



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS QUÍMICO DE UNA RECOLECTA DE PROPÓLEO
DE ZACATECAS, MÉXICO”**

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

PRESENTA

Violeta Andrea Silva Rivera

DIRECTOR

Dr. José Fausto Rivero Cruz



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

VOCAL: Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci

SECRETARIO: Dr. José Fausto Rivero Cruz

1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2° SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE DE SARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA: _____
Dr. José Fausto Rivero Cruz

SUPERVISOR TÉCNICO: _____
M. en C. Jessica Granados Pineda

SUSTENTANTE: _____
Violeta Andrea Silva Rivera

Índice

Lista de figuras	ii
Lista de Cuadros	iii
Lista de abreviaturas	iv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
2.1. Definición de propóleo	6
2.2. Tipos de propóleo	6
2.3. Historia	7
2.4. Composición química	8
2.2 Actividad biológica y farmacológica	11
2.2.1. Actividad antibacteriana	11
2.2.2. Actividad antifúngica	12
2.2.3. Actividad antiparasitaria y antiprotozoaria	12
2.2.4. Actividad antiviral	14
2.2.5. Actividad anticancerígena	14
2.2.6. Actividad antitumoral	14
2.2.7. Actividad antiinflamatoria y antioxidante	15
2.2.8. Estrés oxidativo	16
2.2.9. Actividad hepatoprotectora	16
2.2.10. Usos y aplicaciones	17
2.2.11. Recolección del propóleo	19
2.2.11.1 Raspado	19
2.2.11.2 Rejillas	20
2.2.11.3 Mallas	21
3. Justificación	23
4. Objetivo	25
4.1 Objetivo General	25
4.2 Objetivos Particulares	25
5. Desarrollo Experimental	26
5.1. Recolección del propóleo	26
5.2 Procedimientos Generales de Análisis	27
5.2.1 Análisis Cromatográficos	27
5.2.2 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas	27
5.3 Cuantificación del contenido de fenoles totales	27
5.4 Cuantificación de flavonoides totales	28
5.5 Evaluación de la actividad antioxidante	28
5.5.1 Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	28

5.6 Determinación del efecto del extracto sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.	29
5.6.1 Microorganismos de prueba	29
5.6.2 Procedimiento general	29
5.6.3 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	30
5.7 Estudio Químico	30
5.7.1 Preparación del Extracto etanólico	30
5.7.2 Fraccionamiento primario del EEP	30
5.7.2.1 Extracción y fraccionamiento primario del extracto etanólico del propóleo (EEP).	30
5.7.3 Fraccionamiento secundario del EEP y purificación de compuestos.	32
6. Resultados y Discusión	38
6. 1 Estudio químico del propóleo de Zacatecas	38
6.2 Caracterización estructural de la pinocembrina (1).	39
6.3 Caracterización estructural de la alpinetina (2) y la 5-O-metoxipinobanksina (3).	43
6.4 Cuantificación de fenoles totales	47
6.5 Cuantificación de flavonoides totales	47
6.6. Evaluación de la actividad antioxidante	48
6.6.1 Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	48
6.7 Determinación del efecto de los extractos sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral.	49
7. Conclusiones	51
8. Perspectivas	52
9. Referencias bibliográficas	53

Lista de figuras

Figura 1. Abeja (<i>Apis mellifera</i>) recolectando resinas en un tronco.....	6
Figura 2. Distribución geográfica de los tipos de propóleo	7
Figura 3. Composición general de los propóleos.....	8
Figura 4. Productos derivados de miel y propóleo. Fotografía del mercado Municipal de Tuxpan, México Veracruz, tomada por Silva Rivera Violeta Andrea.....	19
Figura 5. Método del raspado con espátula de acero inoxidable.....	20
Figura 6. Placa plástica recolectora de propóleo.....	21
Figura 7. Abeja (<i>Apis mellifera</i>) relleno los huecos con propóleo	21
Figura 8. Localización de Fresnillo, Zacatecas.....	26
Figura 9. Desarrollo experimental parte 1.....	36
Figura 10. Desarrollo experimental parte 2.....	37
Figura 11. Espectro de RMN- ¹ H de la pinocembrina (1), MeOH-d ₆ , 400 MHz....	41
Figura 12. Espectrometría de Masas de la pinocembrina (1).....	42
Figura 13a. Espectro de RMN- ¹ H de la alpinetina (2), DMSO-d ₆ , 400 MHz.....	45
Figura 13b. Espectro de RMN- ¹ H de la 5-O-metoxipinobanksina (3), DMSO-d ₆ , 400 MHz.....	46
Figura 14. Curva patrón realizada con Trolox® para el ensayo de DDPH.....	49

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Compuestos identificados en resinas de propóleo (Massaro et al., 2015; Marcucci, 1995).....	9
Cuadro 2. Los compuestos responsables de la actividad biológica de los diferentes tipos de propóleos (Bankova, 2005).	22
Cuadro 3. Fraccionamiento primario de la recolecta de Zacatecas.....	31
Cuadro 4. Fraccionamiento secundario de las aguas madre de la fracción F6. ...	33
Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción F.6.3.....	35
Cuadro 6. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- ¹ H del compuesto.....	40
Cuadro 7. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN- ¹ H del compuesto.....	44
Cuadro 8. CMI obtenida para el EEP de Zacatecas, para los diferentes microorganismos de prueba.....	50

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
$^1\text{O}_2$	Oxígeno Singulete
ABTS	2,2-azinobis-(ácido3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN _m	Ácido ribonucleico mensajero
C	Concentración
CCA	Cromatografía en columna abierta
ccf	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografía de líquidos
cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenasa
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
D	Doblete
Δ	Desplazamiento Químico
DE	Desviación Estándar
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EEP	Extracto etanólico
EtOH	Etanol
EM	Espectrometría de masas
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EV	Electrón-voltios
Exto	Extracto
FDA	Food and Drug Administration
Fx	Fracción

g	Gramos
HO•	Hidroxilo
IE	Impacto Electrónico
IL	Interleucinas
INH	Isoniazida
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda
L	Litro
μ	Micro
m	Metro
MeOH	Metanol
μg	Microgramos
mg	Miligramos
min	Minuto
μL	Microlitro
μmol	Micromol
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Masa
MHz	Megahertz
ND	Enfermedad de Newcastle
NF-k	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa
nm	Nanómetros
NO ⁺	Catión nitrosonio
NO ⁻	Anión nitrosilo
NO	Óxido nítrico
NP	Natural Products
OMS	Organización Mundial de la Salud
O ₂ • ⁻	Anión peróxido

PANC-1	Células cancerígena pancreática humana
ppm	Partes por millón
RIF	Rifampicina
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
s	Segundo
SOD	Superóxido dismutasa
t	Tiempo
TB	Tuberculosis
TNF	Factor de necrosis tumoral
TMS	Trimetilsilano
UHPLC-DAD-Qtof-MS	Cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño acoplado a un detector de arreglo de diodos y a un espectrofotómetro de masas de tiempo de vuelo
UV	Ultravioleta
VLC	Columna Líquida al vacío

1. Introducción

Durante el siglo pasado, un gran número de compuestos naturales han sido aislados a partir de animales, plantas, bacterias y microorganismos marinos. Estas investigaciones permitieron el descubrimiento de la penicilina (antibacteriano), morfina (analgésico), la artemisinina (malaria) y paclitaxel (cáncer).

Una revisión de productos naturales (NP) durante 30 años (1981-2010) reveló que aproximadamente el 40% de los agentes terapéuticos desarrollados aprobados por la FDA fueron NP's, sus derivados o miméticos sintéticos relacionados con ellos. A pesar de la creciente competencia de combinaciones y bibliotecas de compuestos clásicos, ha habido una introducción constante de medicamentos derivados de NP en los últimos años. Un total de 19 medicamentos fueron aprobados para su comercialización en todo el mundo entre 2005 y 2010, que cubren infecciones (bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales), inmunológicas, cardiovasculares, neurológicas, enfermedades inflamatorias y oncológicas (Chen et al., 2015).

Alimentos saludables que contienen productos naturales bioactivos se han utilizado desde la antigüedad para prevenir y tratar la enfermedad. La variedad estructural de metabolitos es una fuente en constante renovación de nuevas dianas farmacológicas. La ingesta de nuevos alimentos funcionales promueve la salud y acuñaron el término "nutracéuticos", que es una relación de la nutrición y la medicina (López et al., 2015).

Las abejas han existido por >125 millones de años y su éxito evolutivo ha permitido llegar a ser una especie perenne que se puede explotar prácticamente en todos los hábitats de la Tierra. El éxito ha residido en gran parte debido a la química y la aplicación de los productos específicos que fabrican las abejas: miel, cera de abejas, veneno, propóleo, polen y jalea real. A medida que el 'Arma química más importante de las abejas contra microorganismos patógenos, es el

propóleo y se ha utilizado como un remedio por el hombre desde la antigüedad (Bankova, 2005).

Una colonia de abejas recoge de 150-200 g de propóleo en un año; sin embargo, algunas razas recogen menor cantidad. La recolección de propóleo solo se conoce con las abejas europeas (*Apis mellifera*), el cual es una especie de abeja universalmente administrada por los apicultores, esta especie tiene varias subespecies o variedades regionales, como la abeja italiana (*Apis mellifera ligustica*), abeja Europea oscura (*Apis mellifera mellifera*) y la abeja de la miel Carniolan (*Apis mellifera carnica*). Curiosamente, las abejas tropicales (*Apis cerana*, *Apis florea* y *Apis dorsata*) y *Apis africana mellifera* no hacen uso del propóleo (Kuropatnicki et al., 2013).

El propóleo es un producto importante en la comunidad de abejas, que se utiliza para reforzar las paredes de la colmena, agujeros y grietas estrechas y reparar sus panales. Una capa de propóleo reduce el crecimiento microbiano en las paredes de las colmenas, así como para prevenir la entrada de agua y el viento (Simone-Finstrom et al., 2010).

En Europa y América del Norte estas resinas se recogen principalmente de árboles del tipo de álamo y la actividad antimicrobiana se debe principalmente a los flavonoides. En regiones tropicales estas especies de plantas no son nativas. Por lo tanto, las abejas (*Apis mellifera*), así como las abejas nativas sin aguijón (*Meliponini*), deben encontrar otras fuentes vegetales. Los estudios de muestras de propóleos de América del Sur de diferentes regiones han tratado de determinar su planta origen y composición química (Sawaya et al., 2004).

El propóleo brasileño es uno de los más estudiados y de mayor valor comercial en mundo, especialmente en el mercado japonés en el que aproximadamente 90% de propóleo consumido es importado de Brasil. Actualmente, se conocen aproximadamente 20.000 especies las abejas (Cardozo et al., 2015).

Es un material resinoso recolectado por las abejas (*Apis mellifera*) de diferentes exudados de plantas. Más de 300 compuestos químicos han sido identificados en el propóleo, entre ellos son: glicanos, flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres, ácido prenil-*p*-cumárico, y ketoenoles. Otros compuestos identificados son los lignanos, ácidos di- y triterpénicos, ácidos cafeoilquínico, monoterpenos, sesquiterpenos, isoflavonoides, chalconas y terocarpanos. El propóleo tiene un amplio espectro de actividades biológicas tales como anti-inflamatorio, antiproliferativo, antimicrobianos, antioxidantes y antiparasitaria, entre otros. Anteriormente, han demostrado que el propóleo de Sonora posee una fuerte actividad antiproliferativa contra diferentes líneas celulares de cáncer. También se ha demostrado que la composición química de los propóleos puede variar durante las diferentes estaciones del año, lo que podría modificar sus actividades biológicas (Alday-Provencio et al., 2015).

Los flavonoides son de origen natural polifenoles fitoquímicos que son ubicuas en las plantas y forman parte de varias clases, incluyendo flavanoles, flavanos y flavonas. Han demostrado poseer propiedades anticancerígenas y quimiopreventivo en numerosos estudios epidemiológicos. La crisina (5,7-dihidroxi-flavona) es una flavona natural que se encuentra en muchos extractos de plantas, incluyendo azul pasiflora (*Passiflora caerulea*), miel y propóleo, que tienen un alto valor económico e importancia medicinal. Reportes de la literatura han demostrado que la crisina posee múltiples actividades biológicas, tales como antioxidantes, anti-inflamatorias, antibacterianas, antihipertensivas, anti-alérgica, vasodilatadora, antidiabético, ansiolíticos, antivirales, anti-estrogénica, hepatoprotector, anti-envejecimiento, anticonvulsivos y efectos anticancerígenos (Kasala et al., 2015).

El propóleo es un remedio natural que ha mantenido su popularidad durante un largo periodo de tiempo. Las moléculas farmacológicamente activas son los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres. Por otra parte ha demostrado disminuir

la presión arterial y los niveles de colesterol. Sin embargo, se requieren estudios clínicos y corroborar estas afirmaciones (Castaldo et al., 2002).

