (Kuropatnicki et al., 2013).

2.6.8 Actividad antiinflamatoria y cicatrizante

Diversos autores han considerado que la capacidad de acelerar la epitelización y la división celular en la curación de las heridas, así como la prevención y detención del desarrollo de procesos inflamatorios, son de las propiedades más características de los preparados que contienen propóleo. Investigaciones han probado que la aplicación de soluciones alcohólicas de propóleo aceleran los procesos de regeneración tisular. Por otro lado, algunos de los componentes fenólicos del propóleo como el ácido caféico y el CAPE, así como la quercetina y la naringenina, ejercen un efecto antiinflamatorio a través de diversos mecanismos. Diversos estudios realizados con respecto a la actividad antiinflamatoria de los extractos del propóleo concluyen que este proceso se basa en la acción inhibitoria hacia la enzima COX, precursora del proceso inflamatorio. Los resultados obtenidos en los estudios realizados al propóleo han permitido considerarlo como una excelente alternativa natural en los tratamientos de inflamación crónica y aguda (Araujo et al., 2001).

2.6.9 Actividad antioxidante

El propóleo es una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación. Sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad antirradicalaria y al efecto inhibitorio sobre el ión cuproso, indicador de la oxidación de las LDL (Farré et al, 2004).



Como antioxidante el propóleo presenta compuestos que poseen la capacidad de retrasar o prevenir la oxidación de otras moléculas, de hecho, este efecto es atribuido a la presencia de compuestos fenólicos que varía de acuerdo al origen geográfico y botánico del propóleo. CAPE es el típico constituyente de propóleo derivado del álamo y al parecer es el agente antioxidante más poderoso de las sustancias reportadas en estas resinas (Farooqui, 2010).

A su vez la actividad antioxidante ha sido ampliamente estudiada debido a su prometedora aplicación en la medicina preventiva, ya que su consumo podría evitar o reducir los daños causados a las células por los radicales libres, lo que conlleva al desarrollo de ECV y neurodegenerativas principalmente (Farré et al., 2004).



3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de plantas a nivel mundial en las prácticas médicas populares para el tratamiento de desórdenes de diversa etiología, así como en la industria alimenticia como condimentos y/o agentes de sabor además de su uso como ornamentos. En este contexto de productos herbolarios medicinales merecen una mención especial por su uso para la atención primaria de la salud, debido a la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos alopáticos y a la continua búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para el tratamiento de enfermedades crónicas, a menudo letales, como las ECV, el cáncer o el SIDA. Sin embargo, en la mayoría de los países el consumo de estas materias primas no está sujeto a regulación alguna, careciendo de la información relacionada con la normalidad, registro, control de calidad, monografías científicas, comercialización y mercados de estos productos.

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

Debido a la amplia utilización y complejidad del propóleo, en México se deben de establecer normas y parámetros de control de calidad. Tomando en cuenta que el propóleo es un producto apícola altamente variable no se puede estandarizar solo de las técnicas de extracción y de los extractos de propóleo para poder garantizar la actividad biológica de dichos extractos, que posteriormente pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.



De manera general el presente proyecto de investigación se enfocará en un análisis químico del extracto etanólico de un propóleo recolectado en el Valle de Allende, Municipio de Parral, Chihuahua (Rancho Bordier), producto apícola que ha resurgido en los últimos años por sus considerables propiedades terapéuticas.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar el análisis químico de una muestra de propóleo recolectada en el Estado de Chihuahua.

4.2 Objetivos particulares

- ❖ Preparar el extracto etanólico del propóleo recolectado en Chihuahua, México.
- ❖ Realizar la revisión bibliográfica exhaustiva de documentos científicos y páginas especializadas relacionadas con la composición química de propóleos.
- ❖ Realizar el proceso de fraccionamiento primario y secundario del extracto utilizando diferentes disolventes.
- ❖ Aislar y purificar los compuestos presentes en las fracciones derivadas del extracto etanólico del propóleo.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Recolección del propóleo

La muestra de propóleo utilizada fue recolectada por personal de la Facultad de Química, UNAM. En diciembre del 2014 en Valle de Allende, Municipio de Parral, Chihuahua “Rancho Bordier” (26° 51’ y 27° 23’ de latitud norte; los meridianos 105° 23’ y 105° 59’ de longitud oeste; altitud entre 1300 y 2400 m) (**Figura 2**).

