



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

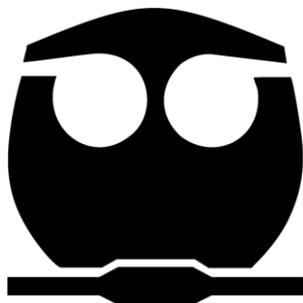
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN  
PROPÓLEO DE LA DELEGACIÓN MILPA ALTA  
RECOLECTADO POR EL MÉTODO DE LA MALLA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEJANDRA ARELY LÓPEZ NEGRETE



Ciudad Universitaria, Cd. Mx, 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

<b>PRESIDENTE:</b>	Dra. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
<b>VOCAL:</b>	M. en C. JOSÉ MANUEL MENDEZ STIVALET
<b>SECRETARIO:</b>	Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
<b>1 er. SUPLENTE:</b>	Q. GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI
<b>2 do. SUPLENTE:</b>	Dr. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

Sitio donde se desarrolló el proyecto.

Laboratorio 111, Edificio E

Facultad de Química, UNAM

**Asesor**

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

**Sustentante**

---

Alejandra Arely López Negrete



### *AGRADECIMIENTOS.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por abrirme las puertas de ésta maravillosa y respetable casa de estudios donde he vivido las mejores y también las peores experiencias que en conjunto me han hecho adquirir una excelente formación académica y personal.*

*Al Dr. José Fausto Rivera Cruz quien me ha guiado desde antes y durante ésta etapa final de mi carrera profesional y me ha brindado su tiempo, confianza, paciencia y conocimientos, pero sobre todo gracias por su amistad y por impulsarme a superarme cada día.*

*A mis sinodales: Dra. María Isabel Aguilar Laurents, M. en C. José Manuel Méndez Stivalet, Dr. José Fausto Rivera Cruz. Por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis.*

*A la Dra. Blanca Rivera Cruz por la ayuda brindada durante el trabajo experimental de ésta tesis.*

*A todos los profesores que desde mis inicios en la vida escolar han contribuido con sus enseñanzas para concluir ésta etapa.*

*Al personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: Ángel López, Valentín y Bonilla, quienes proporcionaron el material vegetal para éste trabajo de investigación.*

*Proyecto Conacyt Ciencia Básica CB-252006*

*PAP 5000 9138 asignado al Dr. José Fausto Rivera Cruz*





## ÍNDICE.

I. ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
II. ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
III. ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	XI
IV. LISTA DE ABREVIATURAS .....	XII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. GENERALIDADES.....	3
2.1.1. DEFINICIÓN.....	3
2.1.2. CARACTERÍSTICAS.....	3
2.1.3. COMPOSICIÓN .....	3
2.2. APIARIOS ESTUDIADOS.....	9
2.2.1. UBICACIÓN .....	9
2.2.2. FLORA CERCANA.....	10
2.3. ASPECTOS HISTÓRICOS.....	11
2.4. PRODUCCIÓN DE PROPÓLEO POR <i>Apis mellifera</i> .....	13
2.5. MÉTODOS DE COSECHA .....	15
2.5.1. MÉTODO DE RASPADO .....	15
2.5.2. MÉTODO DE REJILLAS.....	15
2.5.3. MÉTODO DE PLACAS PLÁSTICAS.....	16
2.5.4. MÉTODO DE LA MALLA.....	17
2.6. USOS.....	18
2.7. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS .....	18
2.7.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	19
2.7.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	19



2.7.3. ACTIVIDAD ANTIVIRAL .....	21
2.7.4. ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE.....	22
2.7.5. ACTIVIDAD CARDIOPROTECTORA.....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. OBJETIVOS GENERALES .....	24
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	24
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
5.1. COSECHA DEL MATERIAL VEGETAL.....	25
5.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS .....	25
5.2.1. EXTRACTO ETANÓLICO OBTENIDO POR MACERACIÓN .....	25
5.2.2. EXTRACTO ETANÓLICO OBTENIDO POR SONICACIÓN .....	26
5.2.3. EXTRACTO ETANÓLICO OBTENIDO POR SOXHLET .....	26
5.3. DISEÑO FACTORIAL 2 <sup>3</sup> .....	27
5.4. OBTENCIÓN DE CERA (realizado por triplicado) .....	27
5.5. OBTENCIÓN DE BÁLSAMO (realizado por triplicado).....	28
5.6. OBTENCIÓN DE RESINA (realizado por triplicado) .....	28
5.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	28
5.7.1. MICROORGANISMO DE PRUEBA .....	28
5.7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	28
5.8. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	30
5.8.1. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES .....	30
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
6.1. PROPÓLEO DE VALENTÍN.....	31
6.2. PROPÓLEO LAS TROJES.....	33
6.3. PROPÓLEO DE BONILLA .....	35



---

6.4. OPTIMIZACIÓN PARA PROCESO DE EXTRACCIÓN MEDIANTE DISEÑO FACTORIAL $2^3$ .....	37
6.4.1. MODELO 1 .....	37
6.4.2. MODELO 2 .....	42
6.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	48
6.6. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES EN EXTRACTOS ETANÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC). .....	50
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>8. PERSPECTIVAS. ....</b>	<b>67</b>
<b>9. ANEXO I.....</b>	<b>68</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>



# I. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Compuestos aislados a partir del propóleo (Koru <i>et al.</i> , 2007).....	4
<b>Cuadro 2.</b> Ubicación de los Apiarios estudiados.....	10
<b>Cuadro 3.</b> Niveles y factores utilizados en diseño factorial para <i>modelo 1</i> . ....	27
<b>Cuadro 4.</b> Niveles y factores utilizados en diseño factorial para <i>modelo 2</i> . ....	27
<b>Cuadro 5.</b> CMIs de extractos de propóleos de la Delegación Milpa Alta en la evaluación de la actividad antibacteriana contra <i>Streptococcus mutans</i> . ....	49
<b>Cuadro 6.</b> Tiempos de retención para estándares de flavonoides. ....	50



## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica de los Apiarios estudiados en la Delegación Milpa Alta. Fuente inegi.org.mx.....	9
<b>Figura 2.</b> Representación del embalsamamiento de un cadáver en el antiguo Egipto. Obtenida de dranaturaleza.wordpress.com.....	11
<b>Figura 3.</b> Pintura rupestre en "la cueva de las arañas" donde se muestra a un individuo recolectando miel de un panal. Obtenida de laorzaiberica.files.wordpress.com .....	12
<b>Figura 4.</b> Abeja pecoreadora llevando en sus canastillas de las patas traseras resina recolectada, a la colmena para ser transformada a propóleo por abejas obreras (Ángel López Ramírez). .	14
<b>Figura 5.</b> <i>Apis mellifera</i> colectando resina de árboles y plantas para producir propóleo en la colmena (Daugusch et al., 2008).....	14
<b>Figura 6.</b> Cosecha de propóleo por método de raspado (Ángel López Ramírez). .....	15
<b>Figura 7.</b> Uso de rejillas para la recolección de propóleo (Ángel López Ramírez).....	16
<b>Figura 8.</b> Recolección de propóleo por el método de placas plásticas (Ángel López Ramírez).....	16
<b>Figura 9.</b> Obtención de propóleo por el método de la malla (Ángel López Ramírez). .....	17
<b>Figura 10.</b> Se muestran algunos de los productos que se elaboran a partir del propóleo (Alejandra López). .....	18
<b>Figura 11.</b> Efecto antimicrobiano <i>In vitro</i> de propóleos argentinos, colombianos y cubanos sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (Moreno et al., 2007). .....	20
<b>Figura 12.</b> Mapa de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano. ....	29
<b>Figura 13.</b> Diagrama de Pareto Estandarizada para la ponderación del % de rendimiento. Modelo 1. ....	38
<b>Figura 14.</b> Gráfica de Efectos Principales para porcentajes de rendimiento. Modelo 1. ....	39
<b>Figura 15.</b> Gráfica de Probabilidad Normal para porcentajes de rendimiento. Modelo 1. ....	40
<b>Figura 16.</b> Gráfica de Superficie de respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 1. ....	41
<b>Figura 17.</b> Gráfica de Contornos de la Superficie de Respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 1. ....	41
<b>Figura 18.</b> Gráfica de Residuos para porcentaje de rendimiento. Modelo 1. ....	42



<b>Figura 19.</b> Diagrama de Pareto Estandarizada para la ponderación del % de rendimiento. Modelo 2.....	43
<b>Figura 20.</b> Gráfica de Efectos Principales para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.....	44
<b>Figura 21.</b> Gráfico de Probabilidad Normal para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.....	45
<b>Figura 22.</b> Gráfico de Superficie de Respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.....	46
<b>Figura 23.</b> Gráfica de Contornos de Superficie de Respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.....	46
<b>Figura 24.</b> Gráfica de Residuos para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.....	47
<b>Figura 25.</b> Cromatogramas de los flavonoides estándar. a) Cromatograma de pinocembrina. b) Cromatograma de acacetina. c) Cromatograma de 4',7-dimetilnaringenina. d) Cromatograma de 4',7-dimetilapigenina.....	51
<b>Figura 26.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de Valentín, obtenidos con etanol al 96%. a) Por método de Soxhlet. b) Por método de sonicación. c) Por método de maceración. ....	53
<b>Figura 27.</b> Cromatogramas de los EEP del propóleo de Valentín, obtenidos con etanol al 70%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración. ....	54
<b>Figura 28.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de Valentín, obtenidos con etanol al 50%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración. ....	55
<b>Figura 29.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de las Trojes, obtenido con etanol al 96%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración. ....	57
<b>Figura 30.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de las Trojes, obtenidos con etanol al 70%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración. ....	58
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de las Trojes, obtenidos con etanol al 50%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración. ....	59
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de Bonilla, obtenidos con etanol al 96%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) por el método de maceración.....	61
<b>Figura 33.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de Bonilla, obtenidos con etanol al 70%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración. ....	62
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas de los EEP del apiario de Bonilla, obtenidos con etanol al 50%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración. ....	63



### III. ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Porcentajes de rendimiento de extractos etanólicos del propóleo de Valentín. ....	32
<b>Gráfica 2.</b> Caracterización química del propóleo de Valentín. ....	32
<b>Gráfica 3.</b> Porcentajes de rendimiento de extractos etanólicos del propóleo de las Trojes.....	33
<b>Gráfica 4.</b> Caracterización química del propóleo de las Trojes.....	34
<b>Gráfica 5.</b> Porcentajes de rendimiento de extractos etanólicos del propóleo de Bonilla. ....	35
<b>Gráfica 6.</b> Caracterización química del propóleo de Bonilla. ....	36



## IV. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CMI	Concentración mínima inhibitoria
ECV	Enfermedades cardio-vasculares
EEP	Extracto etanólico de propóleo
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
EtOH	Etanol
°C	Grados centígrados
g.	Gramos
HPLC	High-performance liquid chromatography
MeOH	Metanol
mg.	Miligramos
min	minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
nm	Nanómetros



---

OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
$t_R$	Tiempo de retención
TFA	Ácido trifluoroacético
UFC	Unidades Formadoras de Colonias



# 1. INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto resinoso natural de la colmena, altamente adhesivo, que es colectado, transformado y usado por las abejas para fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores, proteger la entrada contra los intrusos, rellenar las grietas y hendiduras dentro de la colmena (Palomino, 2009; Burdock, 1988). Esta resina es el arma química más importante que poseen las abejas para combatir a los microorganismos patógenos, de hecho los propóleos son considerados responsables de la baja incidencia de bacterias dentro de las colmenas, por tal motivo, el propóleo ha sido utilizado por los seres humanos como remedio por sus propiedades farmacológicas desde tiempos ancestrales (Bankova *et al.*, 2000; Ghisalberti, 1978).

Este producto posee efectos benéficos en la salud por lo que se ha usado ampliamente, especialmente en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades. Su composición depende de la zona de recolección, el método de recolección, la época, la flora, entre otros factores.

En la actualidad se permiten detectar un número cada vez mayor de compuestos del propóleo, comprobándose que la variabilidad en la composición es muy elevada, por lo que se considera necesario persistir con los estudios para un mejor conocimiento de sus componentes (Murat *et al.*, 2002), los cuales pueden ser determinados por una gran variedad de métodos, dentro de los que destacan: reacciones colorimétricas, cromatografía de gases, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y HPLC, donde se pueden encontrar flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, así como nuevos componentes que ratifican sus funciones biológicas (Hsiang *et al.*, 2005).