Por estas razones el propóleo, se ha utilizado como un remedio en la medicina popular, en la apiterapia, como constituyente de biocosméticos, la salud, alimentos y en numerosos fines (Bankova et al, 2001; Banskota et al., 2000).

En las zonas templadas de Arizona a Mongolia e incluso en Nueva Zelanda los propóleos se originan a partir de los brotes y exudados de las especies del tipo álamo, así estos propóleos de estas regiones contienen los compuestos fenólicos, principalmente agliconas, flavonoides y ácidos aromáticos de ésteres los cuales son típicos brotes del álamo.

En las regiones tropicales no hay álamos, sin embargo las abejas obviamente recogen los propóleos de nuevas fuentes botánicas variando su composición química y haciéndola diferente a la zona templada esta propuesta está de acuerdo con los datos publicados por ejemplo de los propóleos de Brasil y Venezuela. Por esta razón, es interesante investigar la composición química del propóleo de regiones tropicales así como de regiones áridas o semiáridas (Banokova et al., 1997).

En este marco de referencia Hernández y colaboradores (2007) estudiaron tres propóleos del estado de Sonora, México. En esta investigación, los autores identificaron y cuantificaron a la pinocembrina, la crisina y la 3-O-acetil pinobanksina como los metabolitos secundarios mayoritarios en los propóleos estudiados. Los mismos autores describen las propiedades antiproliferativas sobre líneas celulares de cáncer de los extractos y la identificación de 11 flavonoides (entre ellos la galangina, el xantomicrol, la rutina, la naringenina, la hesperetina y la acacetina) y del éster fenil etílico del ácido cafeico (CAPE) utilizando HPLC-MS (Hernandez et al., 2007).

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas sobre propóleos colectados en diferentes países con climas templados y tropicales existe un número limitado de publicaciones sobre la composición química y la actividad biológica de propóleos provenientes de regiones áridas o semiáridas del continente americano.

2. Antecedentes

2.1. Definición de propóleo

El propóleo es un producto resinoso de la colmena que es producido por las abejas europeas (*Apis mellifera*) a partir de la recolecta de resinas de los brotes de los árboles y exudados de plantas, las cuales son mezcladas con cera secretada y pequeñas cantidades de azúcares. El producto tiene un olor agradable y colores que varían del amarillo a marrón oscuro, según la fuente botánica y su edad (Toreti et al., 2013; Papotti et al., 2012; Bankova, 2005 inter alia).



Figura 1. Abeja (*Apis mellifera*) recolectando resinas en un tronco.

2.2. Tipos de propóleo

Los diferentes tipos de propóleos que se conoce son los siguientes:

- i. El tipo de álamo (*Populus spp.* es originario principalmente de Europa, las regiones no tropicales de Asia, Nueva Zelanda y América del Norte),
- ii. El tipo de abedul (*Betula verrucosa* que se deriva de Rusia),
- iii. Tipo verde (*Baccharis spp.* característico de Brasil)
- iv. Tipo rojo (*Dalbergia spp.* que se encuentra en Brasil, México y Cuba),
- v. Tipo de *Clusia* (*Clusia spp.* de Cuba y Venezuela)
- vi. El tipo del Pacífico (*Maracanga tanarius* originario de Indonesia, Taiwán y Prefectura de Okinawa)

- vii. Las más recientes, de tipo mediterráneo (plantas, principalmente de la familia *Cupressaceae*, ubicado en Grecia, Sicilia y Malta).



Figura 2. Distribución geográfica de los tipos de propóleo.

Las resinas contienen compuestos fenólicos y terpenoides, no se le han descrito alcaloides, glucosinolatos ó glucósidos cianogénicos. La composición típica de los propóleos de zonas templadas consiste en flavonoides y ácidos fenólicos, mientras que los provenientes de zonas tropicales contiene fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoilquínicos (Salatino et al., 2011).

2.3. Historia

La palabra propóleo proviene (del griego pro = en defensa o para, y polis = ciudad) traduciéndose como defensa de la ciudad lo cual refleja su importancia para las abejas, ya que lo utilizan para suavizar paredes internas, proteger la colonia de enfermedades y para cubrir los cadáveres de los intrusos que murieron dentro de la colmena, evitando su descomposición (Bankova et al., 2000).

Es un remedio natural que se ha utilizado ampliamente desde la antigüedad. Los egipcios conocían muy bien las propiedades anti-putrefacción de propóleos y era utilizado para embalsamar cadáveres. Fue reconocido por sus propiedades

medicinales por los médicos griegos y romanos, Aristóteles, Dioscórides, Plinio y Galeno.

Se emplea como antiséptico y cicatrizante en el tratamiento de heridas y como desinfectante en úlceras bucales, estos usos se perpetúan desde la Edad Media y entre los médicos árabes. El propóleo también fue reconocido por otros pueblos que no están relacionados con civilizaciones del Viejo Mundo: los Incas lo empleaban como un agente antipirético y en las farmacopeas londinenses del siglo XVII es enumerado como una droga oficial. Entre los siglos XVII y XX, se hizo muy popular en Europa a causa de su actividad anti-bacteriana (Sforcin et al., 2011; Castaldo et al., 2002).

2.4. Composición química

De manera general, la literatura señala que los propóleos están constituido en su mayor parte por bálsamos y resinas (50-55%), ceras (30-40%), aceites esenciales (5-10%), polen (5%) y minerales (5%).

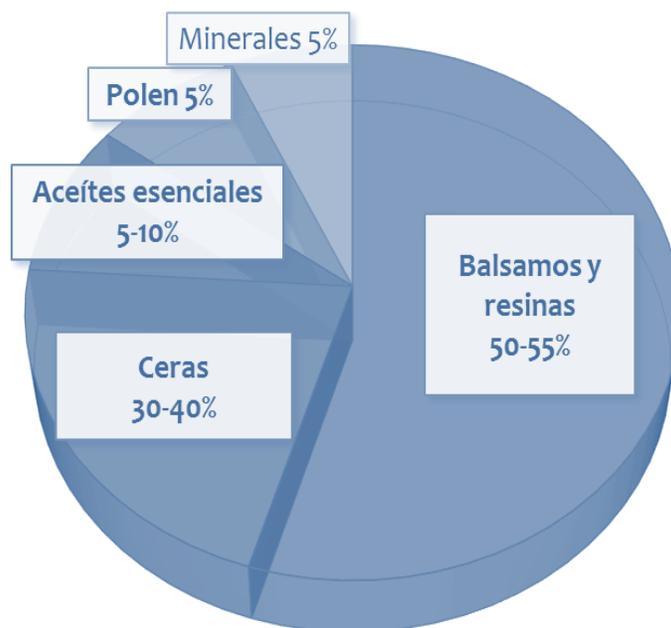


Figura 3. Composición general de los propóleos.

Los estudios químicos realizados con diferentes lotes de propóleos han permitido concluir que su composición química varía dependiendo de la flora local y del clima de la zona de colecta (Salatino et al., 2011; Ahn et al., 2007; Bankova et al., 2007; inter alia). Los compuestos aislados principalmente flavonoides se caracterizaron en flavanonas, flavonoles, isoflavonas, chalconas, auronol, terocarpanos, 2-arilbenzofuranos, neoflavonoides y lignanos.

Cuadro 1. Compuestos identificados en resinas de propóleo (Massaro et al., 2015; Marcucci, 1995).

Estructura Básica	Compuestos
Ácidos alifáticos y ésteres alifáticos	Ácido acético, ácido butírico, ácido fumárico, ácido isobutírico, ácido metilbutírico, acetato de isobutilo, acetato de isopentilo, acetato de isopentenilo
Ácidos aromáticos	Ácido benzoico, ácido gálico, ácido hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido salicílico, ácido isoferúlico, ácido 4-metoxicinámico
Ácidos grasos	Ácido oleico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido láurico, ácido esteárico
Ácidos fenólicos y Ésteres	Ácido caféico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, bencilcafeato, ácido 4-metoxicinámico, cinamilcafeato, feniletil éster del ácido caféico (CAPE)
Alcoholes	Glicerol, α -glicerofosfato, hidroquinona, isobutanol, alcohol prenilado
Aldehídos	Benzaldehído, aldehído caproico, <i>p</i> -hidrobenzaldehído, isovainilina, vainilina
Aminoácidos	Lisina, cisteína, ácido glutámico, alanina, β -alanina, ácido α -amino butírico, asparagina, ácido aspártico, hidroxiprolina, ornitina, arginina, glicina, metionina, histidina, isoleucina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina

Azúcares	D-fructosa, maltosa, <i>D</i> -manopiranososa, sacarosa, fructofuranosa, 2-fructofuranosa, α - <i>D</i> -glucopiranososa, β - <i>D</i> -glucopiranososa
Benzofenonas preniladas	Nemorosona, propolona D
Cetonas	Acetofenona, <i>p</i> -acetofenona, dihidroxi-acetofenona, metilacetofenona, hept-5-en-2-ona, 6-metilacetofenona.
Chalconas y dihidrochalconas	Alpinetina chalcona, naringenina chalcona, pinobanksina chalcona, 3-acetato-pinobanksina, pinocembrina chalcona, pinostrobina chalcona, 2,6-dihidroxi-4-metoxidihidrochalcona, 2,4,6-trihidroxidihidrochalcona
Esteroides	Calinasterol acetato, β -dihidroxicolesterol acetato
Flavonoides Flavanonas	Naringenina, pinobanksina, pinocembrina, pinostrobina, 3,7-dihidroxi-5-metoxiflavanona, 3-pentenoato de pinobanksina, 2,5-dihidroxi-7-metoxiflavanona.
Flavonas flavonoles	Crisina, 5-O-metilcrisina, apigenina, acacetina, luteolina, galangina, 7-O-metilgalangina, quercetina, isorhamnetina, rhamnocitrina, campferol, ramnetina, tectocrisina, camferida
Flavanonoles	Pinobanksina, pinobanksina-3-O-acetil, alpinona
Isoflavonoides	Genisteína
Lignano	Sesamina, dímero del alcohol coniferílico.
Terpenoides	Diterpenos: ácido isocuprésico Monoterpenos: terpineol, artemisinina C Sesquiterpenos: farnesol, cariofileno, Triterpenos: β -amirina

2.2 Actividad biológica y farmacológica

El propóleo presenta diversas propiedades biológicas y farmacológicas, tales como inmunomoduladora, antitumoral, antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral, antifúngica, actividad antiparasitaria, entre otras (Búfalo et al., 2009b, 2009c; Freitas et al., 2006; Gekker et al., 2005; inter alia).

El propóleo se considera responsable de la baja incidencia de bacterias y mohos dentro de la colmena. La acción contra los microorganismos es una característica esencial del propóleo utilizado durante siglos por sus propiedades farmacéuticas por los seres humanos (Bankova et al., 2000).

Además de sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, el propóleo presenta muchas otras actividades biológicas benéficas tales como antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, hepatoprotector, anestésico local, inmunoestimulante, anti-mutagénico, etc. (Castaldo et al., 2002; Banskota et al., 2001).

2.2.1. Actividad antibacteriana

Las propiedades anti-microbianas del propóleo se atribuyen principalmente a los flavonoides: pinocembrina, galangina y pinobanksina. La pinocembrina posee también propiedades anti-fúngicas.

Se muestra actividad antimicrobiana “*in vitro*” principalmente contra Gram-positivas (*Staphylococcus* y *Streptococcus spp.*) y Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *aeruginosa*), *Helicobacter pylori*, protozoos (*T. cruzi*), hongos (*Candida albicans*) y los virus (VIH, herpes, virus de la gripe) (Castaldo, et al., 2002).

2.2.2. Actividad anti-fúngica

Se evaluaron los productos de abejas (miel, jalea real, polen propóleo) por su capacidad para inhibir el crecimiento de 40 cepas de levaduras de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Trichosporon spp.*

Las actividades antifúngicas de cada producto disminuyeron en el siguiente orden: propóleo> polen> jalea real>> miel. Este estudio demostró que los productos de abejas, en particular los propóleos y polen, pueden ayudar a controlar algunas cepas de hongos resistentes a fluconazol (Koc et al., 2011).

En diversos artículos se habla que la identificación de algunos de estos compuestos se realizó por diferentes métodos cromatográficos, así como la comparación de los métodos microbiológicos comúnmente utilizados para evaluar la actividad de los propóleos contra la levadura *Candida spp.*

2.2.3. Actividad antiparasitaria y antiprotozoaria

La leishmaniasis es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las principales enfermedades causadas por un protozoo (Murray et al., 2005). Es un grupo de enfermedades infecciosas causadas por parásitos protozoarios que pertenecen al género *Leishmania* y se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos hembra infectados. En América, el vector es el mosquito *Lutzomyia*, y en Europa, el género *Phlebotomus* (Subfamilia *Phlebotominae*). Leishmaniasis, es una significativa causa de morbilidad y mortalidad en varios países y es un problema de salud creciente en muchas partes del mundo, que afecta a personas en 88 países con aproximadamente 350 millones de personas que viven en zonas de endemicidad de la enfermedad (Duran et al., 2011).