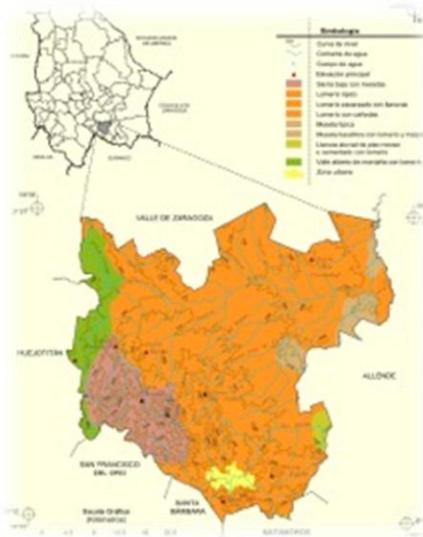


Fig. 2 Municipio de Parral, Chihuahua
(INEGI)

5.2 Procedimientos generales de análisis

5.2.1 Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 (Merck).

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 302 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.

5.2.2 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.



5.3. ESTUDIO QUÍMICO

5.3.1 Preparación de los extractos etanólicos

Se pesó una muestra de propóleo de Chihuahua 169.6 g. los cuales se sometieron a un proceso de extracción continua en un equipo de Soxhlet utilizando como disolvente etanol (1250 mL) por un periodo de cinco horas. Posteriormente, se filtró y se concentró con el uso de un rotavapor hasta sequedad. Se pesó el extracto total seco (52.1 g).

A la muestra anterior se realizó una extracción exhaustiva con acetona 1L y se siguió un proceso similar, se obtuvieron (15.6 g) de extracto seco, los extractos se reunieron debido a su similitud obteniéndose un extracto combinado con un peso de 67.7 g.

5.3.2 Fraccionamiento primario del EEP de Chihuahua

Del concentrado total se tomaron (60.4 g) se disolvió con una mezcla de CH_2Cl_2 /acetona y metanol. El extracto seco se adsorbió en sílica gel y se analizó mediante una técnica cromatografica en una columna al vacío (VLC, 10 × 30 cm). La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad creciente con mezclas de Hexano, CH_2Cl_2 y CH_2Cl_2 /acetona. Se recolectaron seis fracciones que se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de cuatro fracciones primarias. En el **Cuadro 3** se describe el fraccionamiento primario y fracciones obtenidas.

Cuadro 3. Fraccionamiento primario de una muestra del EEP del estado de Chihuahua.

Cantidad de fracciones	Disolvente	Proporción %	Fracción Principal
1	Hexano	100	F1
2-3	CH_2Cl_2	100	F2
4-5	CH_2Cl_2	100	F3
6	CH_2Cl_2 -acetona	50:50	F4



5.3.3 Fraccionamiento secundario del EEP de Chihuahua y purificación de compuestos

De las 4 fracciones que se obtuvieron en el fraccionamiento primario se tomó la F1 y se adsorbió en sílica gel y se realizó el estudio en una columna al vacío (VLC, 10 × 30 cm). La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad creciente con mezclas de CH₂Cl₂/acetona. Se concentraron a sequedad con la ayuda de un rotavapor. Se recolectaron treinta fracciones que fueron reunidas por similitud cromatográfica en doce fracciones. En el **Cuadro 4** se describe el fraccionamiento secundario y fracciones obtenidas. De la fracción secundaria Fx-II precipitó un sólido blanco (3.1 g) de forma espontánea, este sólido se recristalizó con una mezcla sucesiva de hexano/acetona que se denominó compuesto PROCH-C01. Para la caracterización de las estructuras químicas de los compuestos aislados se usaron métodos espectrométricos y espectroscópicos (RMN-¹H) en la **Figura 4** se resume dicho procedimiento experimental.