En otros estudios se ha investigado su efecto contra las caries y como enjuague en la inhibición de la formación de placa (Koo *et al.*, 2003). La actividad antibacteriana se atribuye principalmente a la presencia de flavonoides y derivados del ácido caféico (Bosio *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha encontrado que propóleos brasileños y búlgaros tienen actividad antibacteriana por la acción de algunos de sus componentes como son flavonoides, terpenoides y derivados de ácidos grasos.



Por último, es importante mencionar que el propóleo, a partir de sus compuestos, inhibe a las glucosiltransferasas, enzimas producidas por *Streptococcus mutans*, microorganismo asociado a la aparición de las caries (Koo *et al.*, 2003).

En el presente trabajo, se muestra la importancia que tiene el método de recolección, y extracción para obtener mayor cantidad de algún componente del propóleo, ya sea cera, bálsamo o resina que se necesite para extraer de ahí algún compuesto de interés.

Por lo tanto, se analizan tres propóleos recolectados en épocas decembrinas de diferentes zonas de la Delegación Milpa Alta (Apiario de Valentín, Apiario las Trojes y Apiario de Bonilla) por el método de la malla y se cuantificaron la cantidad de cera, bálsamo y resina observando la variedad en la composición de este producto aún estando en zonas no muy lejanas entre sí.

Así como también se muestran los resultados de porcentajes de rendimiento al obtener extractos etanólicos de los mismos propóleos secos a partir de tres métodos de extracción diferentes: maceración, sonicación y soxhlet, con diferentes concentraciones de etanol-agua: 96% etanol, 50% etanol y 70% etanol.

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

Con los resultados obtenidos de los extractos etanólicos, se realizó una comparación entre los rendimientos obtenidos, variando factores como concentración de disolvente, método de extracción y zona geográfica de recolección de los propóleos.

A partir de dichos extractos etanólicos se evaluó el efecto sobre el crecimiento de bacterias patógenas de la cavidad oral y algunas veces causantes de ECV, las bacterias con las que se realizó el análisis son: *Streptococcus mutans*.

Por otra parte también se determinaron algunos flavonoides presentes en cada extracto a partir de un método analítico de separación que es HPLC, los flavonoides determinados fueron: acacetina, pinocembrina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. GENERALIDADES

#### 2.1.1. DEFINICIÓN

La palabra propóleo se deriva del griego “*pro*” (defensa de) y “*polis*” (ciudad o colmena), significa en defensa de la colmena (Salatino *et al.*, 2011; Bankova *et al.*, 2000). Es un producto natural de la colmena, producido por las abejas, las cuales recolectan resinas balsámicas secretadas por distintos árboles y plantas para después mezclarlas con cera y secreciones salivales propias (Kuropatnicki *et al.*, 2013; Vecchi, 2007).

#### 2.1.2. CARACTERÍSTICAS

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

#### 2.1.3. COMPOSICIÓN

Este producto es una mezcla compleja compuesta aproximadamente de 50% de resina y bálsamo, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de desechos orgánicos, estas proporciones dependen en gran medida de la época del año cuando se hizo la recolecta del material vegetal. Además, se han identificado como los principales componentes de propóleo: fenoles, ácidos grasos, aldehídos, flavonoides, esteroides, aminoácidos, lignanos, ácidos aromáticos, polisacáridos, ésteres aromáticos, cetonas, vitaminas, minerales, entre otros compuestos. Estos componentes dependen principalmente de la fuente natural donde las abejas realizaron la recolecta del material vegetal (Toreti *et al.*, 2013; Pappoti *et al.*, 2012; Cirasino *et al.*, 1987).

Las ceras y restos orgánicos que no ofrecen acciones terapéuticas o biológicas de gran relevancia, son removidos usualmente durante el proceso de extracción etanólica ya que el etanol no tiene la capacidad de extraer ceras, sin embargo, el bálsamo y resina se extraen fácilmente con este disolvente.

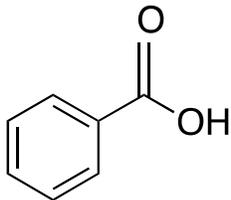


El bálsamo y la resina obtenidos contienen la mayor parte de los componentes bioactivos del propóleo. Hasta la fecha se han identificado más de 300 componentes, entre ellos polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, esteres, aldehídos fenólicos, alcoholes y cetonas), terpenos (principalmente sesquiterpenos), esteroides, azúcares y aminoácidos, siendo los compuestos fenólicos los más abundantes. Entre los ácidos aromáticos identificados se encuentran el caféico, ferúlico, isoferúlico, benzoico y sinápico (Viuda *et al.*, 2008).

Los compuestos anteriores son los que le confieren la variedad de actividades farmacológicas observadas (Granados, 2014) y su abundancia se ve influenciada por factores como la fuente botánica y geográfica así como la temporada de recolección (Falçao, 2010; Ahn *et al.*, 2007; Bankova *et al.*, 2000; Kujumgiev *et al.*, 1999).

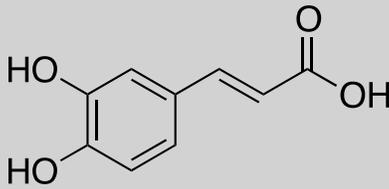
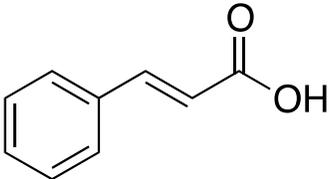
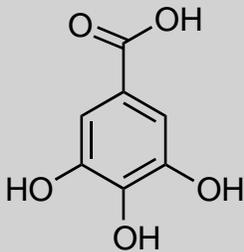
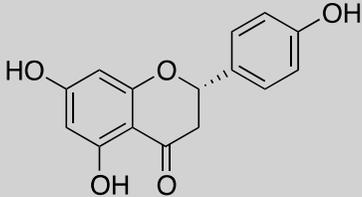
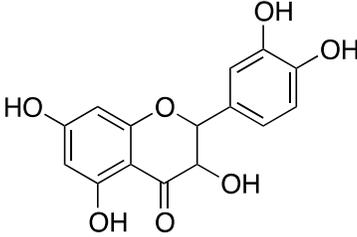
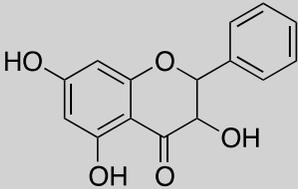
En el **Cuadro 1**. Se muestran algunos de los compuestos aislados a partir del propóleo.

**Cuadro 1.** Compuestos aislados a partir del propóleo (Koru *et al.*, 2007).

COMPUESTO	ESTRUCTURA
<b>COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	
Ácido benzoico	

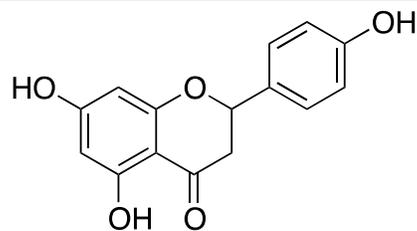


Cuadro 1. Compuestos aislados a partir del propóleo (continuación).

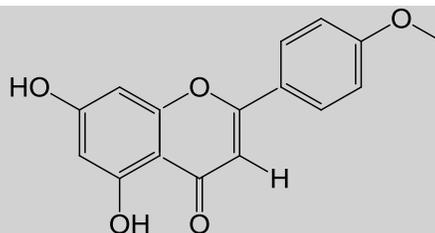
COMPUESTO	ESTRUCTURA
Ácido caféico	
Ácido cinámico	
Ácido gálico	
<b>FLAVONOIDES</b>	
Naringenina	
Quercetina	
Galangina	



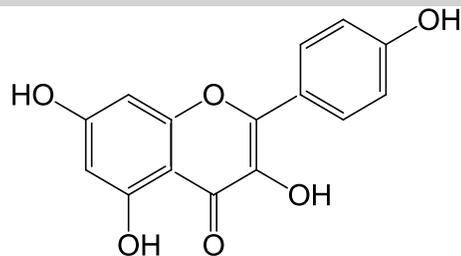
Apigenina



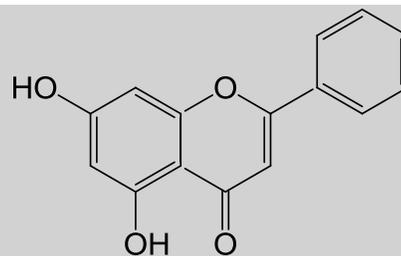
Acacetina



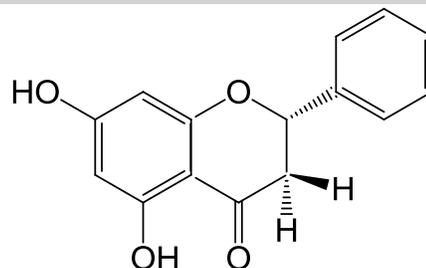
Canferol



Crisina

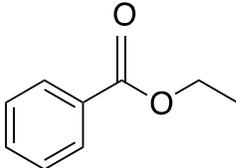
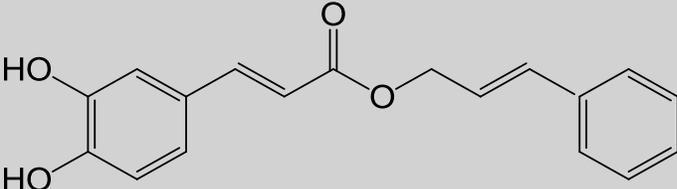
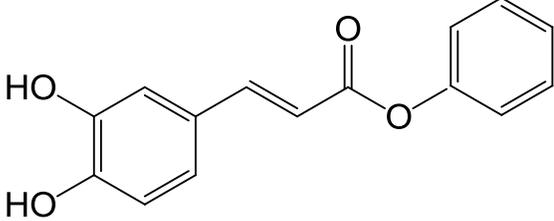
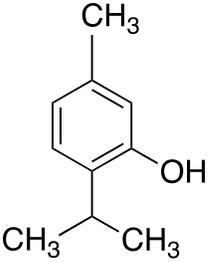
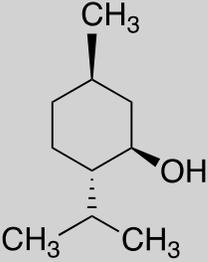


Pinocembrina





Cuadro 1. Compuestos aislados a partir del propóleo (continuación).

COMPUESTO	ESTRUCTURA
<b>ÉSTERES</b>	
Benzoato de etilo	
Cafeato de cinamilo	
Cafeato de fenilo	
<b>TERPENOS</b>	
Timol	
Mentol	

**Cuadro 1.** Compuestos aislados a partir del propóleo (continuación).

COMPUESTO	ESTRUCTURA
<b>AZÚCARES</b>	
<b>D-fructuosa</b>	
<b>Sacarosa</b>	
<b>Sorbosa</b>	

De los compuestos anteriores, a los flavonoides se les atribuye la mayor actividad terapéutica y biológica, principalmente a: la galangina, pinocembrina y quercetina (Coneac *et al.*, 2008).

Se les llama flavonoides ya que los primeros que se aislaron tenían un color amarillo (del latín *flavus* que significa “amarillo”), aunque en la actualidad se han encontrado flavonoides de colores rojos, violetas y azules (Niraldo, 2005). Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales, a través de la ruta del ácido siquímico y la ruta de los policétidos. Se pueden realizar diversos ensayos de identificación para flavonoides como los siguientes: La reacción de la cianidina (magnesio en medio clorhídrico) permite distinguir algunos tipos de flavonoides de acuerdo a su coloración: naranja con las flavonas, rojo con los Flavonoles y violeta con las Flavanonas; Las técnicas cromatográficas son muy utilizadas para la caracterización de flavonoides; Los espectros UV de los flavonoides son muy característicos y precisos para su identificación;



actualmente se utilizan otras técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN), resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) y la espectrometría de masas (MS); La cuantificación por HPLC se lleva a cabo por medio de una curva de calibración con patrón externo (Villar del Fresno, 1999).

## 2.2. APIARIOS ESTUDIADOS

Los apiarios estudiados se encuentran en la Delegación Milpa Alta, en dicho lugar el clima se torna más frío y húmedo a medida que asciende la altitud. La mayor parte de su territorio, es decir, en las laderas de la sierra, el clima es semifrío y subhúmedo, con abundantes lluvias en verano. Otra fracción de casi el 30% del total del territorio que corresponde al Valle de Milpa Alta y las laderas bajas de la serranía presenta un clima templado, con lluvias en verano. El Valle de Milpa Alta es ligeramente más seco que las laderas serranas, con una temperatura promedio de  $14^\circ\text{C}$ . La región más húmeda y fría de Milpa Alta es la cumbre del Volcán Chichinauhtzin y el Volcán Tláloc, donde las lluvias son muy abundantes y la temperatura promedio es de  $8^\circ\text{C}$  (INEGI, 2002).