Como se describe en la literatura, algunos compuestos biológicamente activos del propóleo puede desempeñar un papel importante para esta actividad contra la leishmania (Durán et al., 2008;. Pontin et al., 2008; Ayres et al., 2007; Machado et

al., 2007). Se demostró que muestras de propóleo eran bastante eficaces contra *L. tropica* y *L. infantum*. Las composiciones químicas de muestras de propóleos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-MS).

El presente estudio hizo hincapié en que los extractos etanólicos de los dos tipos de propóleo turcos redujeron la proliferación de *L. Infantum* y *L. tropica* promastigotes *in vitro*. Se piensa que los compuestos aromáticos tales como ésteres de ácidos aromáticos, flavanoles y ésteres del ácido cinámico pueden ser los responsables de los efectos antileishmanial en este tipo de propóleo (Duran et al., 2011).

El protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, una parasitosis endémica de América Latina que ha infectado a 16-18 millones de personas. Esta enfermedad se caracteriza por una fase aguda con detectable parasitemia y una fase asintomática de larga duración. El desarrollo de fármacos alternativos para reemplazar el nifurtimox y benznidazol, actualmente utilizado para el tratamiento de pacientes chagásicos, es urgente. En este contexto, la investigación de nuevos agentes naturales y sintéticos, extractos de propóleo presentan baja toxicidad para los animales de experimentación (Dastas et al., 2006). En relación con patógenos protozoos, extractos de etanol mostraron actividad con *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas spp.*, *Giardia lamblia* y *Trypanosoma cruzi* (Starzyk et al., 1977; Torres et al., 1990; Marcucci et al., 2001; Cunha et al., 2004).

2.2.4. Actividad antiviral

En cuanto a la actividad antiviral, el propóleo puede afectar a la reproducción del virus de la gripe (Shevchenko et al., 1972), virus de la gripe A y B, virus vaccinia y NDV (Esanu et al., 1981, Maximova-Todorova et al., 1985), y de herpes aviar (König et al., 1985, 1988). Una crema antiherpes (Sosnowski, 1983), es un ungüento contra el herpes zóster (Popescu et al., 1985) y un fármaco cutáneo también ha sido descrito (Giurcocaneanu et al., 1988).

2.2.5. Actividad anticancerígena

Recientemente, el propóleo ha sido un tema de ardua investigación por su actividad contra el cáncer en humanos; una serie de compuestos que poseen la actividad anticancerígena se han registrado en el propóleos.

Estudios previos en el propóleo rojo brasileñas mostró interesante citotoxicidad preferencial contra PANC-1 célula cancerígena pancreática humana. Compuestos como la 7-hidroxi-6 metoxiflavanona y mucronulatol aislados del mismo propóleo ha demostrado que posee una potente citotoxicidad contra el panel de seis líneas celulares de cáncer. Estas evidencias sugieren que el efecto beneficioso de propóleos y sus constituyentes en la salud humana. Por lo tanto, ha habido un creciente interés en el estudio de los componentes de propóleos en diferentes partes del mundo (Athikomkulchai et al., 2013; Çikrikci et al., 2008).

2.2.6. Actividad antitumoral

Las propiedades biológicas de propóleos son una consecuencia de los productos derivados de las plantas, ya que su composición es originada a partir de exudados de plantas. De acuerdo con datos de la literatura, en Brasil, la fuente vegetal más importante es *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*).

Algunos autores han señalado que las actividades biológicas de propóleos brasileños verdes se deben principalmente a los altos niveles de ácidos *p*-cumárico prenilados, principalmente Artepillina C (ácidos 3,5-diprenil-*p*-cumárico),

que también está presente en *B. dracunculifolia*, muestra propiedades biológicas importantes, tales como antitumoral, inductor de la apoptosis, inmunomodulador y antioxidante. El efecto antioxidante debe estar relacionado con su actividad de quimioprevención, en las condiciones experimentales, estos resultados indican que el efecto protector del extracto de propóleo verde brasileño con la actividad de antigenotoxicidad (Francielli de Oliveira et al., 2013).

2.2.7. Actividad antiinflamatoria y antioxidante

Adicionalmente, muestras de propóleos chinos mostraron ser ricos en compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides teniendo actividades antioxidante, medido como reducción de la potencia, la inhibición de blanqueo β -caroteno y la capacidad en contra del radical DPPH, así como el ensayo del radical (ABTS). Recientemente, se aislaron 5 nuevos ésteres de glicerol los cuales mostraron actividades antiinflamatorias significativas sobre la interleucina (IL) -1 β , IL-6 y la ciclooxigenasa (COX) -2 expresiones de ARNm, también muestran una propiedad antioxidante aún más fuerte que la vitamina E y C (Basnet et al., 1997) que podría ser el protector humano desde procesos oxidativos nocivos. Ha sido documentado que, la eliminación de radicales libres efectos se han atribuido a los flavonoides contenido en el propóleo (Isla et al., 2001).

Actualmente, existe poca información relacionada a la capacidad de neutralización del radical hidroxilo (HO^\bullet) o anión peróxido (O_2^\bullet) por los extractos etanólicos de propóleo (Shi et al., 2012).

La mayoría de los compuestos aislados a partir de propóleos incluyen los compuestos fenólicos con efecto protector importante contra las reacciones de oxidación, tales como los que tienen agentes regulares como BHT e hidroquinona. Flavonas, cumarinas, y muchos otros compuestos fenólicos han reducido la actividad, de donadores de hidrógeno y propiedades quelantes de metales. También se utilizan como radicales desactivadores en soluciones orgánicas y fluidos biológicos (Parr y Bolwell., 2000; Çikrikci et al., 2008).

2.2.8. Estrés oxidativo

Estudios previamente publicados han informado que, el estrés oxidativo está mediado por muchos mecanismos patológicos. Muchas enfermedades están asociadas al estrés oxidativo y están acompañadas por un aumento del daño al ADN en general (Speina et al., 2005). Esto es causado por un desequilibrio entre la captación del sistema de órganos y excesiva producción de moléculas altamente reactivas que puede causar una amplia gama de anomalías y enfermedades (enfermedades sistémicas, vasculopatía, trastornos metabólicos) (Napoli et al., 2001).

Okonenko (1986) informó que continúa la administración de los propóleos estabiliza lípidos de peroxidación, sugirió que pudiera ser utilizado como un medicamento. (Mollaoglu et al., 2006) documentaron que las propiedades antioxidantes del propóleo protege contra la hipertensión inducida por cadmio y cardiomiopatía en roedores.

Se encontró que la pinocembrina, tiene una acción protectora sobre la estructura del cerebro y la función mitocondrial, podría mejorar deterioros cognitivos inducidos por hipoperfusión cerebral crónica en ratas (Guang y Du, 2006).

2.2.9. Actividad hepatoprotectora

La tuberculosis (TB) es un problema de salud mundial más importante desde hace algunos años. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) informes globales de tuberculosis, a nivel mundial hay más de 9 millones las personas que desarrollan TB cada año y la India se ha clasificado en el lugar 8 entre los 22 países de alta carga (Who, 2013).

Rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) son los fármacos de primera línea que se utilizan en la quimioprofilaxis y la gestión de TB (Tasduq et al., 2007), informes publicados anteriormente sugieren que la INH y RIF tienen potencial de toxicidad hepática. La toxicidad hepática y hepatitis se presume ha aumentado debido al

sinérgico de muchos medicamentos incluyendo RIF y el abuso de alcohol, esto se ve reflejado en el aumento del nivel de los marcadores de enzimas hepáticas (aspartato transaminasa y alanina transaminasa en suero), provocando hepatitis fatal, bilirrubinemia, bilirrubinuria e ictericia.

El presente estudio, mostró un efecto de protección contra INH y RIF-inducida por daño hepatocelular mediante la inhibición de estrés oxidativo, observando la disminución de la expresión de COX-2 y NF- κ en roedores. La capacidad hepatoprotectora se le atribuye a la eliminación de radicales libres y antioxidantes que resultan de la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en el extracto etanólico de propóleo mediante un análisis por cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño acoplado a un detector de arreglo de diodos y a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (UHPLC-DAD-Qtof-MS) (Wali et al., 2015).

2.2.10. Usos y aplicaciones

El propóleo posee propiedades antisépticas, bactericidas, antimicóticas, astringentes, antiespasmódicas, anti-inflamatorias, anestésicas, antioxidantes antitumorales, antifúngicas, antiulcerosas, anticancerígenas y efectos inmunomoduladores. Se ha utilizado en una variedad de aplicaciones, que incluyen ungüentos y cremas utilizado en la curación de heridas, tratamiento de quemaduras, problemas de la piel y úlceras. Diversas preparaciones de propóleos se han aplicado en el tratamiento de laringología, enfermedades ginecológicas, asma y diabetes (Figura 4). Se ha utilizado en preparaciones de pasta de dientes y enjuague bucal para el tratamiento de la gingivitis y estomatitis.

Las propiedades antivirales del propóleo se conocen desde hace muchos años, en estudios sobre infección por el virus del Herpes simple, in vitro: 0,5% de extracto de propóleo causó 50% la inhibición de la infección por HSV, mientras que in vivo: aproximadamente 5% previene la aparición y el desarrollo de síntomas de la

infección por VHS-1 en animales, también los estudios en la aplicación de propóleos en la infección por herpes genital (HSV tipo 2) (Kuropatnicki et al, 2013).

La caries dental es una enfermedad infecciosa causada por bacterias patógenas en la cavidad bucal. *Streptococcus mutans* es uno de los microorganismos más cariogénicos que está implicado en el desarrollo de la caries dental y la placa dental en humanos.

La biopelícula estimula la agregación de bacteria en la superficie del diente y es el factor principal que causa la caries dental, por lo que la prevención y la eliminación en la superficie del diente es importante para evitar su desarrollo.

Existen diversos productos para el cuidado de la cavidad oral, tales como pasta dental, gomas o enjuagues bucales que pueden reducir el riesgo de infectarse. Muchos productos contienen agentes químicos, tales como clorhexidina, triclosán, o fluoruro de sodio que son eficaces agentes antibacterianos y antiplaca en la cavidad oral.

Desafortunadamente, el uso diario de sustancias químicas puede causar efectos locales secundarios o irritación de la mucosa oral. En los últimos años, muchos estudios se han realizado acerca de los productos naturales y se recomiendan para controlar la caries debido a sus propiedades antibacterianas y efectos secundarios limitados. El propóleo es uno de los materiales naturales que se pueden utilizar en productos de cuidado oral que tiene dichas propiedades. Hay muchos productos que contienen extracto de propóleo en el mercado, semejantes al extracto de etanol, pastas de dientes y enjuagues bucales (Asawahame et al., 2014).



Figura 4. Productos derivados de miel y propóleo. Fotografía del mercado Municipal de Tuxpan, México Veracruz, tomada por Silva Rivera Violeta Andrea.

2.2.11. Recolección del propóleo

La cantidad de propóleo que produce una colmena dependerá de la raza de la abeja y de su ubicación. Se ha observado que las colmenas emplazadas en bosques o en áreas cercanas a los ríos con la vegetación abundante contienen más propóleos que las situadas en las zonas llanas. Las abejas propolizan durante todo el año, sin embargo, se ha observado que durante el final del verano y el otoño la propolización es mayor, de ahí que el apicultor deba recolectar el propóleo antes del invierno (González, 2002). Para la recolección del propóleo se utilizan los métodos especializados que se describen a continuación:

2.2.11.1 Raspado

El propóleo se recoge en bruto de la colmena raspando las paredes con una espátula. También se utilizan rejillas especiales que al introducirse en la colmena, las abejas obreras propolizan. Posteriormente, se extrae y se retira el propóleo. Es un método que resulta bastante engorroso e inconveniente, pues las valiosas propiedades de este producto pueden ser disminuidas (Figura 5).



Figura 5. Método del raspado con espátula de acero inoxidable.

2.2.11.2 Rejillas

Se colocan debajo de la tapa de la colmena; consisten en una lámina plástica o metálica que contiene ranuras, las cuales son rellenas con propóleo por las abejas, lo que permite su fácil retirada y recolección. Posteriormente, se congelan y una simple presión sobre ellas permite que el propóleo se desprenda fácilmente.

Las rejillas plásticas son del tamaño y apariencia de un excluidor de reinas, pero con agujeros más pequeños para impedir el paso de una abeja. Se sitúan en la parte alta de la colmena en sustitución de la entretapa; al percibir la pérdida de calor que se produce en esta área. Las abejas propolizan rápidamente los agujeros. Para cosechar el propóleo, se colocan las placas en el congelador por 3 a 4 horas y luego se flexionan para desprender el producto como se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Placa plástica recolectora de propóleo.