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario de una muestra del EEP del estado de Chihuahua

Cantidad de fracciones	Disolvente	Proporción %	Fracción Principal
1-2	CH ₂ Cl ₂	100	Fx-I
3-4	CH ₂ Cl ₂ -acetona	98:2	Fx-II
5	CH ₂ Cl ₂ -acetona	98:2	Fx-III
6-7	CH ₂ Cl ₂ -acetona	95:5	Fx-IV
8	CH ₂ Cl ₂ -acetona	95:5	Fx-V
9	CH ₂ Cl ₂ -acetona	95:5	FX-VI
10-12	CH ₂ Cl ₂ -acetona	90:10	Fx-VII
13-16	CH ₂ Cl ₂ -acetona	85:15	Fx-VIII
17	CH ₂ Cl ₂ -acetona	70:30	Fx-IX
18-20	CH ₂ Cl ₂ -acetona	70:30	Fx-X
21-27	CH ₂ Cl ₂ -acetona	50:50	Fx-XI
28-30	Acetona	100	Fx-XII

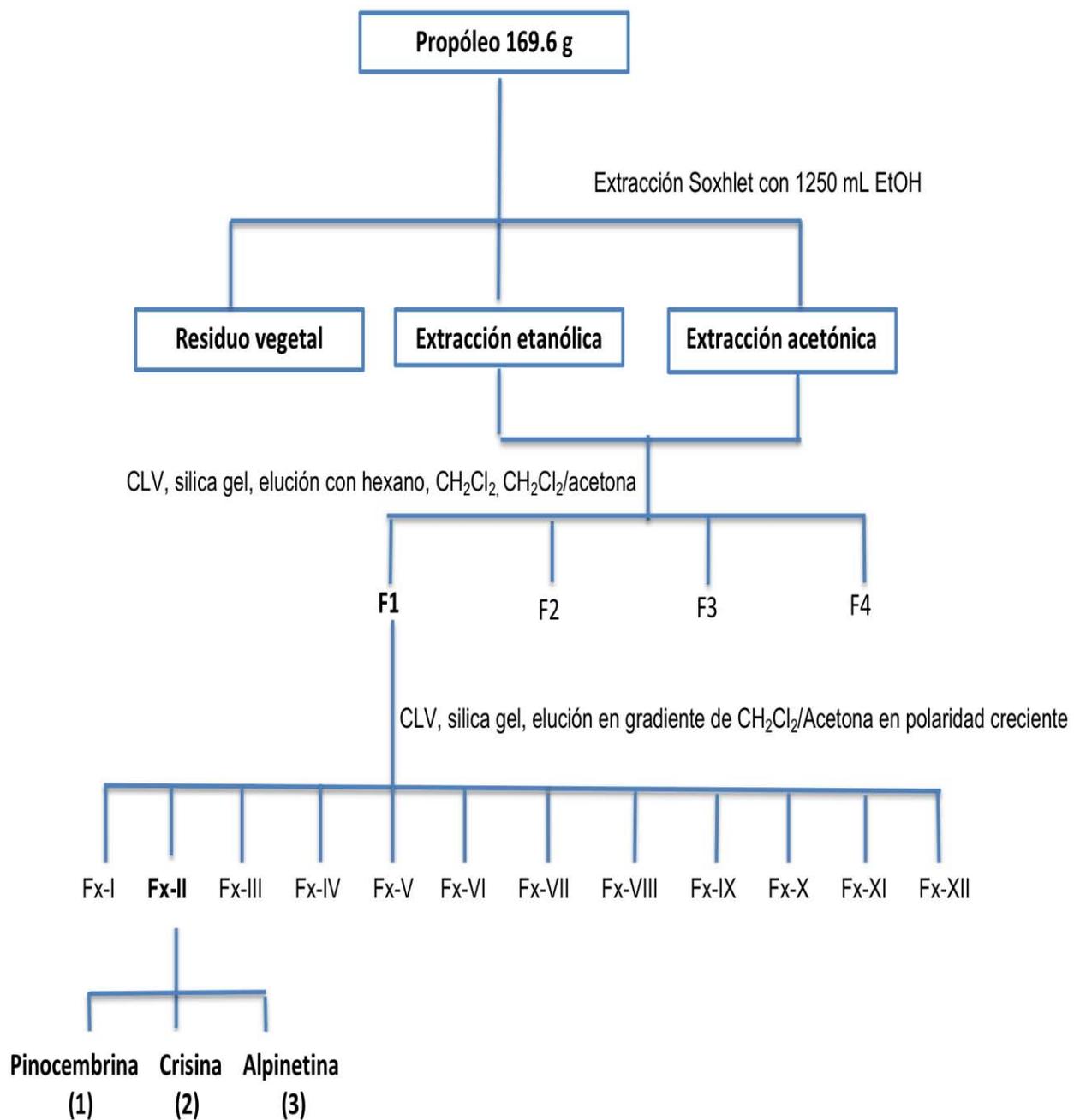


Figura 4. Resumen del procedimiento experimental del análisis químico del EEP de Chihuahua.



6. RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente proyecto de investigación se realizó el estudio químico de un propóleo de la zona melífera del norte de México. La muestra fue recolectada en el “Rancho Bordier” ubicado en el Valle de Allende, Municipio de Parral, Chihuahua. El método de recolección del propóleo fue por raspado. Este método es el que se utiliza tradicionalmente por los apicultores en el mundo, sin embargo, la producción de propóleo que se alcanza es baja. Un factor importante que se debe considerar es el efecto directo sobre la flora y el ciclo reproductivo de las abejas, lo cual repercute directamente sobre la composición del propóleo (Papotti et al., 2012).

El propóleo ha sido seleccionado para su estudio sistemático en nuestro grupo de trabajo debido a los escasos estudios reportados en la literatura para los propóleos producidos en México y por sus usos en la medicina tradicional además de su importancia como suplemento natural y en medicina complementaria (Salatino et al., 2011). Por otra parte, es importante destacar que el EEP se utiliza en la elaboración de tabletas combinado con gran variedad de ingredientes como polen y jalea real; como aditivo en lociones para la piel, cosméticos, jabones, shampoos, 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, para tratar úlceras gastroduodenales. Si se aplica de manera externa, alivia algunos tipos de dermatitis causadas por bacterias y hongos (Castaldo y Caspasso, 2002).