### 2.2.1. UBICACIÓN

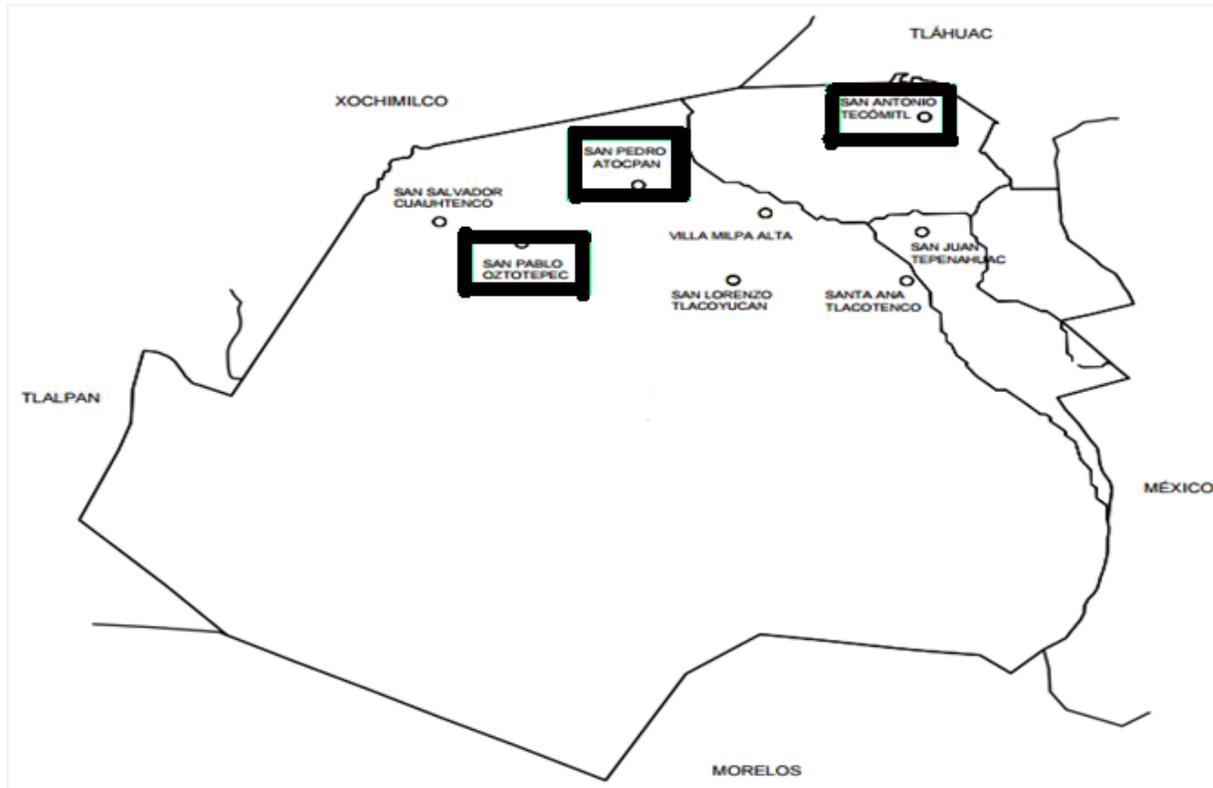


Figura 1. Ubicación geográfica de los Apiarios estudiados en la Delegación Milpa Alta. Fuente inegi.org.mx

**Cuadro 2.** Ubicación de los Apiarios estudiados.

<b>APIARIO</b>	<b>UBICACIÓN</b>	<b>m.s.n.m</b>
Bonilla	Delegación Milpa Alta, Ciudad de México. Poblado de San Pablo Oztotepec.	2240
Trojes	Delegación Milpa Alta, Ciudad de México. Poblado de San Antonio Tecómitl.	2420
Valentín	Delegación Milpa Alta, Ciudad de México. Poblado de San Pedro Atocpan.	2410

**2.2.2. FLORA CERCANA**

Pocas personas imaginarían que al interior de la ciudad, en una de sus Delegaciones, existe un sitio con más de 16 mil 500 hectáreas de bosque, principalmente de los elegantes oyameles, pinos y encinos.

San Pablo Oztotepec (Apiario de Bonilla), es un lugar situado en la cordillera del sur de la Ciudad de México, y está rodeado por grandes árboles; de pino, de oyamel, ocote, encino y una amplia vegetación donde se siembra maíz, haba, chícharo, nopal, y árboles frutales, como la pera, el durazno, el tejocote y los nogales.

En san Antonio Tecómitl (Apiario de Trojes), el clima del lugar es templado semi-húmedo con precipitación pluvial media, lo que hace que sea un terreno propicio para el cultivo. Cerca del poblado se puede encontrar gran variedad de vegetación, entre los cuales abundan principalmente las nopaleras, cedros, oyamel, madroños, encino, pinos, palo loco y yuca.

San Pedro Atocpan (Apiario de Valentín), uno de los pueblos originarios de Milpa Alta, el cual cuenta con una amplia vegetación, dentro de ésta se encuentran magueyes de la especie *Agave ferox*, encinos, pinos, oyameles y el ocote. (SEDUVI, 2010).



### 2.3. ASPECTOS HISTÓRICOS

El propóleo es conocido ya desde la más remota antigüedad y ha sido utilizado por diferentes culturas con finalidades distintas.

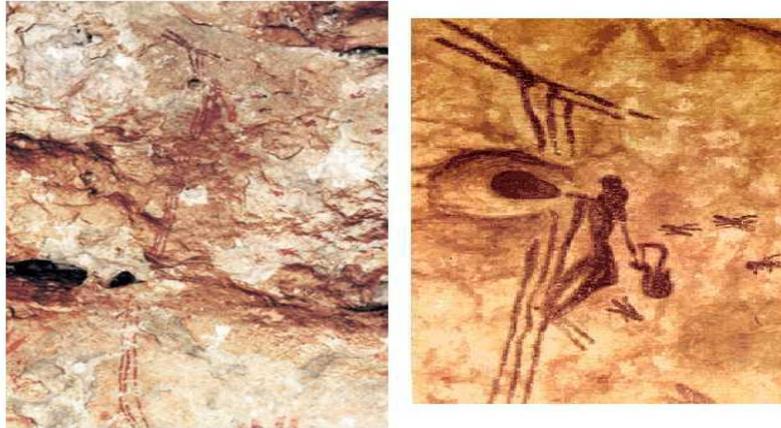
Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse. Actualmente ha resurgido el uso de este producto y se investigan sus acciones, efectos y usos en distintos campos (Farré *et al.*, 2004).

La referencia más lejana del propóleo data del antiguo Egipto, donde era bien conocido por los sacerdotes, quienes tenían el poder de embalsamar cadáveres, dentro de ésta disciplina, el propóleo era una de las sustancias más utilizadas, de hecho las momias se han conservado hasta nuestros días gracias entre otras cosas, a los propóleos (Domínguez, 2009).



**Figura 2.** Representación del embalsamamiento de un cadáver en el antiguo Egipto. Obtenida de [dranaturaleza.wordpress.com](http://dranaturaleza.wordpress.com)

Otro dato interesante es la actividad apícola que se practicaba en la Península Ibérica, mostrada en las pinturas rupestres encontradas en las “Cuevas de Las Arañas”, en Bicorp (Valencia-España). Los expertos que han estudiado las mencionadas pinturas, mencionan una antigüedad aproximadamente de unos 10,000 años, ya desde entonces el ser humano buscaba la forma de obtener el denominado “oro dulce” pues en aquella época, además de ser el único edulcorante que se usaba, también era utilizado como ungüento para curar heridas e incluso también en la economía del trueque. (Correa *et al.*, 2004)



**Figura 3.** Pintura rupestre en "la cueva de las arañas" donde se muestra a un individuo recolectando miel de un panal. Obtenida de laorzaiberica.files.wordpress.com

Los incas, lo utilizaban en el periodo precolombino para tratar los procesos inflamatorios febriles y las heridas infectadas. Pensadores y médicos de culturas griegas y romanas como Aristóteles, Galeno y Dioscórides, observaron que poseía propiedades antiinflamatorias, por lo cual fue utilizado para el tratamiento de heridas, úlceras y abscesos (Castaldo *et al.*, 2007).

Los hebreos lo mencionan como bálsamo de Galaad o simplemente "tzori", al igual que la miel, el trigo y el aceite, era un producto de gran importancia en el comercio de los antiguos reinos de Judá e Israel (Kuropatnicky *et al.*, 2013)

Se empleaban los propóleos también en los procesos de trepanaciones de cráneo que se practicaban en la Edad de Bronce, también lo usaban como remedio contra quemaduras, y malestares por infecciones (Wollenweber *et al.*, 1990).

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

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



Famosos artesanos italianos de los siglos XVII y XVIII, trataban y barnizaban con aceites de propóleos la madera de los instrumentos musicales (Crane, 1999). También durante el siglo XVII, la farmacopea Inglesa incluyó el propóleo en el listado de medicamentos oficiales (Castaldo y Capasso, 2002).

Durante la guerra anglo-boer (1899-1902) en África del Sur, se usaba “propóleo vasógeno” que era propóleo con vaselina con lo que impregnaban vendas para curar heridas e impedir gangrenas (Martínez, 2008).

#### **2.4. PRODUCCIÓN DE PROPÓLEO POR *Apis mellifera*.**

La forma en que las abejas (*Apis mellifera*) recolectan resina para producir propóleo puede parecer sencilla pero en realidad es un proceso complicado y requiere una gran disciplina y trabajo duro.

Principalmente se recolecta durante las horas más cálidas del día y en épocas de otoño-invierno cuando se acercan los primeros fríos (Martínez, 2010). Cuando la abeja encuentra partículas resinosas en una yema de árbol, la desprende valiéndose de sus mandíbulas y sus patas delanteras, ésta labor es bastante dura, pero la secreción de las glándulas mandibulares tiene sustancias que permiten el ablandamiento de la resina, luego de esto, la abeja tritura con sus mandíbulas el pedazo arrancado y, utilizando una de las patas traseras lo transfiere a la cestilla de la segunda pata trasera, ésta operación se puede llevar a cabo estando aún sobre la yema del árbol o bien en pleno vuelo. A continuación llena la cestilla de la otra pata. Para llenar los dos cestillos, la abeja emplea de 30 a 60 minutos, dependiendo de la temperatura del ambiente, si éste es cálido la abeja manipula mucho más rápido la recolección del propóleo. Cuando la abeja completa su carga vuelve a la colmena y espera a que otras abejas la ayuden a descargar, entonces las abejas obreras van tomando la resina de los cestos de la abeja pecoreadora, lo amasan con cera y secreciones salivales propias para obtener el propóleo y posteriormente lo colocan en algún lugar ya destinado (Martínez, 2008; Peña, 2008; Farré *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.*, 2003; González y Bernal, 2002; Lin *et al.*, 1999).



**Figura 4.** Abeja pecoreadora llevando en sus canastillas de las patas traseras resina recolectada, a la colmena para ser transformada a propóleo por abejas obreras (Ángel López Ramírez).

Una colonia de abejas puede recoger anualmente entre 100 y 400 g. de propóleo, dependiendo de sus necesidades, de la raza de abejas y de las condiciones climáticas del año. Lo recolectan principalmente de los pinos, álamos, castaños, abedules, enebros, robles, avellanos, encinos, etc. (Lesser 1997).



**Figura 5.** *Apis mellifera* colectando resina de árboles y plantas para producir propóleo en la colmena (Daugusch et al., 2008).



## 2.5. MÉTODOS DE COSECHA

El propóleo se recoge mediante métodos como: raspado, rejillas, placas plásticas y mallas.

### 2.5.1. MÉTODO DE RASPADO

El propóleo se recoge en bruto de la colmena raspando las paredes con una espátula. También se utilizan rejillas especiales que al introducirse en la colmena, las abejas obreras propolizan. Posteriormente, se extraen y se retira el propóleo. Es un método que resulta bastante engorroso e inconveniente, pues las valiosas propiedades de este producto pueden ser disminuidas (Reyna, 2013), además de que el propóleo puede contaminarse con astillas (Correa *et al.*, 2004).



Figura 6. Cosecha de propóleo por método de raspado (Ángel López Ramírez).