2.2.11.3 Mallas

Este dispositivo puede ser de plástico o metal. El método consiste en cortar secciones de este material del tamaño de la superficie de la colmena, retirándolas y congelándolas. Muchos consideran que es más económica y más duradera, puesto que no se quiebra por los sucesivos cambios de temperatura y manipulación. Además, las superficies libres son mayores, por lo tanto, se recolecta más propóleo en cada extracción como se muestra en la Figura 7 (Reyna Garduño, 2013).



Figura 7. Abeja (*Apis mellifera*) relleno los huecos con propóleo.

Cuadro 2. Los compuestos responsables de la actividad biológica de los diferentes tipos de propóleos (Bankova, 2005).

Tipo de propóleo	Actividad antimicrobiana	Actividad antiinflamatoria	Actividad antitumoral	Actividad hepatoprotectora	Actividad antioxidante	Acción alergénica
Europa (tipo de álamos)	flavanonas, flavonas, ácidos fenólicos y sus esteres	flavononas, flavonas ácidos fenólicos y sus esteres	ácido cafeico, éster de feniletíl	ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cafeico, éster de fenilo	favonoides, fenoles y sus esteres	3,3-dimetilalilcafeato
Brasileño (tipo <i>Baccharis</i>)	ácido <i>p</i> -cumárico prenilado, diterpeno tipo landano	no identificada	ácido <i>p</i> -cumárico prenilado, diterpenos tipo clerodano, benzofuranos	ácido <i>p</i> -cumárico prenilado, flavonoides, lignanos, ácidos cafeoil quinicos	ácido <i>p</i> -cumárico prenilado, flavonoides	no probado
Cubano	benzofenonas preniladas	no probado	benzofenonas preniladas	no identificado	benzofenonas preniladas	no probado
Taiwanés	no probado	no probado	flavonas preniladas	no probado	flavonas preniladas	no probado

3. Justificación

La aparición de bacterias resistentes a antibióticos es uno de los problemas más preocupantes en la microbiología médica moderna. Hoy en día la amenaza latente planteada por infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos y a casi todas las clases conocidas de antibióticos, motiva la búsqueda de fuentes alternativas de compuestos activos que nos permitan hacer frente a esta situación.

Las bacterias Gram-negativas son las principales responsables de la adquisición de resistencia a los antibióticos. Esto se complica aún más por la escasez de nuevos antibióticos contra ellas, así como por el uso indiscriminado de antibióticos por parte de la población. Como resultado hay un número creciente de infecciones bacterianas de las cuales no existen opciones terapéuticas adecuadas.

Los productos derivados de la apicultura, como el propóleo, han sido empleados en la medicina tradicional de varias culturas de todo el mundo, incluyendo la mesoamericana. Estudios previos utilizando esta resina en países como Estados Unidos, Dinamarca y Filipinas han mostrado que los extractos de propóleos fueron capaces de inhibir *quorum sensing* (QS) en bacterias Gram-negativas (Gemiarto et al., 2015). Otros estudios han demostrado que es rico en compuestos fenólicos activos, los cuales poseen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatorias y actividades anticancerígenas (Goncalves et al., 2015).

El propóleo ha sido ampliamente comercializado por la industria farmacéutica como una medicina alternativa y como un alimento saludable en varias partes del mundo (Conti et al., 2015).

Es importante destacar que existe un número limitado de estudios conducentes a determinar la composición química y las propiedades farmacológicas de los propóleos químicos y farmacológicos que se producen en México. Por otra parte, se carece de una norma mexicana que establezca los criterios de calidad de los propóleos como son el contenido mínimo de fenoles y flavonoides totales

(compuestos responsables de la actividad biológica) y las impurezas físicas y químicas de los extractos que se utilizan en la elaboración de productos farmacéuticos y cosméticos. Por las razones antes mencionadas es importante realizar el análisis químico de los propóleos que se producen en las diferentes zonas melíferas de México.

4. Objetivo

4.1 Objetivo General

Aislar los compuestos mayoritarios del extracto etanólico de propóleo (EEP) preparado a partir de una muestra recolectada en la zona melífera del Norte de México en Zacatecas.

4.2 Objetivos Particulares

1. Recolectar una muestra de propóleo de la zona melífera del Norte de México (Zacatecas).
2. Preparar el extracto etanólico a partir de la muestra recolectada.
3. Realizar fraccionamiento primario y secundario del EEP.
4. Aislar y purificar los componentes mayoritarios presentes en las fracciones estudiadas.
5. Caracterizar los compuestos puros utilizando resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM).
6. Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides totales del extracto etanólico.
7. Evaluar el potencial antioxidante del extracto etanólico utilizando el ensayo de decoloración del radical DPPH.
8. Determinar el efecto sobre el crecimiento de las bacterias *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.

5. Desarrollo Experimental

5.1. Recolección del propóleo

El propóleo fue recolectado en un apiario fijo por el técnico agropecuario Vicente González Chávez en enero de 2016, en la frontera Ictera de Víctor Rosales y Fresnillo en el Estado de Zacatecas (entre los paralelos 22° 51' y 23° 36' de latitud norte; los meridianos 102° 29' y 103° 32' de longitud oeste) con un promedio de 300-700 mm de lluvia, una altitud de entre 1 900 y 2 900 m. y una temperatura media anual de 12-18° C.

El clima es semiseco templado con lluvias en verano (91.6 %), templado subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad (8.3 %) y seco templado con lluvias en verano (0.1 %), (INEGI, 2009), la flora predominante en el lugar de recolección fue mezquite, huizache, eucalipto, pirul y álamo.



Figura 8. Localización de Fresnillo, Zacatecas.

5.2 Procedimientos Generales de Análisis

5.2.1 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 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) y DPPH.

5.2.2 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Los espectros de masas fueron generados por la técnica de Impacto electromagnético (EM/IE) se determinaron en un Thermo Electron modelo DFS (Double Focus Sector), introducción directa a 70 eV.

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

5.3 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 absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 700 nm.

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración 5-100 µg/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.

5.4 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 10 µL de la muestra más 90 µL de Etanol y 100 µL de una solución etanólica de AlCl₃ al 2 %. Se incubó la mezcla de reacción por 15 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 420 nm. Se realizó una curva de calibración de quercetina en un rango de concentración 1-125 µg/mL con la finalidad de expresar los resultados en equivalentes de quercetina (mg de equivalentes de quercetina/g de muestra). Cada determinación, tanto del extracto de propóleo como la curva de calibración, se realizó por triplicado y de manera independiente.

5.5 Evaluación de la actividad antioxidante

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

5.5.1 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, 10 µL de la muestra diluida en etanol y 90 µL de metanol. Se midió la absorbancia al cabo de 20 minutos en un espectrofotómetro a 517 nm.

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

5.6.1 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.

5.6.2 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 absorbancia con valor de 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.

5.6.3 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 absorbancia a 0.05.

5.7 Estudio Químico

5.7.1 Preparación del Extracto etanólico

Propóleo. El material que se empleará en este estudio se recolectó en el Estado de Zacatecas. Una muestra de referencia se conserva a -80° C en el laboratorio 111.

5.7.2 Fraccionamiento primario del EEP

5.7.2.1 Extracción y fraccionamiento primario del extracto etanólico del propóleo (EEP).

Se realizó la extracción de 232.0 g de propóleo en “bruto” utilizando el método de maceración y etanol como disolvente. Este proceso se repitió tres veces utilizando las mismas condiciones de extracción. Posteriormente, los extractos se concentraron a presión reducida y se combinaron para obtener 115.0 g de extracto etanólico (EEP).

El EEP se sometió a un fraccionamiento primario en una columna abierta utilizando gel de sílice como adsorbente y como eluyentes mezclas de diclorometano-acetona (100:0 a 0:100). Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina y se combinaron de acuerdo a su similitud cromatográfica en seis fracciones combinadas (F1-F6). El Cuadro 3 y la Figura 9 se resume el fraccionamiento primario del EEP.

Cuadro 3. Fraccionamiento primario de la recolecta de Zacatecas.

Fracción	Disolvente	Proporción (%)	Fracciones	Clave
F-I	hexano	100	1-4	F1
F-II	hexano- diclorometano	50:50	5-8	F2
F-III	diclorometano	100	9-12	F2
F-IV	diclorometano- acetona	99:1	13-16	F3
F-V	diclorometano- acetona	98:2	17-18	F4
F-VI	diclorometano- acetona	98:2	19-24	F5
F-VII	diclorometano- acetona	95:5	25-30	F6
F-VIII	diclorometano- acetona	90:10	31-32	F6
F-IX	diclorometano- acetona	85:15	33-39	F6
F-X	diclorometano- acetona	70:30	40-46	F6
F-XI	diclorometano- acetona	50:50	47-52	F6
F-XII	acetona	100	53-56	F6

5.7.3 Fraccionamiento secundario del EEP y purificación de compuestos.

A partir de la fracción F4 precipitó de manera espontánea un sólido de color amarillo, el cuál fue separado de las aguas madres por filtración. El polvo obtenido se recrystalizó de diclorometano-acetona (98:2). El producto obtenido se comparó con estándares de flavonoides que se poseen en el laboratorio y se identificó de forma preliminar como la pinocembrina (1). Posteriormente, se envió a RMN y EM para su identificación final.

La fracción primaria F6 se sometió a un proceso de cristalización y sus aguas madres (19.7g) fueron sometidas a un fraccionamiento secundario utilizando una columna a presión reducida (VLC), gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas en gradiente de polaridad de diclorometano-acetona (100:0 a 0:100). Este proceso permitió la obtención de 56 fracciones secundarias las cuales fueron agrupadas por similitud cromatográfica en 13 fracciones combinadas. El Cuadro 4 muestra el fraccionamiento secundario de las aguas madre de la fracción F6.

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario de las aguas madre de la fracción F6.

Fracción	Disolvente	Proporción (%)	Fracciones
F.6.1	diclorometano	100	1-4
F.6.2	diclorometano- acetona	98:2	5-8
F.6.2.1	diclorometano- acetona	98:2	9-11
F.6.3	diclorometano- acetona	95:5	12-15
F.6.4	diclorometano- acetona	90:10	16-18
F.6.4.1	diclorometano- acetona	90:10	19-23
F.6.4.2	diclorometano- acetona	90:10	24-30
F.6.4.3	diclorometano- acetona	90:10	31-32
F.6.5	diclorometano- acetona	80:20	33-37
F.6.5.1	diclorometano- acetona	80:20	38-44
F.6.6	diclorometano- acetona	70:30	45-49
F.6.7	diclorometano- acetona	50:50	50-53
F.6.8	acetona	100	54-56

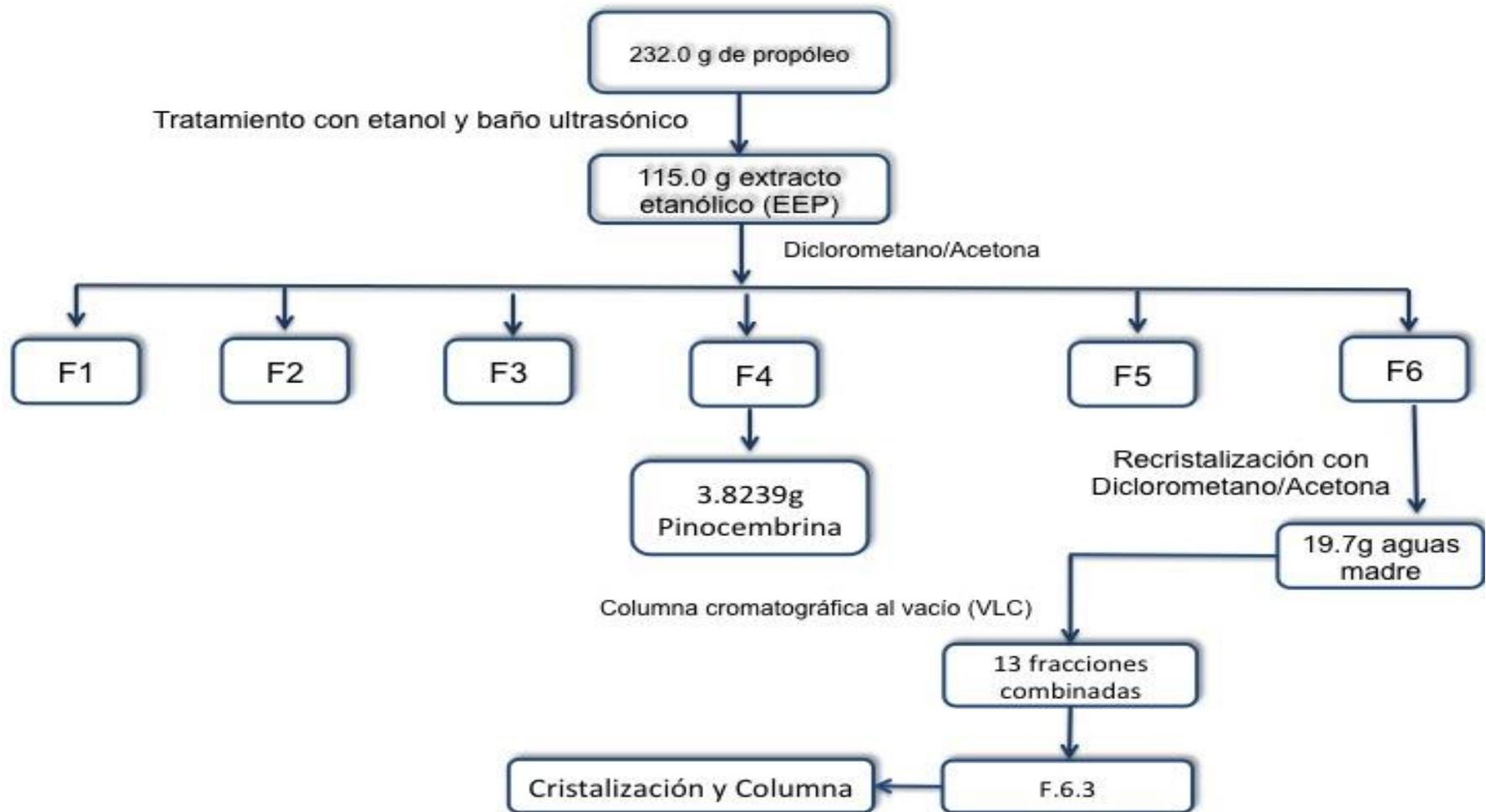
La fracción F.6.3 se recromatografió una columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice y como eluyentes mezclas de diclorometano-acetona (100:0 a 0:100). A partir de este proceso se obtuvieron 11 fracciones las cuales se combinaron de acuerdo a su similitud cromatográfica en cinco fracciones combinadas (F6.3.I-F.6.3.V). En el Cuadro 5 se muestra el fraccionamiento secundario de la fracción F.6.3.