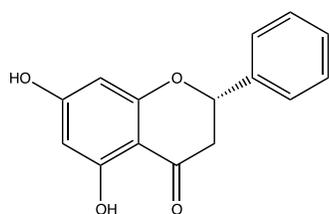
A la fecha numerosas muestras de propóleo han sido estudiadas alrededor del mundo (Bankova et al., 2000; Salatino et al., 2011), sin embargo, hay pocos estudios conducentes a la caracterización química de los propóleos mexicanos (Velázquez et al., 2012). Es importante destacar que no existe ninguna investigación relacionada con propóleos recolectados en Chihuahua.



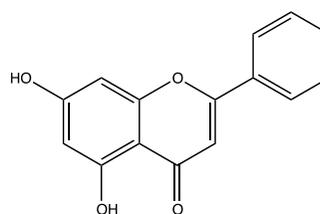
El mayor problema que existe actualmente, a pesar de contar con diversos avances tecnológicos que permiten conocer la composición química de los propóleos, es la variabilidad de la misma, dependiendo del sitio y método de colecta, de los diferentes ecosistemas, del tipo de abeja y de sus fuentes botánicas (Papotti, 2012).

El conocimiento de la composición química de los propóleos es de vital importancia para correlacionarla con las actividades biológicas que aportan los mismos. Por otra parte, permite controlar la calidad de las formas farmacéuticas desde un punto de vista químico y determinar las dosis efectivas en las mismas.

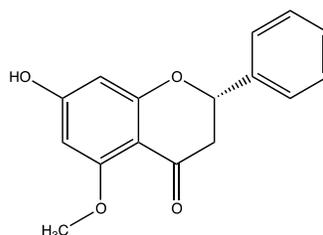
La muestra estudiada fue desecada y sometida a un proceso de extracción continua en un equipo de Soxhlet para obtener los extractos etanólicos. Como paso siguiente, se realizó el aislamiento de los compuestos mayoritarios de la muestra. Los compuestos fueron identificados por comparación directa con muestras de referencia de flavonoides de la zona melífera del altiplano (Puebla y Guanajuato) que se conservan en el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM. Los flavonoides aislados fueron pinocembrina (1), crisina (2), alpinetina (3) los cuales se muestran en la **Figura 7**.



pinocembrina (1)



crisina (2)



alpinetina (3)

Figura 7. Compuestos aislados del EEP de Chihuahua.