### 2.5.2. MÉTODO DE REJILLAS

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



Figura 7. Uso de rejillas para la recolección de propóleo (Ángel López Ramírez).

### 2.5.3. MÉTODO DE PLACAS PLÁSTICAS

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



Figura 8. Recolección de propóleo por el método de placas plásticas (Ángel López Ramírez).



#### 2.5.4. MÉTODO DE LA MALLA

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



**Figura 9.** Obtención de propóleo por el método de la malla (Ángel López Ramírez).



## 2.6. USOS

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



**Figura 10.** Se muestran algunos de los productos que se elaboran a partir del propóleo (Alejandra López).

## 2.7. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

Se ha comprobado la actividad terapéutica de los propóleos en diversos estudios, tales como su propiedad antibacteriana, que ha sido probablemente la más estudiada, habiéndose comprobado su doble versión, bactericida y bacteriostática, también se ha demostrado su actividad antioxidante, antiviral, antimicótica y cardioprotectora.

También se han reportado actividades antiulcerosas, citostática, hepatoprotectora, inmunomoduladora, espasmolítica, antihipertensiva, regeneradora del tejido cartilaginoso y tejido óseo, además de tener acción desintoxicante en el hígado (Basim *et al.*, 2006; Niraldo, 2005; Burdok, 1998; Marcucci, 1996).

Además, el propóleo es de especial importancia para el estudio de nuevos tratamientos contra enfermedades dentales pues éste inhibe las glucosiltransferasas, enzimas producidas por *Streptococcus mutans*, microorganismo que con mayor frecuencia es causante de enfermedades como las caries (Koo *et al.*, 2003).



### 2.7.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

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

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

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

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

### 2.7.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se han realizado muchas investigaciones sobre la actividad antibacteriana del propóleo y de sus extractos contra cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, con estas investigaciones se ha observado que el propóleo tiene una actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y una actividad antibacteriana limitada contra bacilos Gram negativos (Lotfy, 2006). Se ha descrito que diferentes concentraciones de extracto etanólico de propóleo inhibieron el crecimiento de bacterias Gram-positivas como: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus* (Marcucci, 1996); bacterias Gram-negativas como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (Castaldo *et al.*, 2007;

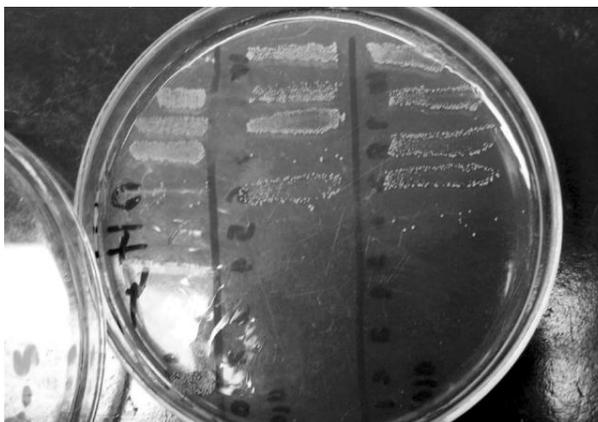


Burdock, 1988), *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes* spp., *Bordetella bronchiseptica* y *Serratia marcescens* (Marucci, 1996).

La actividad antibacteriana de propóleos se atribuye a sus contenidos en ésteres, ácidos aromáticos y flavonoides ya que alteran la estructura membranal y la motilidad de las bacterias. Entre estos últimos compuestos, los que han sido reconocidos como los más eficaces contra las bacterias son la galangina, pinocembrina y pinostrobin.

También el ácido ferúlico y caféico contribuyen a la acción bactericida del propóleo (Farré *et al.*, 2004; Marucci, 1995).

El propóleo es también inhibidor del biofilm, un agregado de microorganismos y polisacáridos llamado glicocálix, que es producido por los mismos microorganismos para adherirse a superficies sólidas (Dunne, 2002). En la cavidad oral, el biofilm es llamado placa dental y es factor importante para la causa de caries, éste biofilm se forma por varios factores dentro de la cavidad oral, como pH, cantidad de sustrato para las bacterias y cantidad de glucoproteínas ácidas que están presentes en la saliva. Las bacterias con mayor capacidad de adherencia dental son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*, que se adhieren al esmalte debido a la producción de polisacáridos extracelulares insolubles (Moreno *et al.*, 2007; Basualdo, 2006).



**Figura 11.** Efecto antimicrobiano *In vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubanos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Moreno *et al.*, 2007).



*Streptococcus mutans*. Son bacterias participantes de lesión de caries inicial en diente. Juegan un papel muy importante en algunas enfermedades por su capacidad de formar biofilm y adherirse a una superficie sólida para colonizar. Es líder superior para crear una de las enfermedades más comunes de la cavidad oral, conocida como caries dental. Las propiedades que permiten que *S. mutans* colonice la cavidad oral incluyen la capacidad de sobrevivir en ambientes ácidos y la interacción específica con otros microorganismos que colonizan éste ecosistema (Krzysciak *et al.*, 2013).

Esta bacteria produce glucosiltransferasas (GTFs), las cuales le dan la capacidad de sintetizar glucanos a partir de sacarosa. Estos glucanos permiten que mediante adherencia *S. mutans* y otras bacterias de la flora de la superficie de los dientes formen la placa dentobacteriana (Pimenta *et al.*, 2004)

*Streptococcus oralis*. Es un patógeno oportunista numéricamente importante de la microbiota oral, aislado a partir de cualquier parte de la cavidad oral, es un microorganismo pionero en la colonización primaria de la dentición. Suele presentarse con múltiples genotipos en la misma persona (Thuy *et al.*, 2009).

*Streptococcus sanguinis*. Es reconocido no solo por su asociación histórica con la endocarditis bacteriana, sino también debido a su papel antagónico con la caries dental y las enfermedades periodontales. Debido a que el potencial cariogénico de *S. sanguinis* se considera bajo con respecto al de *Streptococcus mutans*, varios investigadores han sugerido que la relación entre *S. mutans* y *S. sanguinis* puede servir como un indicador de riesgo, es decir, cuanto menor sea la relación entre éstas bacterias, menor es el riesgo de caries (Page *et al.*, 2000).

### **2.7.3. ACTIVIDAD ANTIVIRAL**

El propóleo ejerce efectos inhibidores frente al virus de la influenza, la viruela, el herpes, reovirus y el virus de la gripe Hong Kong (Hegazi y Abd el Hady, 2002). Esta actividad como los otros biocidas que tiene el propóleo se atribuye a su contenido en compuestos fenólicos. Otros estudios relacionados donde se compara la acción del propóleo contra el aciclovir en herpes genital demostraron que el aplicado tópicamente redujo la inflamación y los síntomas locales de una manera más eficiente (Vynograd *et al.*, 2000).



#### **2.7.4. ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE**

Determinando los niveles de citocinas antes y después de administrar propóleo por vía oral, se ha comprobado la eficacia inmunoestimulante del propóleo, observándose un incremento significativo de la capacidad de secreción de las citocinas (Farré *et al.*, 2004).

Otros estudios con ratones muestran que tras la administración de propóleo a un ratón inoculado con células de carcinoma mamario, producían cambios en su sistema inmunológico, como un aumento de la producción del factor de activación de linfocitos, por macrófagos peritoneales y se observó que la eficacia de dichos macrófagos frente a las células cancerígenas era mayor, quedando aumentados también los mediadores inmunológicos (Orsolid y Basid, 2003).

#### **2.7.5. ACTIVIDAD CARDIOPROTECTORA**

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

Varios investigadores han hablado de las propiedades vasorrelajantes de un gran número de flavonoides debido a diferentes mecanismos (que aún no se aclaran por completo), por ejemplo, Duarte y cols. (1993) encontraron una tendencia de relajación inducida por diferentes flavonoides, siendo más potentes los Flavonoles (Quercetina, campferol), seguidos de las flavonas (luteolina, apigenina), y Flavonoles (catequina, epicatequina), teniendo como principal mecanismo de la relajación la inhibición de la proteína cinasa C.



### 3. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país existe la necesidad de encontrar nuevas formas para tratar o prevenir diversas enfermedades que agobian a la humanidad, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares (ECV) o de la cavidad oral, así como implementar el uso de productos naturales en diferentes industrias como la farmacéutica, alimentaria y cosmética, ya que con esto se asegura la disminución de las reacciones adversas que pueden causar los productos químicos. Sin embargo, en México no se cuenta con información suficiente sobre la composición química ni actividad biológica de los propóleos mexicanos, o alguna especificación que indique algún método por el que deba extraerse el propóleo para un buen rendimiento, ni una forma estándar por la cual se extraiga mayor cantidad de bálsamo, que es la parte del propóleo que contiene mayor cantidad de compuestos terapéuticos, lo cual es necesario para establecer regulaciones y parámetros de calidad que sirvan para que las instituciones regulatorias realicen un control de calidad de dichos productos.

Por ésta razón y debido a que las autoridades sanitarias han prestado poca atención al desarrollo de remedios y medicamentos herbolarios de calidad y a que las características químicas del propóleo son altamente variables, pues dependen de múltiples factores ambientales y de extracción, es necesario implementar normas de estandarización para las técnicas de extracción de los extractos de propóleo, ya que por sus propiedades los productos elaborados con propóleo son usados ampliamente por la sociedad, con esto se podrá garantizar la actividad biológica y/o terapéutica de los mismos, que posteriormente serán usados en industrias cosméticas, farmacéuticas y alimentarias.

Por lo mencionado anteriormente y debido a que el propóleo mexicano ha recibido poca atención y existen muy pocos estudios sobre éstos productos, el presente proyecto se enfoca principalmente al enriquecimiento de la información de los propóleos inclinada hacia la investigación de la composición química de propóleos recolectados y la determinación de un método de extracción por el cual se optimicen los porcentajes de rendimiento.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVOS GENERALES

- Establecer las mejores condiciones de extracción de propóleos recolectados en la Delegación Milpa Alta por el método de la malla.
- Caracterizar químicamente propóleos de la Delegación Milpa Alta mediante la obtención de sus ceras, bálsamos y resinas.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar los extractos etanólicos de los propóleos por diferentes métodos de extracción y concentraciones de disolvente.
- Realizar modelos factoriales para determinar las mejores condiciones con las que se obtiene un mayor porcentaje de rendimiento de cada propóleo.
- Caracterizar y cuantificar el contenido de cera, bálsamo y resina de los propóleos recolectados en la Delegación Milpa Alta.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólicos de los propóleos, utilizando como microorganismo de prueba a las bacterias *Streptococcus mutans*.
- Determinar flavonoides presentes en los extractos por el método de HPLC.



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. COSECHA DEL MATERIAL VEGETAL

Las muestras de propóleo utilizadas fueron recolectadas por personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia durante épocas decembrinas por el método de la malla, en los apiarios de Valentín, Las Trojes y Bonilla, ubicados en la Delegación Milpa Alta. Una vez obtenido el material vegetal, se dejó secar, se pulverizó y posteriormente, se refrigeró a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

#### 5.2.1. EXTRACTO ETANÓLICO OBTENIDO POR MACERACIÓN

Se pesaron en balanza analítica 2 g. de propóleo seco y pulverizado en tres matraces erlenmeyer diferentes (cada muestra se realizó por triplicado) con las siguientes concentraciones de EtOH:

Matraz 1: 96% EtOH (50 mL)

Matraz 2: 70/30 EtOH/agua (35 mL etanol, 15 mL agua)

Matraz 3: 50/50 EtOH/agua (25 mL etanol, 25 mL agua)

Todas las muestras se dejaron macerando ocho días. Transcurridos esos días, se filtró el extracto al vacío con ayuda de un embudo Büchner, matraz Kitasato y papel filtro, posteriormente se concentró a presión reducida en rotavaporador hasta sequedad y se resuspendió con metanol, este producto se transfirió a un vial previamente pesado. Se dejó evaporar el disolvente y luego se pesó nuevamente el vial más el extracto para calcular el porcentaje de rendimiento.