A partir de la fracción F.6.3 precipitó un sólido de color amarillo que se cristalizó de diclorometano-acetona (95:5) y se denominó como ZAC2-C03. Este sólido se trató de resolver utilizando cromatografía en capa fina y columnas sucesivas de gel de sílice y Sephadex LH-20. Sin embargo, no se logró separar los componentes (Figura 10) y la mezcla se caracterizó mediante RMN como la alpinetina (**2**) y 5-O-metoxipinobanksina (**3**).

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción F.6.3.

Fracción	Disolvente	Proporción (%)	Fracciones
F.6.3.I	diclorometano- acetona	95:5	F.6.3.I
F.6.3.II	diclorometano- acetona	95:5	F.6.3.I
F.6.3.III	diclorometano- acetona	95:5	F.6.3.II
F.6.3.IV	diclorometano- acetona	95:5	F.6.3.III
F.6.3.V	diclorometano- acetona	95:5	F.6.3.III
F.6.3.VI	diclorometano- acetona	90:10	F.6.3.III
F.6.3.VII	diclorometano- acetona	90:10	F.6.3.IV
F.6.3.VIII	diclorometano- acetona	80:20	F.6.3.IV
F.6.3.IX	diclorometano- acetona	80:20	F.6.3.IV
F.6.3.X	diclorometano- acetona	70:30	F.6.3.IV
F.6.3.XI	diclorometano- acetona	70:30	F.6.3.V

Figura 9. Desarrollo experimental parte 1.



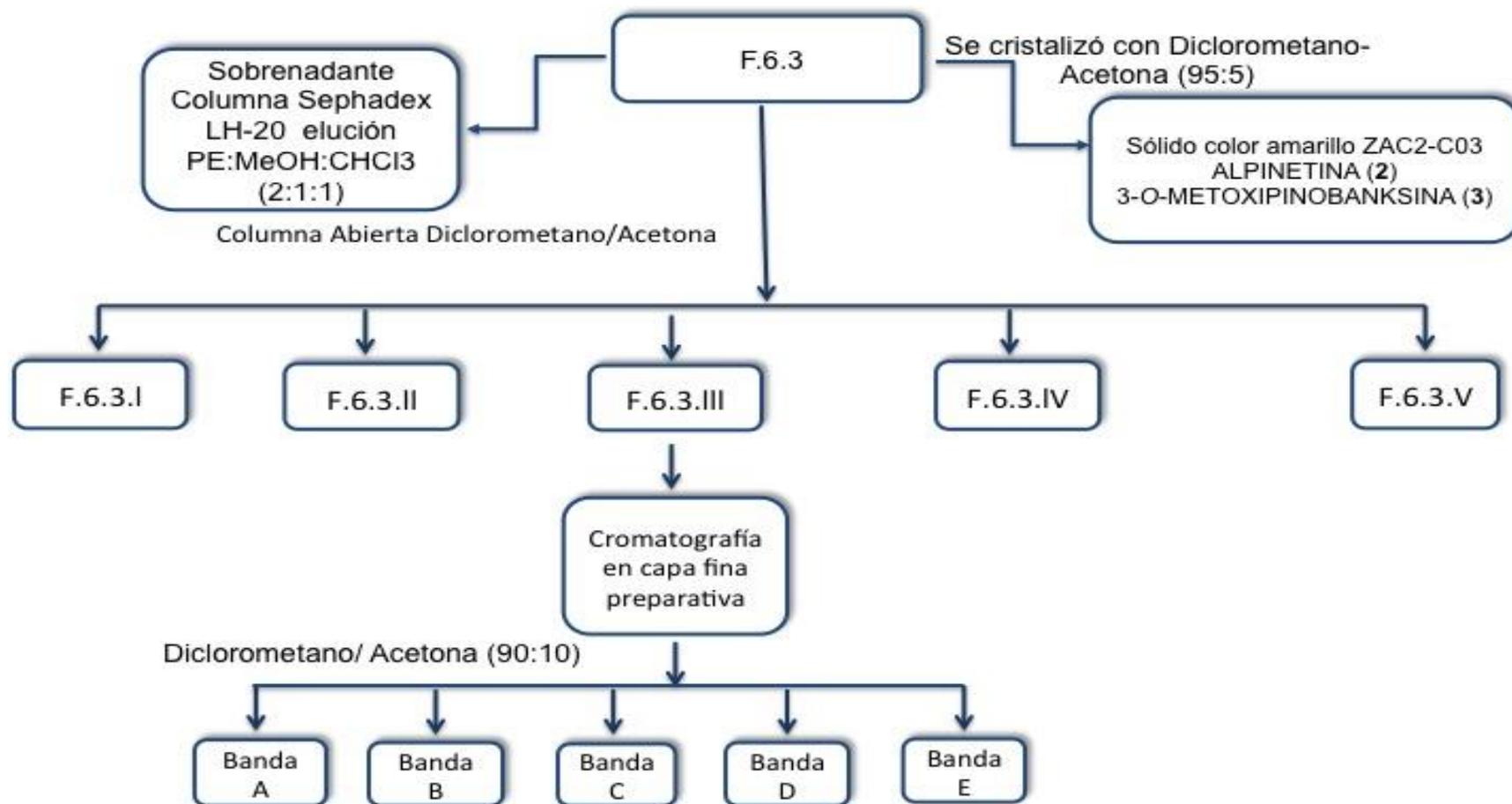


Figura 10. Desarrollo experimental parte 2.

6. Resultados y Discusión

La selección del propóleo como material de estudio se realizó con base en el criterio etnomédico, el cual ha demostrado, ser un buen punto de partida para el descubrimiento de compuestos bioactivos de interés medicinal (Rosas et al., 2012). Por otra parte, la revisión bibliográfica previa a este trabajo arrojó la ausencia de estudios químicos de propóleos producidos en la zona melífera del Norte de México, ya que las características climáticas de esta zona son semiáridas -áridas y no han sido tan descritas en la literatura.

El propóleo en bruto fue tratado con etanol, debido a que en numerosas publicaciones se ha descrito como un disolvente ideal para el aislamiento de flavonoides (Sampietro et al., 2016; Abdulkhani et al., 2015), de igual forma se ha verificado en el laboratorio con el aislamiento de diversos compuestos en trabajos recientes siguiendo este esquema experimental (Villar Martínez, 2016; Clairin Savage, 2015; Granados Pineda, 2014).

6. 1 Estudio químico del propóleo de Zacatecas

A partir de la fracción F4 se aisló la flavanona pinocembrina (**1**), con un rendimiento el cual fue de 3.83 g a partir de 115.0 g del EEP, su presencia es considerada marcador de propóleos derivados de los álamos. Este resultado es congruente con lo descrito por Salatino y colaboradores (2011) para los propóleos de tipo I (propóleos de las zonas templadas). En esta revisión, se resumen los estudios previos realizados utilizando muestras recolectadas en diferentes partes del mundo y se destacan los componentes marcadores para cada zona geográfica. Sin embargo, para el caso de México los estudios son escasos y solo se ha determinado la composición química de propóleos recolectados en las zonas melíferas del norte de México y de la península de Yucatán (Salatino et al., 2011; Navarro et al., 2012; Pino et al., 2011).

6.2 Caracterización estructural de la pinocembrina (1).

La pinocembrina es un flavonoide de tipo flavanona que se ha identificado en los propóleos de tipo I originales de las zonas templadas del mundo (Bertelli et al., 2011; Charlton et al., 2002; Fan, 1996).

En un estudio realizado a un propóleo de Uruguay se aislaron 18 flavonoides, incluyendo a la pinocembrina (1), los constituyentes aislados fueron similares a los propóleos de origen europeo y chino. Uruguay está ubicado geográficamente en el sur de Brasil, los componentes del propóleo de Uruguay fueron similares, no sólo para el propóleo del sur de Brasil, sino también para los propóleos de Europa y China como se describe anteriormente (Kumazawa et al., 2002).

El flavonoide pinocembrina (1) se aisló como un sólido en forma de cristales color amarillo obteniendo, su fórmula molecular se determinó como $C_{15}H_{12}O_4$ con base en el espectro de masas el cual mostró un ión molecular m/z 256 (Figura 12). Las características más importantes del espectro de RMN- 1H se describen a continuación y se resumen en el Cuadro 6.

1. En δ_H 7.47 (2H) se observó un doblete que integró para dos protones con una $J= 8.0$ Hz asignable a los protones de las posiciones H-2a y H-6a en δ_H 7.39 (3H) un multiplete que integró para tres protones asignable a los protones H-3a y H-5a del anillo B del flavonoide.
2. En δ_H 5.89 (1H, d, $J= 2.0$ Hz, H-6) y en δ_H 5.92 (1H, d, $J= 2.0$ Hz, H-8) se observó un sistema AB consistente con la presencia un anillo aromático tetra sustituido. Estas señales son asignables a los protones H-6 y H-8 del anillo A del flavonoide.
3. Por último, en δ_H 3.07 (1H, dd, $J= 16.0$ Hz, H-3'') y en δ_H 2.78 (1H, dd, $J=4.0$ Hz, H-3') se observaron dos dobles de dobles asignables a los protones H-3b y 3a del anillo C del flavonoide.

Cuadro 6. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H del compuesto.

Pinocembrina (**1**) (MeOH-*d*₆, 400 MHz)

¹ H	δ (J Hz)
2	5.42 (1H, dd, 12.0, 4.0)
3'	2.78 (1H, dd, 16.0, 4.0)
3''	3.07 (1H, dd, 16.0, 12.0)
6	5.89 (1H, d, 2.0)
8	5.92 (1H, d, 2.0)
2a,6a	7.47 (2H, dd, 8.0, 2.0)
3a,5a	7.39 (3H, m)
PM (m/z)	256 [M ⁺]