Los compuestos aislados del propóleo recolectado en Chihuahua nos permiten incluirlos dentro de los de tipo I (Salatino et al., 2011). 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. En el EEP de Chihuahua se encontró una composición típica de los propóleos de zonas templadas (Ghisalberti, 1979). Cabe resaltar que se aisló pinocembrina, alpinetina y crisina. La presencia de pinocembrina se considera como marcador de los propóleos derivados de árboles del género *Populus* (Salatino et al., 2011; Velázquez et al., 2012).

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*, contiene 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 ilustran en la **Figura 6**.



Figura 6. Patrón quimio-geográfico de los tipos de propóleos. Tomada de Salatino y cols. (2011).



Como se observa en la **Figura 6**, los propóleos mexicanos se incluyen en los tipo I donde las fuentes vegetales predominantes son las especies del género *Populus* sección *Aigeiros*.

En este sentido es importante destacar que en el sitio donde se encuentra ubicado “El Rancho Bordier” Municipio de Parral se señala que la flora predominante son los frutales de durazno y manzana. Mientras que en el INEGI (2014) reporta que predominan los pastizales (81.9%), matorrales (5.9%), bosques (6.4%) y mezquitales (0.5%). Estas especies podrían constituir fuentes de obtención de las resinas recolectadas por las abejas.

6.1 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

6.1.1 Pinocembrina

La pinocembrina (5,7-dihydroxiflavanona) se aisló en forma de cristales blancos y fue soluble en CH_2Cl_2 y MeOH. Este flavonoide se ha encontrado en la miel, el propóleo y varias plantas, como raíces de jengibre y orégano (Lan et al., 2015). Se ha identificado en propóleos procedentes de distintos países como Canadá, Croacia, Rumania, Turquía y México (García-Viguera, 1993, Kosalec et al., 2007, Popova et al., 2007, Hernández et al., 2007, Marghitas et al., 2013). Este compuesto se conoce por sus actividades farmacológicas, incluyendo antiinflamatorias, antioxidante, antifúngica, antitrombótica, antimicrobiana, antialérgica, hepatoprotector, antiviral, quimiopreventivo del cáncer, anti-asmáticos y otros (Yang et al., 2013). Se han realizado estudios preclínicos en los cuales se han demostrado efectos antiinflamatorios y neuroprotectores, así como la capacidad de reducir especies reactivas de oxígeno, protección de la barrera hematoencefálica, modulación de la función mitocondrial, y la regulación de la apoptosis (Lan et al., 2015).



6.1.2 Crisina

La crisina es una flavona presente en una gran variedad de propóleos y mieles de todo el mundo, se ha aislado previamente a partir de *Scutellaria sp.*, así como en especies de *Populus* (Wang et al., 2000; Zhou et al., 2002). Además se ha identificado por CL-EM como componente del propóleo de diferentes orígenes, aunque es común encontrarla en propóleos chinos (Yang, 2015), portugueses (Falçao et al., 2010), búlgaros (Bankova et al., 1983), argentinos (Lima et al., 2009) y mexicanos (Hernández et al., 2007). Hoy en día, la crisina se ha convertido en el candidato más importante ya que presenta beneficios para la salud, debido a sus múltiples actividades biológicas: antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antihipertensiva, antialérgico, vasodilatador, antidiabético, anticancerígeno, entre otras. La actividad contra el cáncer es la más prometedora entre los múltiples efectos farmacológicos, modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la crisina inhibe el crecimiento del cáncer mediante la inducción de la apoptosis, alteración del ciclo celular y la inhibición de la angiogénesis, además de la invasión y metástasis sin causar toxicidad y efectos indeseables a las células normales. La crisina muestra estos efectos a través de la modulación selectiva de múltiples vías de señalización celular que están relacionadas con la inflamación, el crecimiento, la angiogénesis y la metástasis de las células cancerosas. Este amplio espectro de actividad antitumoral en combinación con la baja toxicidad subraya el uso de la crisina en la terapia del cáncer (Reddy et al., 2015).