### 5.2.2. EXTRACTO ETANÓLICO OBTENIDO POR SONICACIÓN

Se pesaron en balanza analítica 2 g. de propóleo seco y pulverizado en tres matraces erlenmeyer diferentes (cada muestra se realizó por triplicado) con las siguientes concentraciones de EtOH:

Matraz 1: 96% EtOH (50 mL)

Matraz 2: 70/30 EtOH/agua (105 mL etanol, 45 mL agua)

Matraz 3: 50/50 EtOH/agua (75 mL etanol, 75 mL agua)

Cada muestra se extrajo en un baño ultrasónico con el equipo de sonicación por diez minutos, luego se filtró el extracto al vacío con la ayuda de un embudo Büchner, matraz Kitasato y papel filtro, posteriormente se concentró a presión reducida en rotavaporador hasta sequedad y se resuspendió con metanol, éste producto se transfirió a un vial previamente pesado. Se dejó evaporar el disolvente y luego se volvió a pesar el vial más el extracto para calcular el porcentaje de rendimiento.

### 5.2.3. EXTRACTO ETANÓLICO OBTENIDO POR SOXHLET

Se pesaron en balanza analítica 2 g. de propóleo seco y pulverizado en tres sobres de papel filtro diferentes (cada muestra se realizó por triplicado). Y en el matraz de bola se agregaron las siguientes concentraciones de disolvente:

Matraz 1: 96% EtOH (150 mL)

Matraz 2: 70/30 EtOH/agua (35 mL etanol, 15 mL agua)

Matraz 3: 50/50 EtOH/agua (25 mL etanol, 25 mL agua)

Cada muestra se extrajo con un equipo de soxhlet por dos horas, después de esto se filtró el extracto al vacío con ayuda de un embudo Büchner, matraz Kitasato y papel filtro, posteriormente se concentró a presión reducida en rotavaporador hasta sequedad y se resuspendió con metanol, este producto se transfirió a un vial previamente pesado. Se dejó evaporar el disolvente y se volvió a pesar el vial más el extracto para luego calcular el porcentaje de rendimiento.



### 5.3. DISEÑO FACTORIAL 2<sup>3</sup>

Para comprobar las mejores condiciones para obtener los extractos de propóleo se realizaron diseños factoriales 2<sup>3</sup> en los cuales los niveles y factores seleccionados para cada modelo del diseño factorial se muestran en los **Cuadros 3 y 4**.

**Cuadro 3.** Niveles y factores utilizados en diseño factorial para *modelo 1*.

FACTOR	NIVEL BAJO (-)	NIVEL ALTO (+)
A. Tipo de propóleo	Trojes	Valentín
B. Método de extracción	Maceración	Soxhlet
C. % de disolvente.	50%	96%

**Cuadro 4.** Niveles y factores utilizados en diseño factorial para *modelo 2*.

FACTOR	NIVEL BAJO (-)	NIVEL ALTO (+)
A. Tipo de propóleo	Bonilla	Valentín
B. Método de extracción	Sonicación	Soxhlet
C. % de disolvente.	70%	96%

### 5.4. OBTENCIÓN DE CERA (realizado por triplicado)

Se pesaron en balanza analítica 3 g. de propóleo seco y pulverizado y se colocaron en un sobre de papel filtro, enseguida se sometió la muestra a un proceso de extracción continua en un equipo Soxhlet tratándolo con 120 mL de hexano para la extracción, por un tiempo de seis horas. Pasado éste tiempo, se transfirió el extracto hexánico a un matraz evaporador previamente pesado y se concentró a presión reducida, posteriormente se resuspendió el remanente con 120 mL de EtOH al 70%. Una vez teniendo la suspensión, se sometió a un proceso de reflujo hasta obtener una solución clara y entonces enfriar a 0°C durante una hora para promover la separación de las ceras. Terminado éste tiempo se filtró al vacío con papel filtro W. no. 41 previamente pesado y se dejó secar éste junto con el matraz evaporador. Por último se pesaron el papel filtro y el matraz evaporador. La suma de los residuos remanentes corresponde a la cantidad de cera en el propóleo. Procedimiento realizado con base en la metodología de Papotti y colaboradores (2012) con algunas modificaciones.



### **5.5. OBTENCIÓN DE BÁLSAMO (realizado por triplicado)**

El filtrado etanólico al 70% que se obtuvo durante la extracción de ceras se concentró a presión reducida y el residuo acuoso se utilizó para obtener el bálsamo, transfiriéndolo a un embudo de separación y agregándole 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se agitó y colectó la fase orgánica (este proceso se repitió dos veces más y se juntaron las fases orgánicas).

La fase orgánica final colectada se secó con 30 g. de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y consecutivamente se filtro al vacío y se transfirió a un matraz evaporador previamente pesado, se concentró a presión reducida a  $60^\circ\text{C}$  hasta sequedad. Los residuos del matraz es la cantidad de bálsamo. Procedimiento realizado con base en la metodología de Papotti y colaboradores (2012) con algunas modificaciones.

### **5.6. OBTENCIÓN DE RESINA (realizado por triplicado)**

El residuo de propóleo que se trató con hexano en la extracción de cera, se extrae por segunda vez durante seis horas en un equipo de Soxhlet tratándolo con una mezcla de etanol-cloroformo (1:1). El extracto obtenido se transfirió a un matraz de evaporación previamente pesado y se concentró a presión reducida a  $70^\circ\text{C}$  hasta sequedad. Los residuos del matraz corresponden a las resinas. Procedimiento realizado con base en la metodología de Papotti y colaboradores (2012) con algunas modificaciones.

## **5.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **5.7.1. MICROORGANISMO DE PRUEBA**

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

### **5.7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)**

Para reactivar las bacterias, de una suspensión de bacterias conservadas en glicerol se inocularon 50  $\mu\text{L}$  en 5 mL de medio BHI y se incubaron los tubos por un lapso de 24 h, a  $37^\circ\text{C}$ .

Se prepararon soluciones stock de cada extracto pesando 11 mg de cada uno y se llevaron a 2 mL de DMSO-agua (concentración inicial 5.5 mg/mL).

El ensayo se realizó por el método de microdilución en placas de 96 pozos, en todos los anteriores se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI),



posteriormente a la columna número uno se adicionó en las filas desde la A hasta la H 100  $\mu$ L de cada extracto de propóleo, con el multicanal se mezclaron los pozos y se tomaron 100  $\mu$ L pasándolos a la segunda columna, mezclar, tomar 100  $\mu$ L de la segunda columna y pasarlos a la tercera columna, y así hasta llegar a la columna 10, se desecharon los últimos 100  $\mu$ L. En la columna 11 se añadieron 100  $\mu$ L de BHI. En la columna 12 se colocaron 80  $\mu$ L de gluconato de clorhexidina (CHX al 0.12%). En seguida se agregaron de la columna 1 a la 10, 80  $\mu$ L de medio BHI y finalmente se adicionaron 20  $\mu$ L de la solución  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *Streptococcus mutans* a todas las columnas excepto a la número 11. Las placas se incubaron durante 24 h, a 37°C.

Columna 11 control negativo (medio BHI)

Columna 12 control positivo (medio BHI, bacteria y antibiótico)

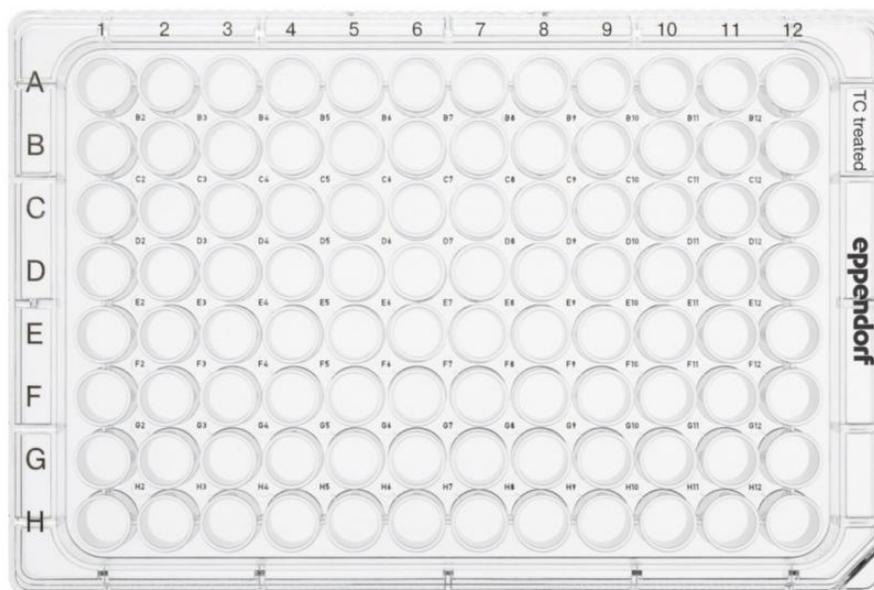


Figura 12. Mapa de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano.



## 5.8. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution.

Se utilizaron estándares de los flavonoides pinocembrina, acacetina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina para determinar éstos mismos en los EEP. El análisis se realizó en una columna XBridge C<sub>18</sub> marca Waters, con un tamaño de partícula de 5 µm, 4.6 mm de diámetro interno y 50 mm de longitud.

El volumen de inyección fue de 10 µl. La elución se realizó con sistema isocrático que consistió en una mezcla binaria constituida por MeOH-Agua con TFA al 0.1% en una proporción 55:45. El flujo utilizado fue de 1 ml/min y la temperatura empleada para dicho análisis fue de 25°C. La longitud de onda empleada para la detección de pinocembrina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina fue de 290 nm, mientras que para la acacetina fue de 340 nm.

### 5.8.1. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

La identificación de los flavonoides en los extractos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y las absorbancias que presentaron cada uno de los estándares con las señales presentes en el cromatograma obtenido con el extracto. Estos estándares se prepararon a una concentración de 1 mg/ml. Todas las muestras se prepararon utilizando como disolvente una mezcla de etanol-acetonitrilo 1:1.



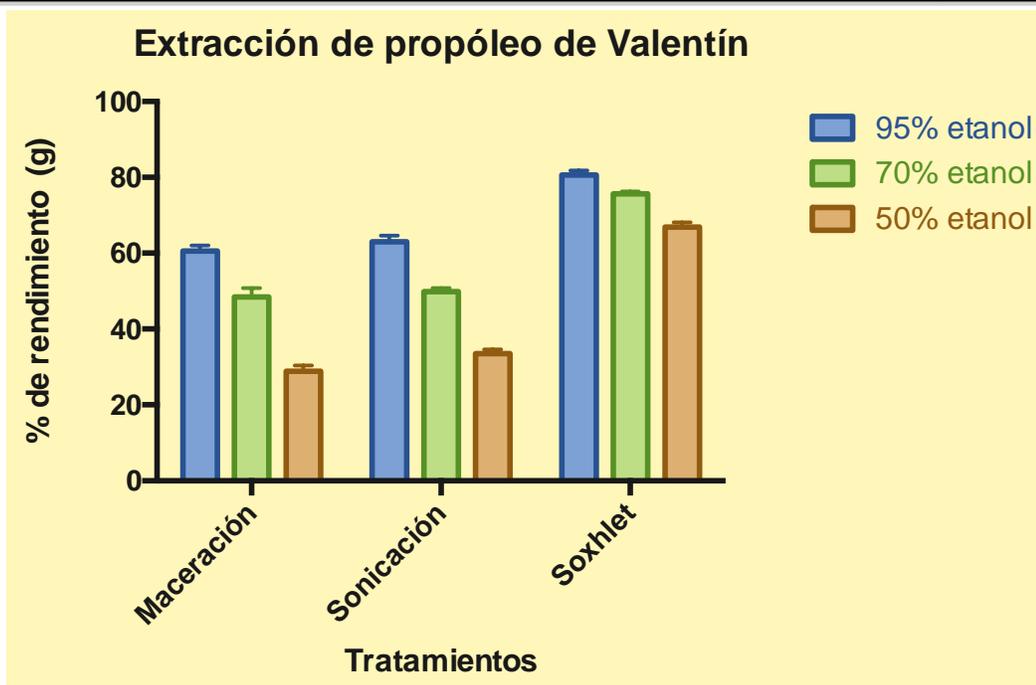
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido al incremento en el uso del propóleo en los últimos tiempos es necesario implementar un método por el cual se obtengan buenos porcentajes de rendimiento de extractos de propóleo, por lo cual en el presente trabajo se exploraron diferentes formas de extracción y proporción de etanol para preparar extractos de propóleo. Las muestras de propóleo de tres apiarios ubicados en la Delegación Milpa Alta se extrajeron utilizando tres métodos diferentes (Soxhlet, sonicación y maceración) y diferentes porcentajes de disolvente (96% etanol, 70% etanol y 50% etanol) con el fin de determinar las mejores condiciones de extracción para obtener extractos activos o en mejores rendimientos.