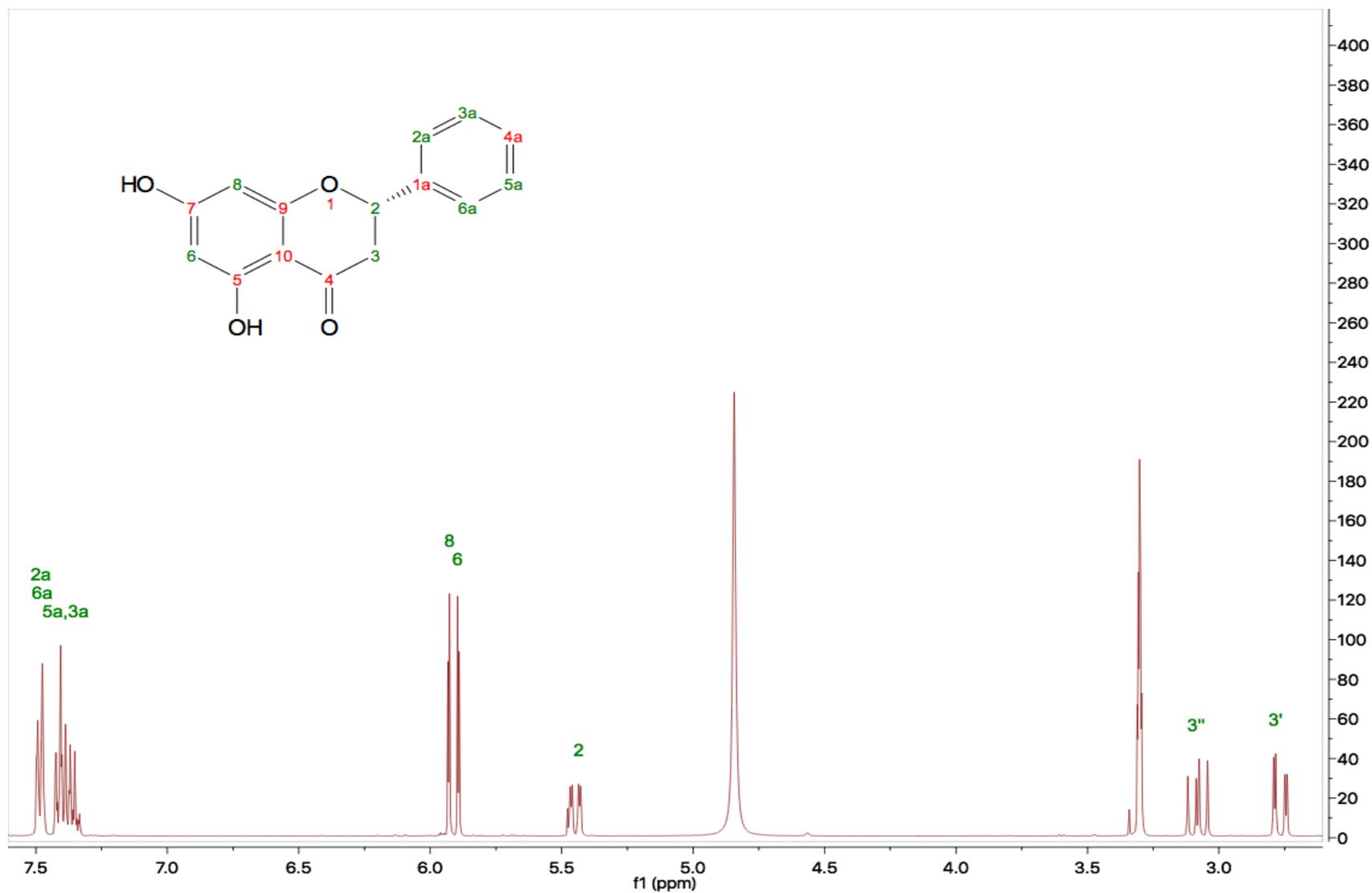


Figura 11. Espectro de RMN-¹H de la pinocembrina (1), MeOH-*d*₆, 400 MHz.

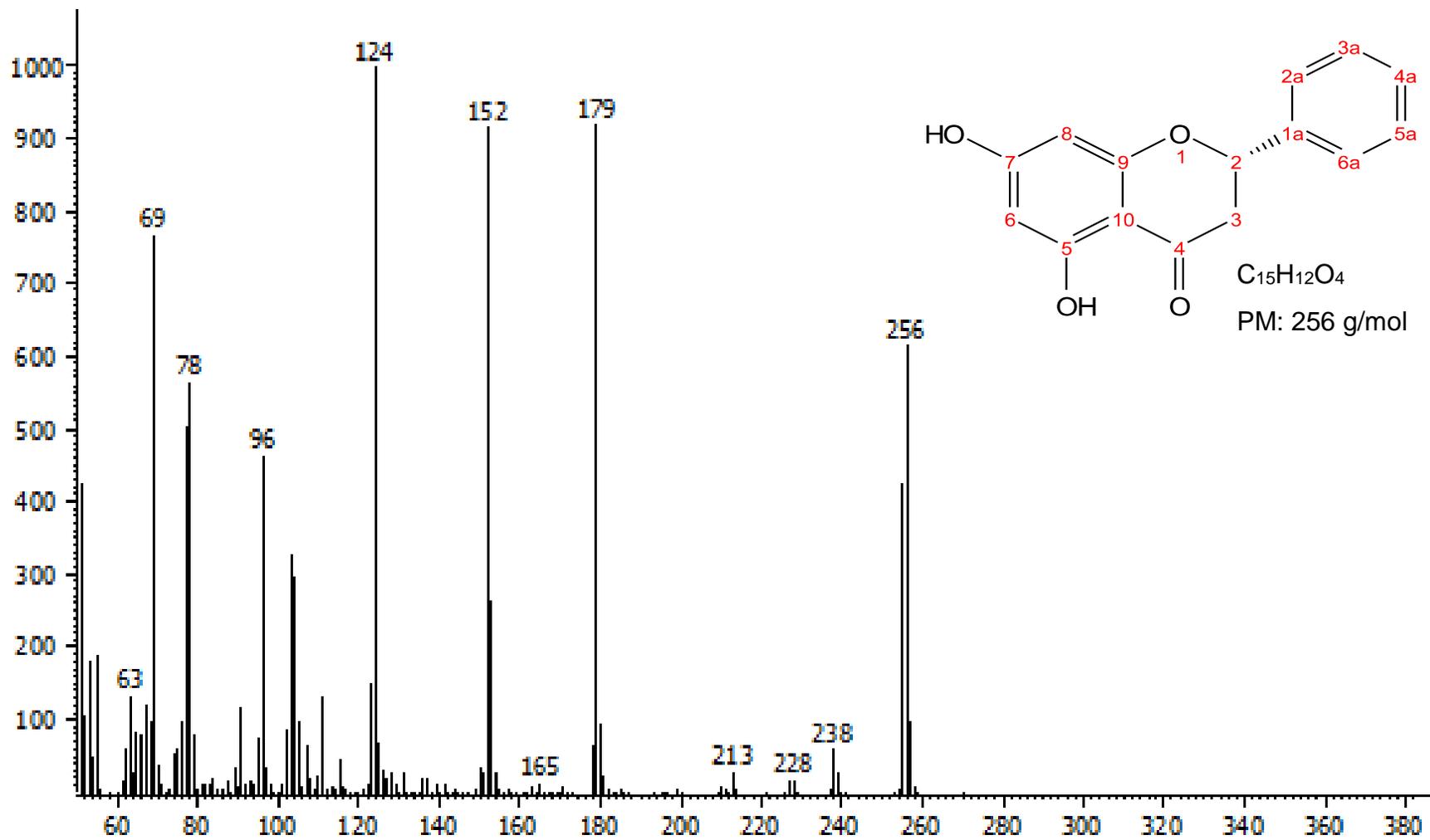


Figura 12. Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico de la pinocembrina (1).

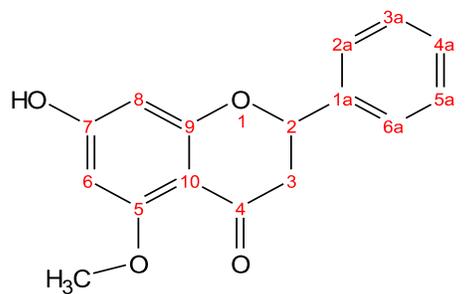
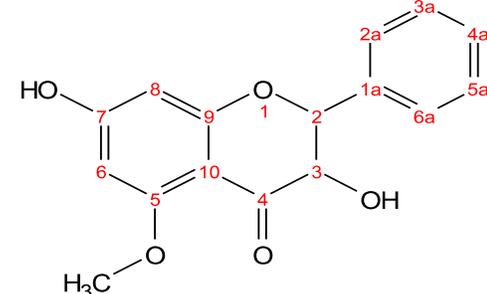
6.3 Caracterización estructural de la alpinetina (2) y la 5-O-metoxipinobanksina (3).

La alpinetina (2) se separó en mezcla con la 5-O-metoxipinobanksina (3) como cristales color amarillo, los cuales fueron solubles en DMSO- d_6 . La alpinetina (2) es flavanona, la cual es abundante en la naturaleza y constituye el principal principio activo de *Alpinia katsumadai*, esta ha sido utilizada en la medicina tradicional China y se ha reportado como un agente antitumoral, antibacteriano y antiinflamatorio (Zhang et al., 2010), también se ha reportado en estudios realizados a cardamomo negro (*Amomun subulatum*), teniendo efectos antihipertensivos y otros benéficos sobre el sistema digestivo y respiratorio (Ritender et al., 2014). Se ha reportado como constituyente de los propóleos de tipo álamo (De Groot et al., 2013), en cuanto a los propóleos ha sido aislada previamente de muestras de Portugal (Falcão et al., 2013) y Euroasiáticos (Isidorov et al., 2014). En el Cuadro 7 se resumen las características del espectro de RMN- ^1H y en la Figura 13a.

La 5-O-metoxipinobanksina (3) es un flavononol, que ha sido aislado de extractos etanólicos de propóleos de Uruguay (Kumazawa et al., 2002). En el Cuadro 7 se resumen las características del espectro de RMN- ^1H y en la Figura 13b.

Un estudio realizado a un propóleo de Sonora reporto en su composición a los tres flavonoides pinocembrina (1), alpinetina (2) y 5-O-metoxipinobanksina (3) induciendo apoptosis en una línea celular de células B de linfoma. (Alday et al., 2015).

Cuadro 7. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento en RMN-¹H de los compuestos.

			
alpinetina (2), (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)		5-O-metoxipinobanksina (3), (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400MHz)	
¹ H	δ (J Hz)	δ (J Hz)	δ (J Hz)
2	5.46 (1H, dd, 12.0, 4.0)	5.05 (1H, d, 12.0)	
3	3' 2.99 (1H, dd, 15.0, 12.0) 3'' 2.60 (1H, dd, 15.0, 4.0)	4.30 (1H, d, 12.0)	
6	5.97 (1H, d, 2.0)	6.06 (1H, d, 2.0)	
5-OCH₃	3.77 (1H, s)	3.75 (1H, s)	
8	6.06 (1H, d, 2.0)	6.08 (1H, d, 2.0)	
2a, 6a	7.47 (2H, dd, 8.8, 3.0)	7.47 (2H, dd, 8.8, 3.0)	
3a-5a	7.39 (3H, m)	7.38 (3H, m)	

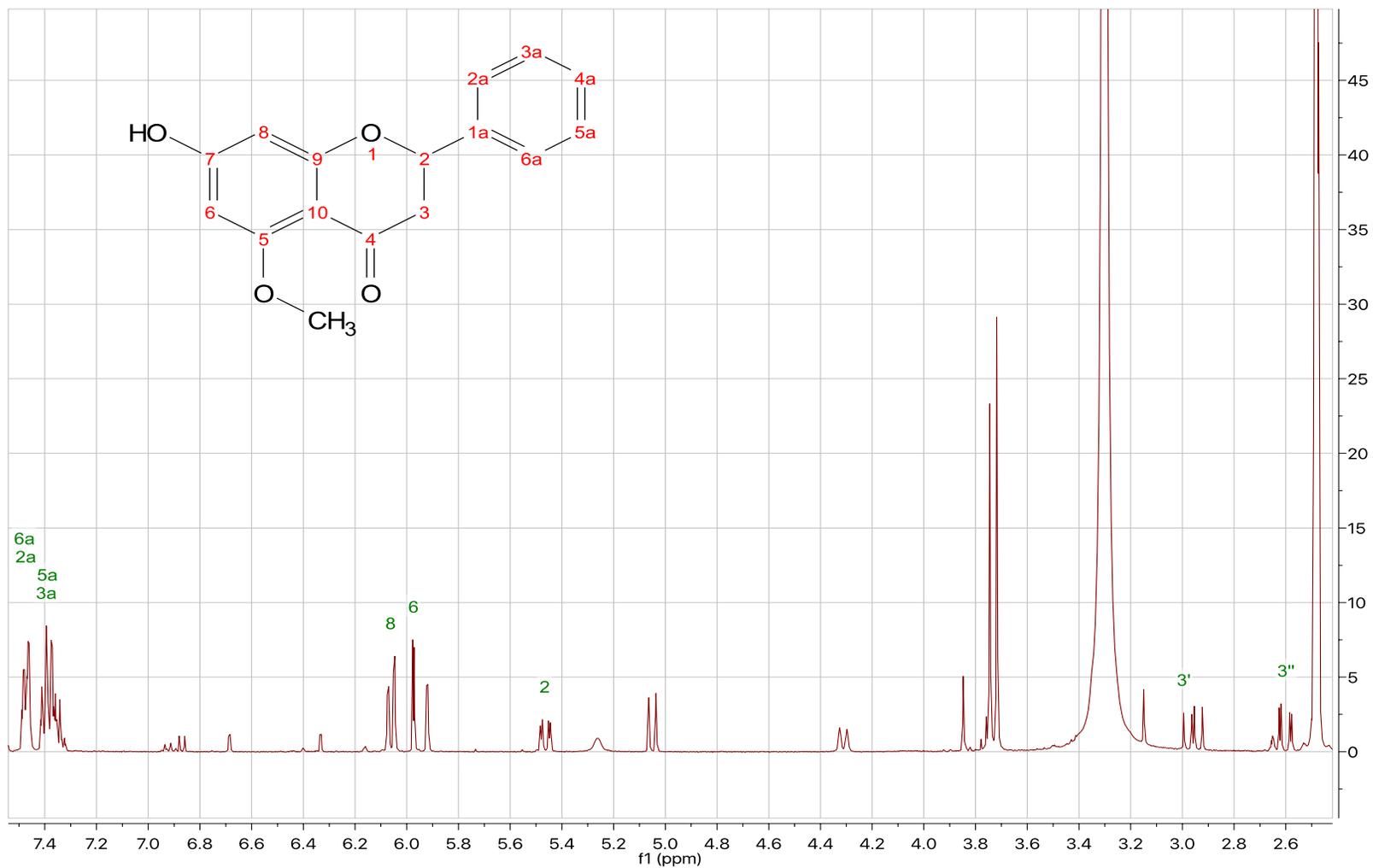


Figura 13a. Espectro de RMN- ¹H de la alpinetina (2), DMSO-*d*₆, 400 MHz.