6.1.3 Alpinetina

Esta flavonona ha sido aislada de plantas a partir de sus raíces o semillas de *Alpinia katsumadai* Hayata, *Vitex leptobotrys*, *Amomum alnus*, *Populus*, *Polygonum* y *Scutellaria* (Pan et al., 2014). Se ha identificado en propóleos de distintos países como Portugal, China y Francia (Falçao et al., 2010, Luo et al., 2013, Boisard et al., 2014). Al igual que otros flavonoides, este compuesto se está reconociendo cada vez más por poseer un amplio espectro de actividades biológicas e importantes aplicaciones terapéuticas como actividad antibacteriana, antiinflamatoria etc. Se han realizado diversos estudios para investigar el efecto benéfico que pueda tener sobre



el cáncer de páncreas y posibles mecanismos involucrados. Líneas celulares de cáncer de páncreas fueron tratados con alpinetina a diversas dosis y en tiempos diferentes y se observó el efecto de la alpinetina en la inhibición del crecimiento celular. Los investigadores concluyeron que la alpinetina puede servir como un agente potencial para el desarrollo de terapias con células de cáncer de páncreas (Jian et al., 2012).

8. CONCLUSIONES

A partir del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua se aislaron, purificaron y caracterizaron dos flavononas (pinocembrina y alpinetina) y una flavona (crisina). Estos flavonoides han sido reportados previamente en propóleos recolectados en Sonora, México (Velázquez et al., 2007). La presencia de la pinocembrina es congruente con la descripción de Salatino y colaboradores (2011) sobre los compuestos marcadores de los propóleos recolectados en las zonas templadas (Tipo I) y cuyas fuentes vegetales son principalmente los árboles del género *Populus*.

La presencia de los flavonoides puede explicar de forma parcial las actividades biológicas descritas para los propóleos de Tipo I. Entre estas actividades destacan; antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, antifúngica, antialérgica, antiviral, entre otras (Salatino et al., 2011).

Con base en los resultados obtenidos se pudo corroborar que la zona geográfica de recolección de las muestras influye directamente en la composición de los propóleos.



9. PERSPECTIVAS

Continuar el estudio químico del EEP de propóleo de Chihuahua e identificar los compuestos minoritarios.

Determinar la capacidad antioxidante del EEP de Chihuahua y los compuestos aislados.

Determinar la toxicidad del EEP en un panel de líneas celulares cancerosas.

Determinar el efecto vasorrelajante en el ensayo de aorta aislada de rata de los flavonoides aislados en el presente estudio.



10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Adanero, F. (2000). Curso para Diplomado en Sanidad Animal, Ed. Soria.
- Araujo, M.A., Libério S.A., Guerra, R.N., Ribeiro, M.N. (2001). Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Rev. Bras. Farmacogn.* Vol. 22, n.1, 208-219.
- Asís, M. (1993). Apiterapia para todos. Como usar los siete productos de la colmena para curar. Ed. Científico Técnica, 60-96.
- 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.S., Popov, S.S., Marekov, N.L., (1995). Chemical composition and plant origin of propolis. *Bulg. Chem. Commun.* 28, 372-382.
- Bankova, V.S., De Castro, S.L., Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apodologie*, 31:3-15.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117.
- Bankova, V., Popova, M., Tsusheva, B., Bogdanov, S., Sabatini, A.G., Marcucci, M., (2007). Propolis: from folk medicine to modern preparations. *Mitsubachi Kagaku* 27, 63-70.



- Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands 84 propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80:67–73.
- Banskota, A.H., Tezuka Y., Kadota S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 15(7): 561-571.
- 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.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chemistry and Toxicology*, 36, 347-363.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis an old remedy used in, modern medicine. *Fitoterapia*, 73, Suppl. 1: S1–S6.
- Chaillou, L. (2005). Propóleos de Santiago del Estero. Características físicas y químicas. Actividad antibacteriana y antioxidante. Identificación y cuantificación de flavonoides. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina.
- Chang, J., Young, B., Ho-Jae, L., Hwan, S. (2003). Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *Han'guk Sikip'um Yongyang Kwahak Hoechi*, 32:501–505.
- Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Food Sci. Technol.* 39: 756-761.