Como ya se mencionó en la sección de antecedentes, los extractos del propóleo tienen una composición variable debido a factores ambientales y a los tipos de extracción utilizados en su producción. De acuerdo a Papotti y cols. (2012) el propóleo se caracteriza por contener 50% de bálsamo y resina, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% polen y 5% de otros compuestos orgánicos. Otros estudios describen la composición química de los propóleos brasileños, argentinos y chinos. Sin embargo, para los propóleos mexicanos no existen estudios que hayan determinado la composición química.

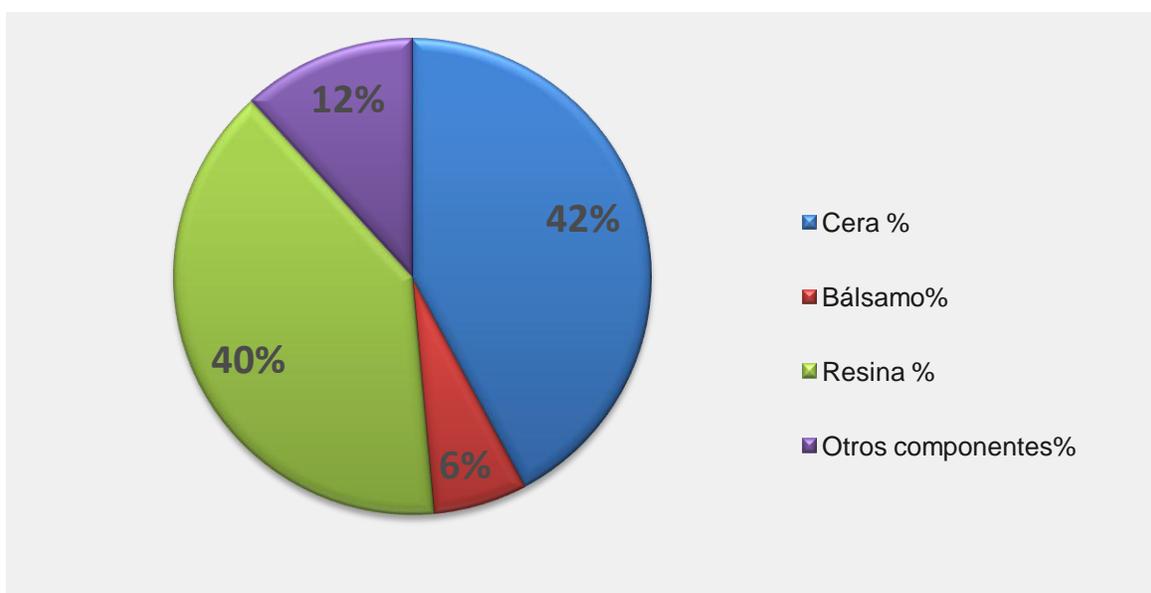
### 6.1. PROPÓLEO DE VALENTÍN

El primer parámetro que se determinó en este estudio fue el rendimiento de los extractos. Los rendimientos obtenidos para el propóleo de Valentín se muestran en la **Gráfica 1** y se calcularon al realizar un cociente entre la cantidad de extracto seco obtenido en los diferentes tratamientos y la cantidad de propóleo crudo extraído. En la gráfica se puede observar que el método de Soxhlet permite obtener los mejores porcentajes de rendimiento, seguido de los métodos de sonicación y maceración. También se puede determinar la importancia que tiene la proporción de disolvente utilizada al realizar los extractos, siendo el porcentaje más alto de etanol (96%) con el que se logran mejores rendimientos en los tres métodos de extracción. Por el contrario, la proporción de disolvente con la que se obtienen los rendimientos más bajos de extracto de propóleo en los tres métodos de extracción es con etanol al 50%.



**Gráfica 1.** Porcentajes de rendimiento de extractos etanólicos del propóleo de Valentín.

La composición química del propóleo de Valentín se muestra en la **Gráfica 2**, en la cual se observa que éste propóleo contiene mayoritariamente ceras y resinas. Estos resultados son congruentes con los descritos por Papotti y cols. (2012). En los propóleos italianos donde estudiaron que la composición de ceras, bálsamos y resinas era de 30 y 50 % (entre bálsamos y resinas), respectivamente.



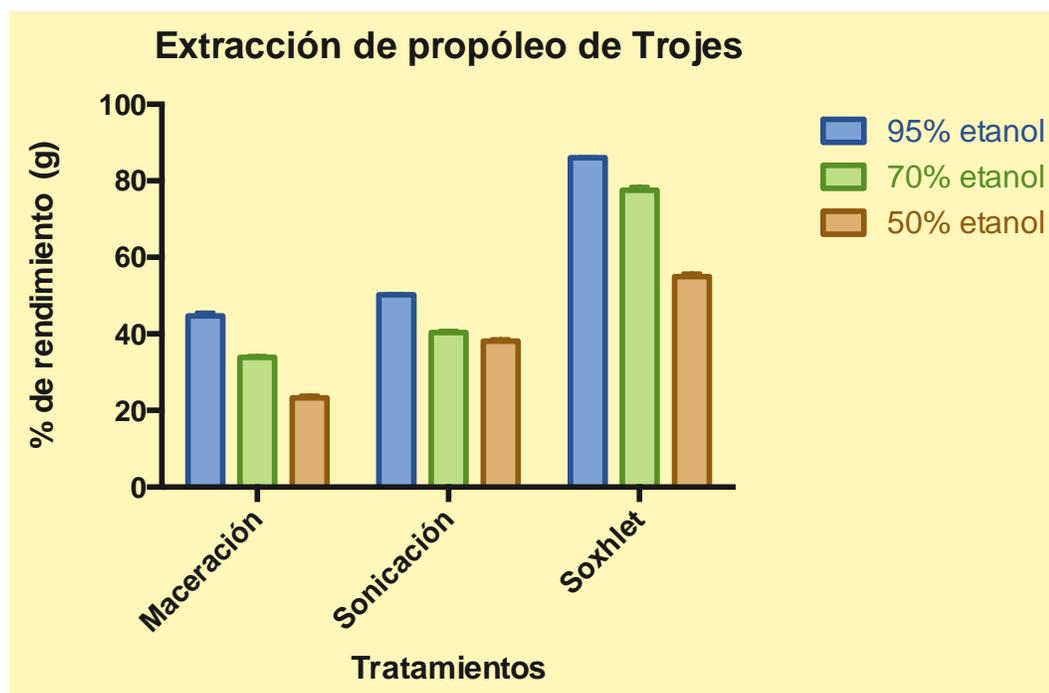
**Gráfica 2.** Caracterización química del propóleo de Valentín.



## 6.2. PROPÓLEO LAS TROJES

La comparación de los porcentajes de rendimiento obtenidos al realizar extracciones con diferentes concentraciones de disolvente y diferentes métodos de extracción del propóleo de las Trojes se muestra en la **Gráfica 3**, en la cual de igual manera que con el propóleo de Valentín, se logró determinar que las mejores condiciones de extracción para obtener buenos porcentajes de rendimiento son el método de Soxhlet y etanol al 96% como disolvente.

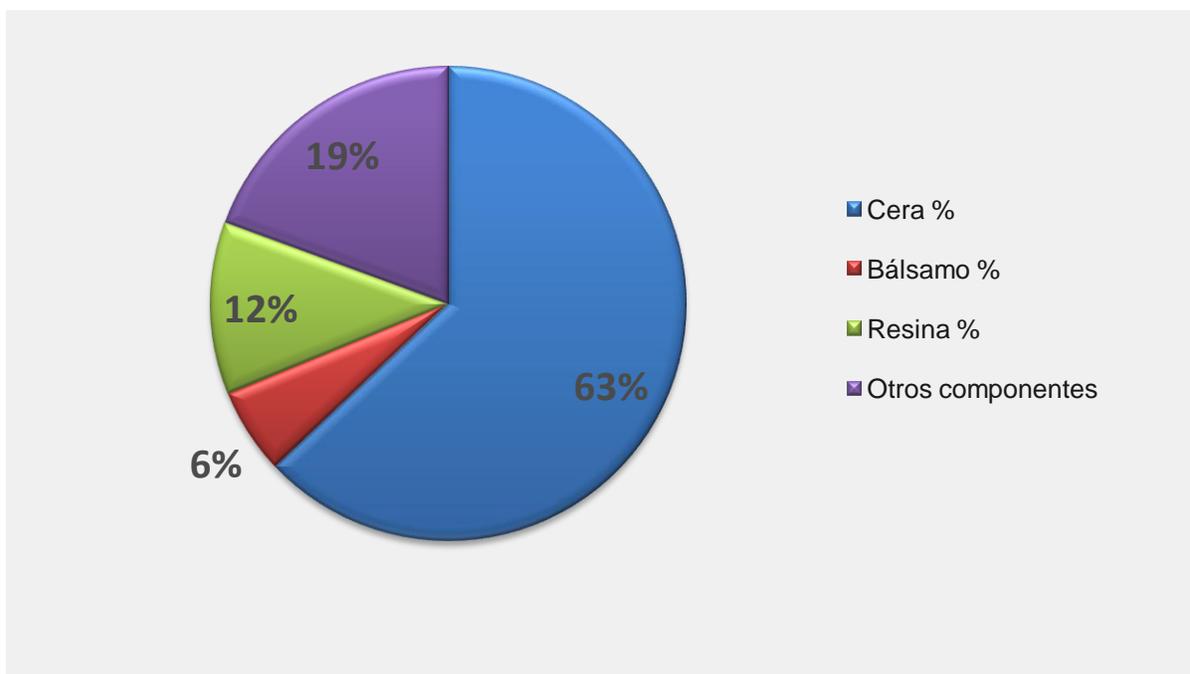
Por otra parte, los porcentajes de rendimiento más bajos se obtienen al extraer el propóleo con el método de maceración y con una proporción de etanol al 50%, estas condiciones también concuerdan con las condiciones menos recomendables para extraer el propóleo de Valentín.



**Gráfica 3.** Porcentajes de rendimiento de extractos etanólicos del propóleo de las Trojes.



En la **Gráfica 4** se muestra la composición química del propóleo de las Trojes, observando de aquí una mayor concentración de ceras con respecto a los otros componentes de éste propóleo. La abundancia de ceras obtenida para este propóleo es mayor a la obtenida para el propóleo de Valentín y a la descrita por Papotti y cols (2012). Por otra parte, la cantidad de resina es menor a la obtenida para el propóleo Valentín y las cantidades de bálsamo de mantuvieron constantes.