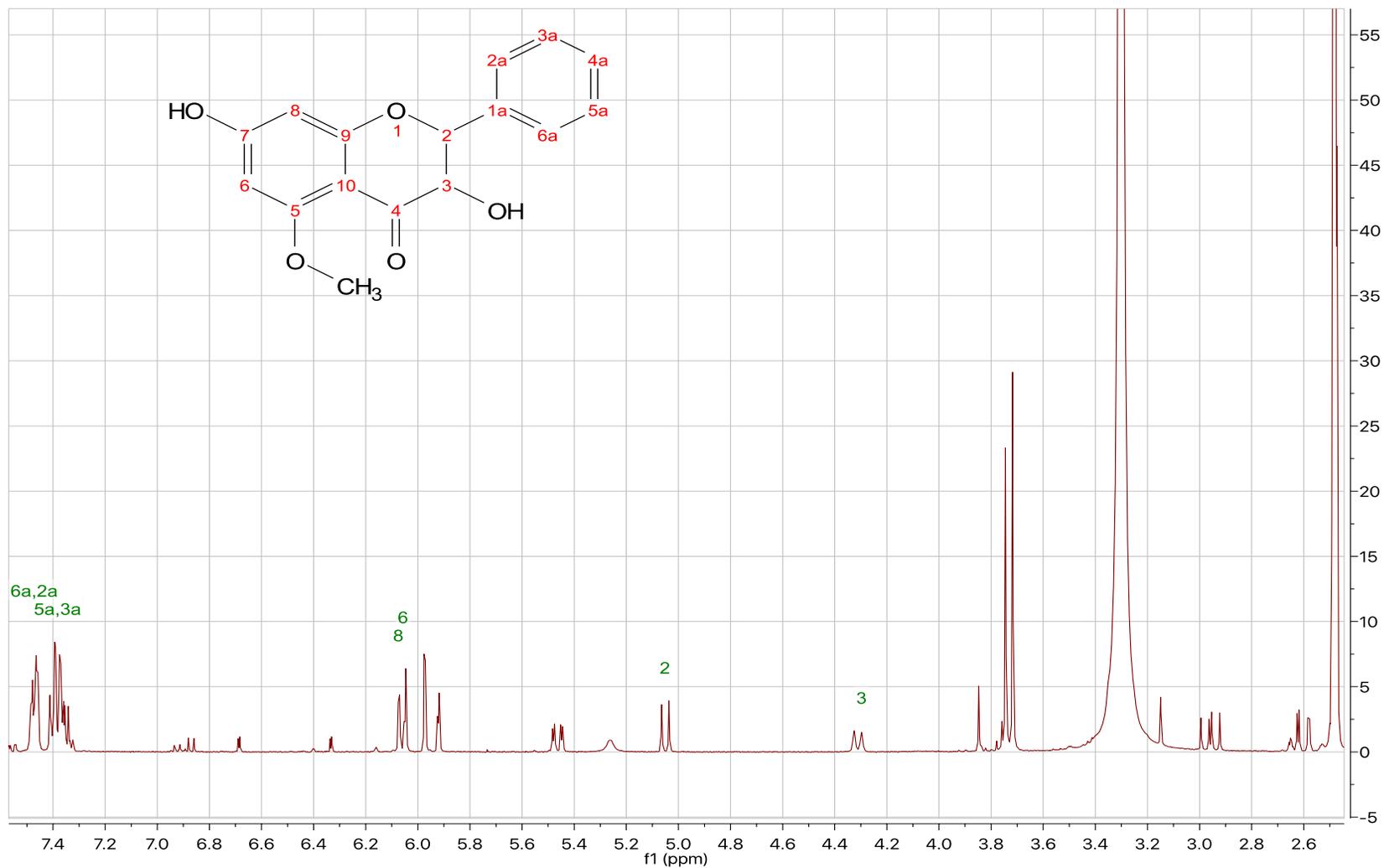


Figura 13b. Espectro de RMN- ¹H de la 5-O-metoxipinobanksina (3), DMSO-*d*₆, 400 MHz

6.4 Cuantificación de fenoles totales

El método de Folin-Ciocalteu es considerado uno de los mejores y más antiguos para cuantificar el contenido de fenoles en productos naturales (Prior et al., 2005). Se construyó una curva de calibración que permitió obtener la ecuación de la recta $b= 0.0324$ y $m= 0.0041$ ($r^2= 0.9980$). Utilizando esta ecuación se interpoló el valor de absorbancia obtenido para el extracto etanólico de propóleo a una concentración de 0.1 mg/mL. Como resultado se obtuvo que el extracto etanólico contiene 87.8 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

Con base en el contenido de fenoles totales se puede concluir que el EEP cumple con las especificaciones de control de calidad establecidas por las normas de calidad elaboradas por el Instituto Argentino de Normalización (Esquema A de norma IRAM 15935, 2002) en el cual se establece que el contenido mínimo de fenoles totales debe ser mayor a 40 mg de equivalentes de ácido gálico/ g de muestra.

6.5 Cuantificación de flavonoides totales

Para la determinación de los flavonoides totales se realizó una curva patrón que nos permitió obtener la ecuación de la recta, obteniendo los valores de $b= 0.1032$ y $m= 16.33$ ($r^2= 0.9905$). En esta ecuación se interpoló el valor de absorbancia obtenido para el extracto etanólico del propóleo de Zacatecas. Como resultado se obtuvo que el extracto etanólico contiene 21.8 mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto. Las normas de calidad establecen que el contenido mínimo de flavonoides totales debe ser mayor a 5 mg de equivalentes de quercetina/g muestra por lo tanto, la muestra cumple con el contenido de flavonoides totales.

6.6. Evaluación de la actividad antioxidante

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

La sustancia patrón utilizada para cuantificar la capacidad antioxidante del EEP, fue el ácido (+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (Trolox® Equivalente Antioxidant Capacity). Se realizó una curva patrón, donde se obtuvo la ecuación de la recta como $b= 0.5912$ y $m= -54.577$ ($r^2= 0.9721$). Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron a la ecuación de la recta con el cálculo del Trolox®. En este ensayo se calculó el porcentaje de DPPH neutralizado por el EEP del propóleo de Zacatecas.

Con base en la curva patrón construida con el antioxidante comercial Trolox® se interpoló la absorbancia obtenida del EEP zacatecano obteniendo un % Captura DPPH= 31.17%, dando 3.64 equivalentes de Trolox® (microgramos/mL).

El extracto etanólico que capturó el radical DPPH fue de 31.2%, el cual se considera bajo debido a que en el estudio químico se encontró a la pinocembrina (1), la cual no neutraliza a los radicales porque este flavonoide carece de sustitución en el anillo B y de hidroxilo en la posición 3, también se le atribuye 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 considera un atrapador débil (Burda et al., 2001).

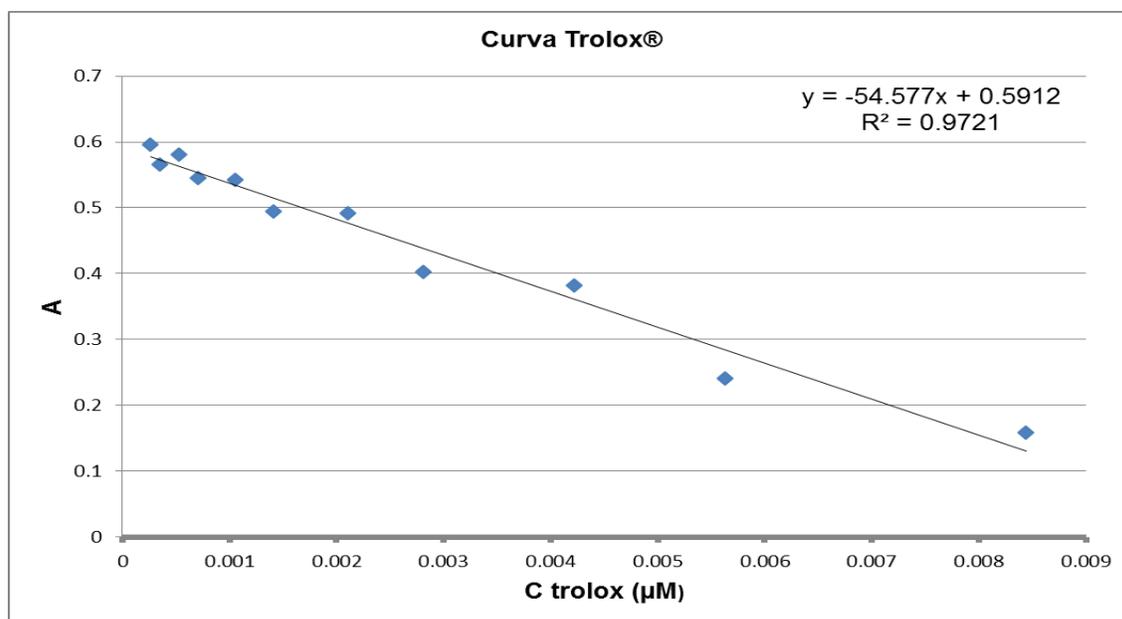


Figura 14. Curva patrón realizada con Trolox® para el ensayo de DDPH.

6.7 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*. Las cuales pertenecen al género *Streptococcus* y de acuerdo con su tinción se clasifican en Gram (+). En particular estas bacterias son consideradas como agentes etiológicos de la carie dental.

Se considera 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. (Rios, et al., 1968). El EEP de Zacatecas no muestra efecto sobre el crecimiento de *S. mutans* al rebasar el límite establecido 1.024 mg/mL, pero si es capaz de inhibir el crecimiento de *S. sanguinis* y *S. oralis* con una CMI de 0.512 mg/mL (Cuadro 8).

La capacidad antimicrobina del EEP se atribuye a diversos flavonoides entre ellos la pinocembrina (1), la cual fue aislada en este estudio químico; también se atribuye a los diversos mecanismos de acción que tienen los componentes del propóleo y al sinergismo de los mismos.

Cuadro 8. CMI obtenida para el EEP de Zacatecas, para los diferentes microorganismos de prueba.

Bacteria	CMI (µg/mL)
<i>S. mutans</i>	1024
<i>S. sanguinis</i>	512
<i>S. oralis</i>	512

7. Conclusiones

El estudio químico del propóleo recolectado en el apiario de Fresnillo, Zacatecas permitió el aislamiento de tres compuestos de tipo flavonoide: pinocembrina (1), alpinetina (2) y 5-O-metoxipinobanksina (3).

El contenido de fenoles y flavonoides totales en el EEP fue de 87.8 mg de equivalente de ácido gálico por gramo de extracto y 21.8 mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto, respectivamente. Estos contenidos cumplen con las normas de calidad establecidas por Argentina y Brasil para medir su calidad.

El extracto etanólico que capturó el radical DPPH fue de 31.2%, el cual fue bajo comparado con otros propóleos de la zona del Altiplano Mexicano y Chinos. Esta actividad se puede atribuir al flavonoide pinocembrina (1), que se aisló como componente mayoritario de este propóleo.

En cuanto al estudio biológico el EEP de Zacatecas mostro la capacidad de inhibir al *S. sanguinis* y *S. oralis*, demostrando sus propiedades antibacterianas descritas en la literatura.

El aislamiento de los flavonoides: pinocembrina (1), alpinetina (2) y 5-O-metoxipinobanksina (3), permite proponer como fuente botánica de origen del propóleo de Zacatecas a los álamos. Este resultado también permite clasificar a este propóleo como de tipo I por sus componentes químicos (Salatino et al., 2011).

8. Perspectivas

Continuar con el estudio químico para aislar y caracterizar los compuestos minoritarios presentes en el propóleo de Zacatecas.

Realizar la evaluación farmacológica de los compuestos pinocembrina (1), alpinetina (2) y 5-O-metoxipinobanksina (3) para conocer su efecto sobre la progresión de la nefropatía diabética.

9. Referencias bibliográficas

Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Esmaeeli, H. (2015). Evaluation of the Antibacterial Activity of Cellulose Nanofibers/Polylactic Acid Composites Coated with Ethanolic Extract of Propolis. *Polymer Composites* 10, 1-7.

Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101, 1383-1392.

Alday-Provencio, S., Díaz, G., Rascon, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazaran, H., Hernández, J., Velazquez, C. (2015). Sonoran Propolis and Some of its Chemical Constituents Inhibit in vitro Growth of *Giardia lamblia* Trophozoites. *Planta Med* 81, 742–747.

Asawahame, C., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., Tragoolpua, Y., Sirithunyalug, B., Sirithunyalug, J. (2015). Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of *Streptococcus mutans* by Propolis Electrospun Fibers. *AAPS PharmSciTech*, Vol. 16, No. 1, 182-191.

Ayres, D.C., Marcucci, M.C., Giorgio, S. (2007). Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 215–220.

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100,114-117.

Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM* 2(1), 29-32.

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

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.

Bankova, V., Roumen S.C., Delgado T. A. (1997). Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry* 49, No.5, 1411-1415.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15, 561–571.

Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, L.G., Plessi, M. (2011). ¹H-NMR Simultaneous Identification of HealthRelevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochem. Anal.* 23, 260–266.

Bittencourt, L.F.M., Ribeiro, R. P.,Franco, L.P. R., W.M. Hilhorst, H., D. de Castro, R., Fernandez, G. L. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International* 76, 449–457.

Borges, G. J., Aparecida, De C. R., (2015). Orally Disintegrating Films Containing Propolis: Properties and Release Profile. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104, 1431–1439.

Búfalo, M.C., Barreiro, D.P., Sartori, D.R.S., Sforcin, J.M., (2009a). Absence of propolis effect on plasma glycaemic control and lipid metabolism in a diabetic rat model. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1, 51–55.

Búfalo, M.C., Candeias, J.M.G., Sforcin, J.M., (2009b). In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermóide carcinoma (HEp-2) cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 6, 483–487.

Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K., Sforcin, J.M., (2009c.) Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1669–1680.

Burda, G.A., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2774-2779.

Cardozo, V.D., Mokochinski, B.J., Machado, S.C., Sawaya, F.H.C.A., Caetano, K.I., Feisner, M.L., Torres R.Y. (2015). Variabilidade Química de Geopropolis Produzida pelas Abelhas sem Ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. *Revista Virtual de Química* 7, 6, 2457-2474.

Castaldo, S., Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73 Suppl. 1, 1-6.

Charlton, AJ, Farrington. W.H.H., Brereton, P. (2002). Application of ¹H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity of instant coffee. *Jornal of Agricultural Food Chemistry* 50, 3098–3103.

Chen, J., Wenlong, L., Yao, H., Xu J. (2015). Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia* 103, 231-241.

Chen, M-J., Chang, W-H., Lin, C-C., Liu, C-Y., Wang, T-E., Chu, C-H. (2008). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology* 8, 566–576.

Çikrikçi, S., Moziog̃lu, E., Yılmaz, H. (2008). Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa*. *Records of Natural Products* 2, 19–24.

Clairin Savage Andrés. (2015). Evaluación del potencial antibacteriano de una muestra de propóleo de la zona melífera del Norte de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México. 38-40.

Comité de Competitividad Centro de Estudios Sociales y de Opinión Pública. Situación del sector farmacéutico en México, (2010). 22-25.

Conti, J. B., Santiago, B. K., Búfalo, C. M., Herrera, F. Y., Alday, E., Velazquez, C., Hernandez, J., Sforcin, M. J. (2015). Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67, 1431–1438.

Cunha, I.B.S., Salomao, K., Shimizu, M., Bankova, V.S., Custodio, A.R., De Castro, S.L., Marcucci, M.C. (2004). Anti-trypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52, 602–604.

Dantas P. A., Olivieri P. B., Gomes H.M.F., De Castro L. S. (2006). Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 187–193.

De Groot, C.A., MD, PhD. (2013). Propolis: A Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects. *American Contact Dermatitis Society Review*, 263-282.

Duran, G., Duran, N., Culha, G., Ozcan, B., Oztas, H., Ozer, B. (2008). In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitology Research* 102, 1217–1225.

Duran, N., Muz, M., Culha, G., Duran, G., Ozer, B. (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research* 108, 95-105.

Esanu, V., Prahoveanu, E., Crisan, I., Cioca, A. (1981). The effect of aqueous propolis extract, of rutin and of a rutin-quercetin mixture on experimental influenza virus infection in mice. *Virologie* 32, 3, 213-215.

Falcão, I.S., Tomás, 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.

Fan, TWM. (1996). Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 28, 161–219.

Francielli de Oliveira, P., Mota de Souza, L.I., Azevedo, B.M.N.M., Kenuppp, B.J., Alves, S.F.A., Crispim, T.D. (2013). Evaluation of Genotoxicity and Antigenotoxicity of Artepillin C in V79 Cells by the Comet and Micronucleus Assays. *Nutrition and Cancer* 65:7, 1098-1103.

Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M., Guimarães, S., (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 13, 170–175.

Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 158–163.

Gemiarto, T. A., Nynyio, N. N., Wei, L. S., Logis, J., Ayesha, F., Wei, C. C., Ying Lim, S. C. (2015). Isoprenyl caffeate, a major compound in manuka propolis, is a quorum-sensing inhibitor in *Chromobacterium violaceum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 491–504.

Giurcoaneanu, F., Crisan, I., Esanu, V., Cioca, V., Cajal, N. (1988). Treatment of cutaneous herpes and herpes zoster with Niverisol D. *Virologie* 39, 1, 21-24.

González, A.R., Bernal, R. (2002). Propóleos: Un camino hacia la salud. Editorial Pablo de la Torriente. La Habana, Cuba. 7-132.

Granados Pineda Jessica. (2014). Composición química de los extractos etanólicos de propóleos recolectados en los estados de Puebla y Guanajuato. Actividad antioxidante de los compuestos aislados. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México.

Guang, H.M., Du, G.H. (2006). Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rats. *European Journal of Pharmacology*, 542(1-3), 77- 83.

Habsah, M., Mohamada, H., Abas, F., Permana, D., Lajis, N.H., Alib A.M., Sukari, M.A., 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.

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.

Hernandez, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A., Castaneda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Vazquez-Moreno, L., Velazquez, E.F., Astiazaran, H.,

Lugo, E., Velazquez, C. (2007). Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica* 73, 1469-1474.

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

Isidorov, A.V., Szczwpaniak, L., Bakier, S. (2014), Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry* 142, 101–106.

Kasala, R. E., Bodduluru, N. L., Madana, M. R., Athira, K. V., Gogoi, R., Barua, C. C. (2015). Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicology Letters* 233, 214–225.

Koc, A. N., Silici, S., Kasap, F., Hormet-oz, H. T., Mavus-Buldu, H., Ercal, B. D. (2011). Antifungal activity of the products against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* *Journal of Medicinal Food*, 14 (1-2), 128-134.

König, B., Dustmann, J.M. (1985). The caffeoylics as a new family of natural antiviral compounds. *Naturwissenschaften* 72, 659-661.

König, B., Dustmann, J.H. (1988). Baumharze, Bienen und antivirale Chemotherapie. *Naturwiss Rundsch* 41, 2, 43-53.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popova, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 235-240.

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.

Kuropatnicki, K.A., Szliszka, E., Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 13, 1-11.

Lopez, B.G.-C., Lourenco de C. C., Alves, D.A., Machado, D., Lancellotti, M., Sawaya, A.C.H.F. (2015). Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. *Journal of Applied Microbiology* 119, 677-687.

Machado, G.M., Leon, L.L., De Castro, S.L. (2007). Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 73–77.

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

Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H., Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 105–112.

Massaro, F.C., Bruce, S.J., Powell, D., Brooks, P. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. *Science of Nature* 102: 68, 2-11.

Maximova-Todorova, V., Manolova, N., Gegova, G., Sekerjjeva, S., Uzunov, S., Pancheva, S., Marekov, N., Bankova, V. (1985). Antiviral effects of some fractions isolated from propolis. *Acta Microbiol Bulg* 17, 79-85.

Mollaoglu, H., Gokcimen, A., Ozguner, F., Oktem, F., Koyu, A., Kocak, A., Demirin, H., Gokalp, O., Cicek, E. (2006). Caffeic acid phenethyl ester prevents cadmium-induced cardiac impairment in rat. *Toxicology*, 227(1-2), 15-20.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G. (2005). Advance in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561–1577.

Napoli, C., de Nigris, F., Palinski W. (2001). Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(4), 674-682.

Navarro-Navarro, M., Lugo-Sepúlveda, E.R., García-Moraga M. C., Rosa-López, R., Robles-Zepeda, R.E., Ruíz-Bustos, E., Velázquez-Contreras, C. (2012). Antibacterial and Antioxidant activities of propolis methanolic extracts from Magdalena de Kino and Sonoyta, Sonora. *BIOtecnia XIV* (3), 9-15.

Okonenko, LB. (1986). Propolis as an inhibitor of free radical lipid oxidation in salmonellosis. *Voprosy Medit Khimii*, 32(3), 45-48.

Orsi, R.O., Funari, S.R.C., Soares, A.M.V.C., Calvi, S.A., Oliveira, S.L., Sforcin, J.M., Bankova, V., (2000). Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *The Journal of Venomous Animals and Toxins* 6, 205–219.

Papotti, 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.

Parr, A., Bolwell, G.P., (2000). Phenols in the plant and in man: the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal Science Food Agriculture* 80, 985–1012.

Pino, A.J., Marbot, R., Delgado, A., Zumárraga, C., Sauri, E. (2011). Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. *Journal of Essential Oil Research* 18, 53-56.

Pontin, K., Da Silva Filho, A.A., Santos, F.F. et al (2008). In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research* 103, 487–492.

Popescu, M., Polinicencu, C., Atansiu, P., Predescu, E. (1985). Antiherpes ointment. *Chemical Abstracts* 103,26.

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.

Prontuario de Informacion geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Fresnillo, Zacatecas. Clave geoestadística 32010.

Reyna Garduño Wilber. (2013). Efecto de la zona y la época de colecta sobre la producción de marcadores químicos en propóleos de la región del altiplano mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México. 24-25.

Ríos, J.L., Recio, M.C, Villar, A. (1968). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127-149.

Ritender., Bhatt, M., Juyal, V., Singh, A. (2014). *Amomum Subulatum* Roxb: A Critical Review of Pharmacological and Phytochemical Data. *Review Article* 2250-1029, 1-11.

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.

Rosas, P.Y., Mejía A., Díaz, R.G., Aguilar, M.I. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology* 141, 860-865.

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

Sampietro, A.D., Sampietro-Vattuone, M.M., Vattuone, A. M. (2016). Immunomodulatory activity of *Apis mellifera* propolis from the North of Argentina. *Food Science and Technology* 70, 9-15.

Sawaya, C.H.F.A., Souza, S.K., Marcucci, C.M., Cunha B.S.I., Shimizu T.M. (2004). Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 104-109.

Shevchenko, L.F., Chasovodtseva, O.A., Peschanskii, A.N. (1972) Inhibiting activity of propolis on the influenza virus. *Chemical Abstracts* 82, 11.

Sforcin, J. M., Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 253-260.

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

Simone-Finstrom, M., Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41, 295–311.

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.

Sosnowski Zenon M (1983) Extracting propolis and water-soluble dry propolis powder. *Chemical Abstracts* 99, 6.

Speina, E., Arczewska, K.D., Gackowski, D., Zielinska, M., Siomek, A., Kowalewski, J., Olinski, R., Tudek, B., Kusmierk, J.T. (2005). Contribution of hMTH1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(5), 384-395.

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. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 27, 1198–1199.

Tasduq, S.A., Kaiser, P., Sharma, S.C., Johri, R.K. (2007). "Potentiation of isoniazid-induced liver toxicity by rifampicin in a combinational therapy of antitubercular drugs (rifampicin, isoniazid and pyrazinamide) in Wistar rats: a toxicity profile study," *Hepatology Research* 37 (10), 845–853.

Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 1-13.

Torres, D., Hollands, I., Palacios, E. (1990). Efecto de um extrato alcohólico de propoleo sobre el crecimiento de *Giardia lamblia in vitro*. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias* 21, 15–19.

Villar Martínez Eduardo. (2016). Estudio químico del extracto etanólico de un propóleo recolectado en Acuexcoatl, Xochimilco. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México.

Wali, F.A., Avula, B., Ali, Z., Khan, A.I., Mushtaq, A., Rehman, U.M., Akbar, S., Hussain, M.M. (2015). Antioxidant, Hepatoprotective Potential and Chemical Profiling of Propolis Ethanolic Extract from Kashmir Himalaya Region Using UHPLC-DAD_QToF-MS. *BioMed Research International* 15, 1-10.

WHO Reports, Global Tuberculosis Control, 2013.

Zhang, G., Zhao, N., Hu, X., Tian, J. (2010). Interaction of alpinetin with bovine serum albumin: Probing of the mechanism and binding site by spectroscopic methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 76, 410–417.