- Christov, R., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Delgado-Tejera, A. (1999). Antibacterial furofuran lignans from Canary Island propolis. *Fitoterapia*, 70:89–92.
- Dimov, V., Ivanoska, N., Manolova, N., Nikolov N., Popov S. (1991). Immanomodulatory action of propolis. Influence on anti-infection and macrophage function. *Apidologie*. 22: 155-162.
- Falção, 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.
- Farooqui, T., Farooqui, A. (2010). Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of propolis: A Critical Review. *Curr Nutr Food Sci*. 6: 188-199.
- Farooqui, T., Farooqui, A.A. (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in Bioscience*, E4: 774-793.
- Farré, R., Frasquet I., Sánchez, A. (2004). El propolis y la salud. *Ars Pharm*. 45: 23-43.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin J.M., Guimaraes, S. (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 13 (3): 170-175.
- García-Viguera, C., Ferreres, F., Tomas-Barberan, 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.
- Giralt, T. (2001). Producción, Cosecha, Manejo poscosecha, Caracterización de propóleos y forma de empleo en la terapia de diferentes enfermedades. Memorias IV Seminario Internacional de abeja africanizada Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, 25-38.
- González, A., y Bernal, R., (2002). Propóleos: Un Camino hacia la salud. Editorial Cuarto día, tercera edición, México, Jalisco, 8,12,15.
- Gregoris, E., Fabris, S., Bertelle, M., Grassato, L., Stevanato, R. (2011). Propolis as potencial cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant propertis. *Int J. Pharm*, 405: 97-101.
- Hernández, I. M., Fernández, M. C., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli A. L., Rastrelli, L. (2005). Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 68:931–934.
- Hernández, J., Goycoolea, F., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Domínguez, Z., Robles, Moreno, L., Velásquez, E. Astiazaran, H., Lugo, E., Velásquez, C. (2007). Sonoran propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cells Lines. *Planta Médica*, 73: 1469-1474.
- Hernández, S.M. (2005). Características Organolépticas y Fisicoquímicas de Propóleos de la Provincia de Nuble, VIII Región- Chile.
- Issa, R. (2007). *Schistosoma mansoni*: The prophylactic and curative effects of propolis in experimentally infected mice. *RMJ* 32:2.



- Jian, D., Bo, T., Jingwen, W., Hongtao, S., Xueli, J., Liming, W., Zhongyu W. (2012). Antiproliferative effect of alpinetin in BxPC-3 pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 29(4):607-12.
- Koc, A.N., Silici, S., Kasap, F., Hormet-oz, H.T., Mavus-buldu H., Ercal B.D. (2011). Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* *Journal of Medicinal Food* 14 (1-2): 128-134.
- 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.
- 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., Bankova, V., Sforcin, J.M., Szliszka, E., Czuba, Z., Kuropatnicki, A.K. (2013). Propolis: properties, application, and its potential. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2013, 807578.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts. *International Journal of Food Properties*, 17(3): 511-522.
- Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-based complementary and alternative medicine. 1: 11.



- 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.
- Lan, X., Wang, W., Li, Q., Wang, J. (2015). The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Mol. Neurobiol.*, Ahead of Print.
- 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.
- 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.
- Luo, Z., Dong, J., Zhao, L., Zhang, H. (2013). Analysis of polyphenolics in propolis from Henan province. *Shipin Kexue* (Beijing, China), 34:139-143.
- Manrique, A.J., Santana, W.C. (2008). Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Trop.* 26: 157-166.