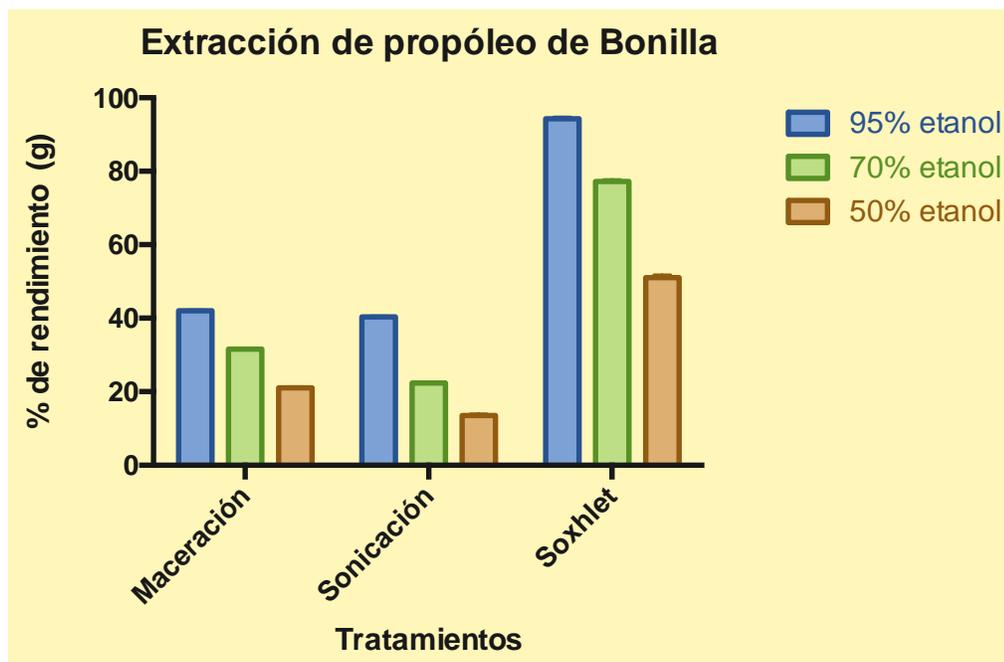


**Gráfica 4.** Caracterización química del propóleo de las Trojes.



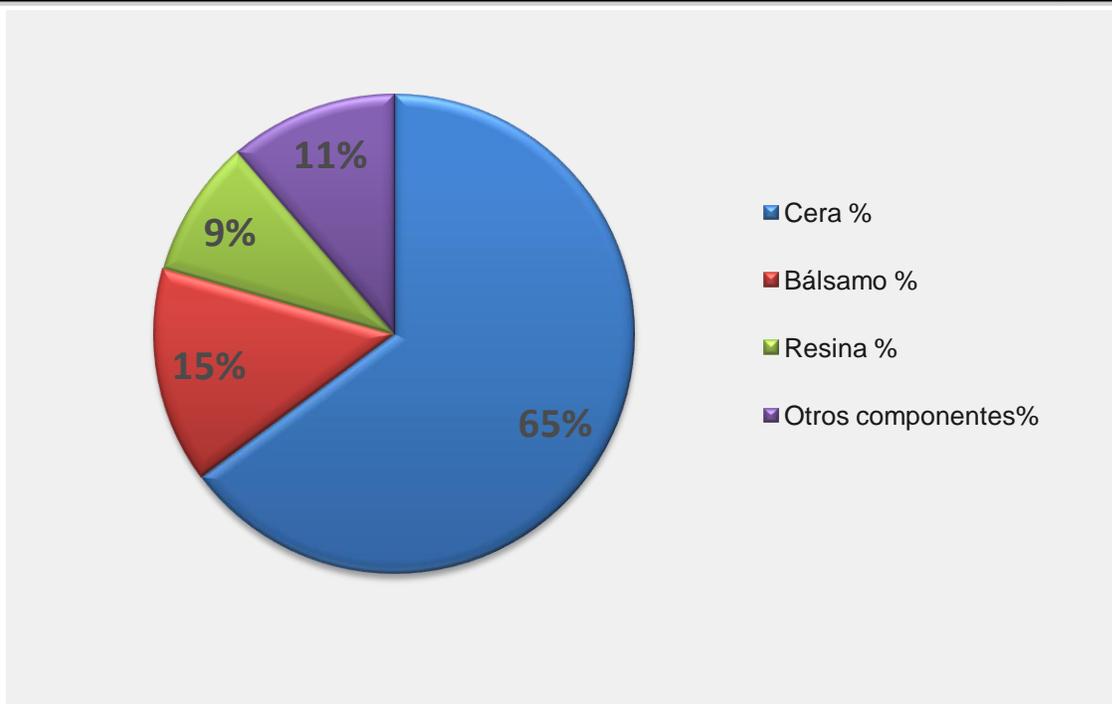
### 6.3. PROPÓLEO DE BONILLA

La comparación de los porcentajes de rendimiento del extracto etanólico obtenidos al realizar extracciones con diferentes concentraciones de disolvente y diferentes métodos de extracción del propóleo de Bonilla se observan en la **Gráfica 5**. En este propóleo las mejores condiciones de extracción fueron utilizando el método Soxhlet y etanol al 96%.



**Gráfica 5.** Porcentajes de rendimiento de extractos etanólicos del propóleo de Bonilla.

La composición química del propóleo de Bonilla se representa en la **Gráfica 6**. La composición de éste propóleo se asemeja a la del propóleo de las Trojes en el que la mayor parte son ceras y los bálsamos y resinas se encuentran en menor cantidad. Sin embargo, existen marcadas diferencias con lo reportado en la literatura por Papotti y cols. (2012) para los propóleos de las regiones templadas y con el propóleo de Valentín.



**Gráfica 6.** Caracterización química del propóleo de Bonilla.

Las tres muestras de propóleo estudiadas fueron recolectadas en la Delegación Milpa Alta, sin embargo, los propóleos de las Trojes y Bonilla presentan diferencias en su composición de ceras, bálsamos y resinas con respecto al propóleo de Valentín. Esta variación en la composición puede atribuirse a las diferentes fuentes botánicas de donde las abejas recolectaron las resinas.

Por otra parte, se observa que el principal componente de estos propóleos es la cera, esto se atribuye a la época del año en que fue recolectado el propóleo (épocas decembrinas) ya que la temperatura es más baja que en otras épocas del año y según lo descrito por Papotti y cols. (2012), por ésta razón hay menos variedad de vegetación y las resinas de árboles y plantas que hay son más duras por lo tanto son más difíciles de extraer, lo que provoca que las abejas al no tener suficiente material resinoso, sustituyan éste, en su mayoría, por sustancias cerosas.

Los resultados para porcentajes de rendimiento y cantidad de cera, bálsamo y resina, se encuentran desglosados para cada propóleo en los cuadros del **anexo 1**.



## 6.4. OPTIMIZACIÓN PARA PROCESO DE EXTRACCIÓN MEDIANTE DISEÑO FACTORIAL $2^3$

En muchos experimentos interviene el estudio de los efectos de varios factores, en general los diseños factoriales son los más eficientes para este tipo de experimentos donde se requiere estudiar el efecto conjunto de los factores sobre una respuesta. Estos diseños tienen grandes ventajas como son: mejorar el desempeño, mejorar el rendimiento, variabilidades reducidas, tiempos de desarrollo cortos y disminución de costos (Montgomery, 2011).

Por ésta razón se realizaron modelos experimentales centrados en lograr la optimización de los porcentajes de rendimiento obtenidos a partir de extractos etanólicos de propóleos pertenecientes a diferentes apiarios de la Delegación Milpa Alta, los cuales se obtuvieron con diferentes métodos de extracción y diferentes porcentajes de disolvente.

Para determinar las condiciones óptimas de extracción del propóleo, es decir, encontrar el mejor método de extracción y el mejor porcentaje de disolvente, a las cuales se obtienen los mejores rendimientos, se utilizaron diseños experimentales  $2^3$ , en los que se variaron conjuntamente los factores: porcentaje de disolvente, método de extracción y los apiarios.

### 6.4.1. MODELO 1

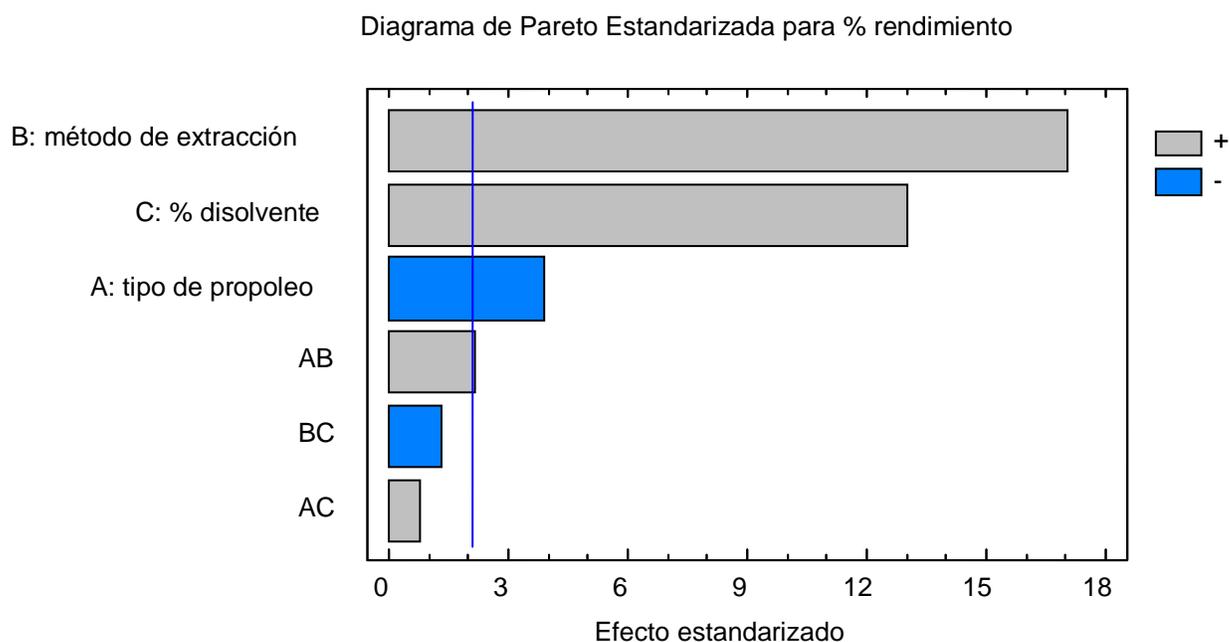
Para la optimización del porcentaje de rendimiento de los EEP para el modelo 1 se tomaron los factores con los valores más altos y más bajos y se compararon como se muestra a continuación:

- 1.- Propóleo de Valentín vs. Propóleo las Trojes;
- 2.- EtOH 96% vs. EtOH 50%;
- 3.- Método de Soxhlet vs. Método de maceración.

Los factores y niveles seleccionados para el modelo 1 se muestran en el **Cuadro 3**.



En la **Figura 13** se muestra el diagrama de Pareto para el modelo 1 donde se observa que los factores significativos y que influyen para la extracción de buenos porcentajes de rendimiento son el método de extracción, el porcentaje de disolvente, y el tipo de propóleo. Este último factor influye negativamente para la obtención de buenos rendimientos, por otra parte modificar el porcentaje de disolvente y el método de extracción principalmente influye positivamente para obtener buenos porcentajes de rendimiento.

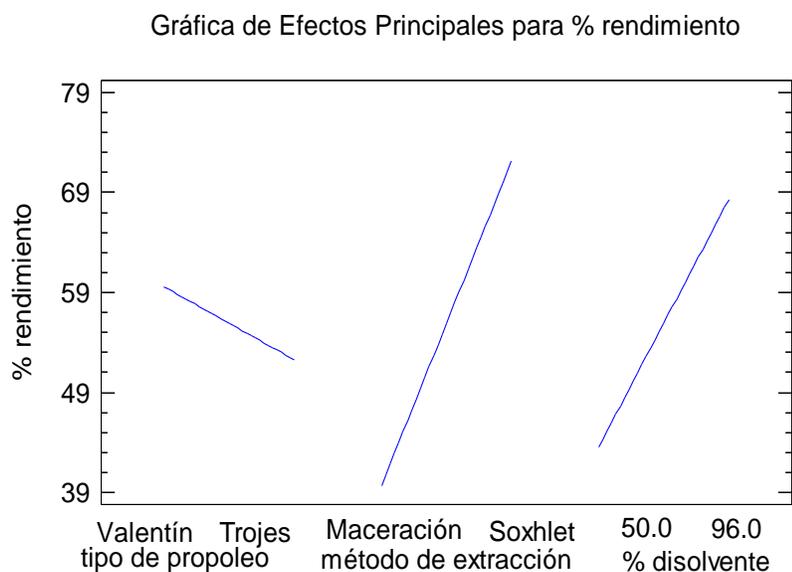


**Figura 13.** Diagrama de Pareto Estandarizada para la ponderación del % de rendimiento. Modelo 1.



En la **Figura 14** se muestran los efectos principales para obtener buenos porcentajes de rendimiento, donde se observa que de los factores: tipo de propóleo, método de extracción y porcentaje de disolvente, el que tiene un efecto principal más acentuado es el método de extracción, en éste se observa que con el método de Soxhlet se obtiene un mejor rendimiento que con el método de maceración.

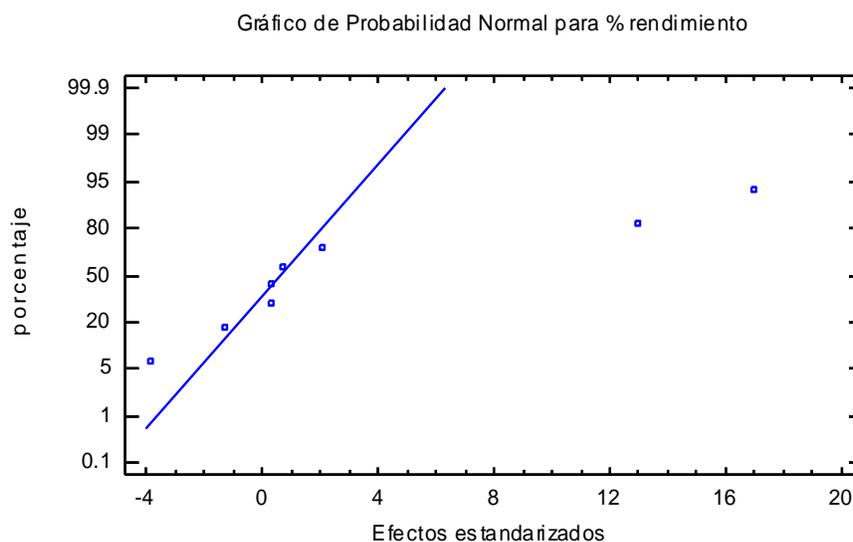
El porcentaje de disolvente también afecta los rendimientos, ya que con etanol al 96% se observa que se obtiene un mejor rendimiento que realizando el extracto con etanol al 50%. El tipo de propóleo tiene un menor efecto principal en la obtención de porcentajes de rendimiento, en el que se observa que con el propóleo de Valentín se obtienen mejores resultados que con el propóleo de las Trojes.