- Marcucci, MC., Ferreres, F., Garcia-Viguera C., Bankova, VS., De Castro, SL., Dantas, AP. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 74: 105-112.
- Marghitas, L., Laslo, L., Dezmiorean, D., Moise, A., Maghear, O. (2013). *Total phenolics and antioxidant activity of Romanian propolis*, International Conference Agricultural and Food Sciences, Progresses and Technologies, Sibiu, Rumania.
- 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.
- Martínez, Flores S., González, Gallego, J., Tuñón, MJ. (2010). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Revisión. *Nutr. Hosp* 8: 271-278 (a).
- Martínez, L., Delgado., M. Rojas, N., Casillas, R. (2010). El propóleo y las técnicas para su colecta, *Notiabeja*. Núm 6 (b).
- Niraldo, P., Avaliacao, (2005). Da actividade antiinflamatória do extracto padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte activo, Artepillin C. Tesis Doctorado, Florianópolis, Universidad Federal de Santa Catarina. Brasil.
- Orsatti, C.L. y Sforcin, J.M. (2012). Propolis immunomodulatory activity on TLR--2 and TLR-4 expression by cronically stressed mice. *Natural Product Research*, 26:446-453.
- Orsolic, N. (2010). A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *JAAS* 2 (1): 1-20.



- 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.
- Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., Plessi M. (2012). Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *J. Agricultural Food Chemistry*. 60: 2852-2862.
- 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.
- 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.
- Popova, M., Trusheva, B., Cutajar, S., Antonova, D., Mifsud, D., Farrugia, C., Bankova, V., (2012). Identification of the plant origin of the botanical biomarkers of Mediterranean type propolis. *Natural product communications* 7, 569-570.
- Rao, C.V., Desai, D., Riverson A., Simi, B., Amin, S., Reddy B.S. (1995). Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenethyl 1-3-methylcaffeate. *Cancer research*. 55, 310-315.
- Reddy K. E., Nerendra B. L., Mohanrao M. R., Athira K. V., Gogoi R., Chandana C. B. (2015). Chemopreventive and therapeutic potencial of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Journal of toxicology letters*. 214-225.



- Reyna, W., (2013). Efecto de la zona y la época de colecta sobre la producción de marcadores químicos en propóleos de la región del altiplano mexicano. Tesis UNAM, Facultad de química, México D.F.
- Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M. (2003). Dietary components may prevent mutation-related diseases in human. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 544 (2-3): 195-201.
- Sahinler, N., Gul, A. (2005). The Effects of Propolis Production Methods and Honeybee Genotypes on Propolis Yield. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 1212-1214.
- 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.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G. & Message. D. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Journal Natural Products Reports*. 2:33-38.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 133, 253-260.
- 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.
- Valcic, S., Montenegro, G. Timmermann, B.N. (1998). Lignanes from Chilean propolis. *Journal of Natural Products*, 61:771-775.



- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J.C., Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, E., Hernández, J., Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131:645-651.
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Domínguez, Z., Robles R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, FM., Velázquez, EF., Astiazaran, H., Hernández, J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl. Microbiology*. 103: 1747-1756.
- Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131:645-651.
- 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.
- Wang, X., Wang, H., Wang, Q. (2000). Chemical constituents of male inflorescence of *Populus Canadensis* Moench. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 31:171-173.
- Wagh, V.D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and its pharmacological Potentials, *Advances in Pharmacological Sciences*. 1:11
- Yang, N., Qin, S., Wang, M., Chen, B., Yuan, N., Fang, Y., Yao, S., Jiao, P., Yu, Y., Zhang, Y., Wang, J., (2013). Pinocembrin, a major flavonoid in propolis, improves the biological functions of EPCs derived from rat bone marrow through the PI3K-eNOS-NO signaling pathway. *Cytotechnology* 65, 541-551.



- Yang, H., Huang, Z., Huang, Y., Dong, W., Pan, Z., Wang, L. (2015). Characterization of chinese crude propolis by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 113, 158-164.
- 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.

11. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2012. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html> consultada el 20 de agosto del 2015.
- Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, UNAM. http://www.ibiologia.unam.mx/colecciones/insectos/centro_insec.htm# consultada el 28 de agosto del 2015.
- Fundación UNAM <http://www.fundacionunam.org.mx/ecologia/colapso-en-las-colmenas-de-abejas/> consultada el 15 de septiembre del 2015.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) <http://www.inegi.org.mx> consultada el 18 de noviembre del 2015.