**Figura 14.** Gráfica de Efectos Principales para porcentajes de rendimiento. Modelo 1.

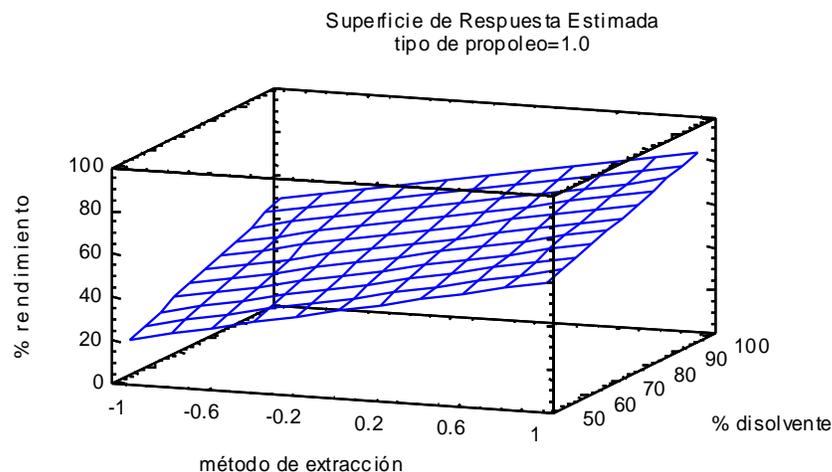


En la **Figura 15** se observa que la mayoría de los datos se encuentran ubicados sobre la recta, esto indica que éstos siguen una distribución normal. Con estos resultados se concluye que hay concordancia con lo observado en la **Figura 13**, es decir, se observa que el método de extracción, el porcentaje de disolvente y en menor cantidad el tipo de propóleo son significativos, ya que se encuentran alejados de la línea recta.



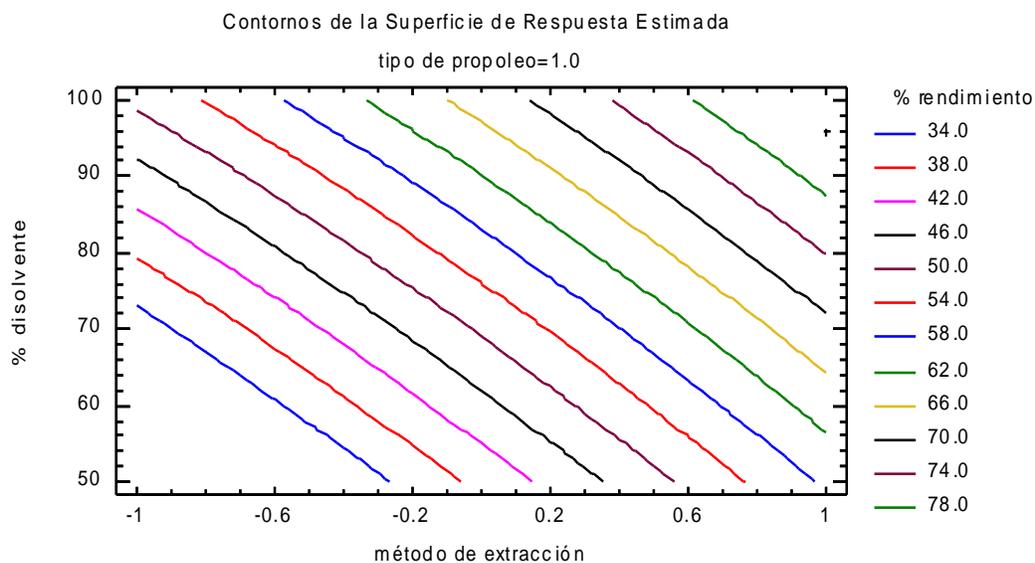
**Figura 15.** Gráfica de Probabilidad Normal para porcentajes de rendimiento. Modelo 1.

En la **Figura 16** se representa una superficie de respuesta que muestra el comportamiento del porcentaje de rendimiento al ser modificados el método de extracción y el porcentaje de disolvente, manteniendo constante uno de los propóleos. De aquí se observa a partir de extrapolaciones, que el método por el que se obtienen mejores rendimientos es con el que corresponde al nivel alto, en éste caso es el método de Soxhlet, y el porcentaje de disolvente más adecuado para la extracción es el de etanol al 96%, nótese que con el método de Soxhlet y etanol al 96%, se obtienen rendimientos por arriba del 80%, mientras que si se realizan las extracciones con el método de maceración y con etanol al 50% los rendimientos son bajos, de aproximadamente el 20%.



**Figura 16.** Gráfica de Superficie de respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 1.

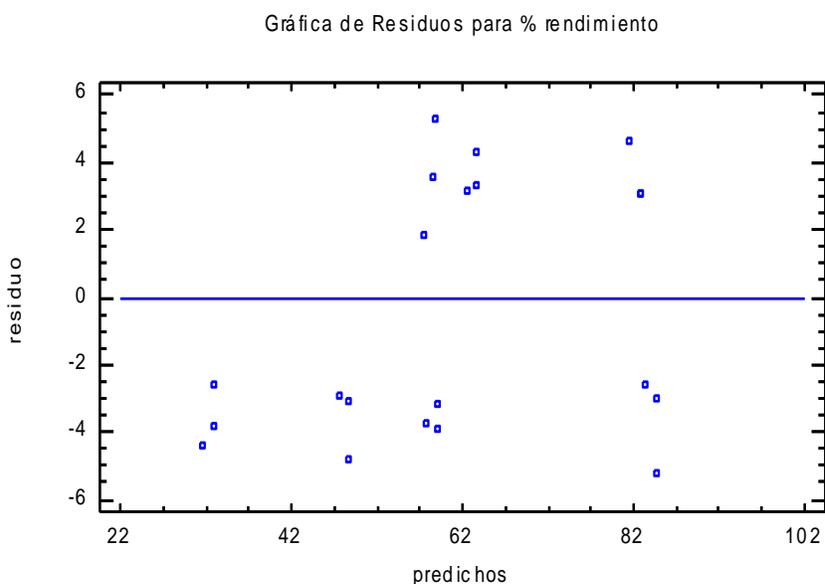
La localización con exactitud de las coordenadas del punto de la respuesta deseada puede identificarse en la **Figura 17**. De aquí se observa que el mayor porcentaje de rendimiento se obtiene al realizar los extractos con el método de Soxhlet y con etanol al 96%. En contraste, el menor rendimiento se obtiene al extraer por el método de maceración con etanol al 50%.



**Figura 17.** Gráfica de Contornos de la Superficie de Respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 1.



En la **Figura 18** se muestra la gráfica de residuos en la cual no se observa ningún patrón ni forma de embudo que en el caso de estar presente indicaría que el modelo no es adecuado, pero al no ser éste el caso se puede considerar que los datos satisfacen la linealidad.



**Figura 18.** Gráfica de Residuos para porcentaje de rendimiento. Modelo 1.

#### 6.4.2. MODELO 2

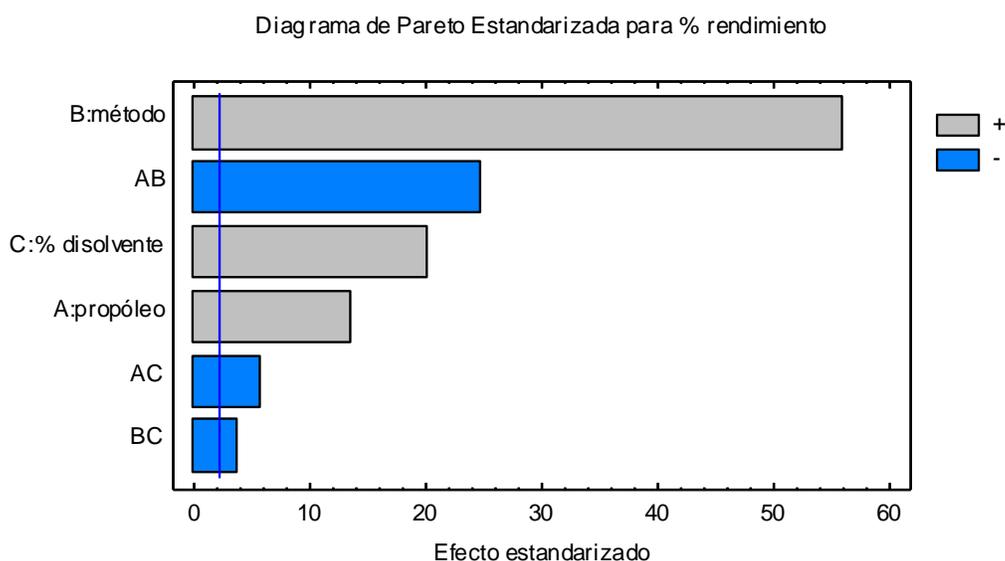
En el modelo 2 se descartaron el método de maceración, el nivel bajo de disolvente y el propóleo de las Trojes, esto para hacer un segundo modelo en donde se comparan los mejores factores obtenidos en el modelo 1 (propóleo de Valentín, método de Soxhlet y etanol al 96%) pero esta vez contra los factores que se mencionan a continuación:

- 1.- Propóleo de Valentín vs. Propóleo de Bonilla;
- 2.- EtOH 96% vs. EtOH 70%;
- 3.- Método de Soxhlet vs. Método de sonicación

Los factores y niveles seleccionados para el modelo 2 se muestran en el **Cuadro 4**.



El diagrama de Pareto para el modelo 2 se muestra en la **Figura 19**, donde se observa que los factores significativos y que influyen positivamente para la extracción de buenos porcentajes de rendimiento son el método de extracción, el porcentaje de disolvente, y el tipo de propóleo. De los cuales, el método de extracción es el factor principal que debe tomarse en cuenta al modificarlo pues tiene un gran impacto al momento de obtenerse los rendimientos. Las interacciones que deben evitarse principalmente son el nivel bajo de propóleo (propóleo de Bonilla) con el nivel bajo de método de extracción (sonicación), pues en el diagrama se observa que al combinar estos factores se obtienen efectos negativos significativos en la obtención de porcentajes de rendimiento.



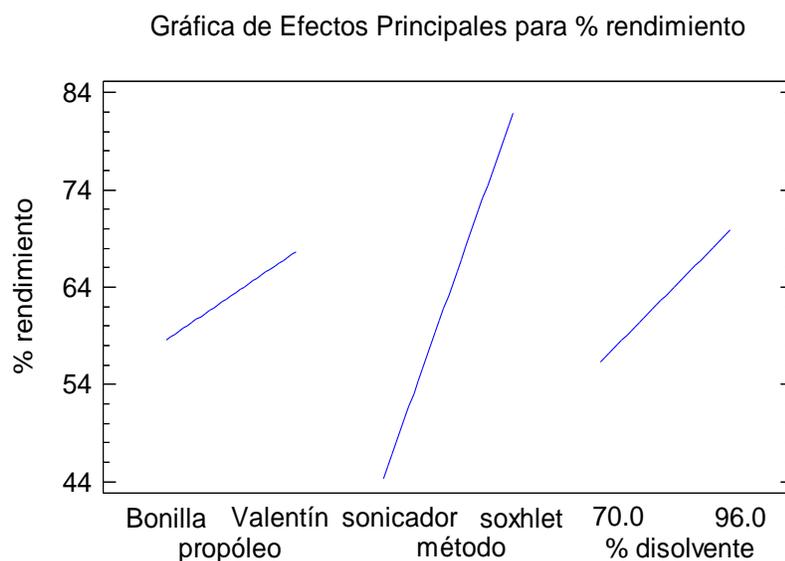
**Figura 19.** Diagrama de Pareto Estandarizada para la ponderación del % de rendimiento. Modelo 2.

En la **Figura 20** se muestran los efectos principales para obtener porcentajes de rendimiento, donde se observa que de los tres factores, el que tiene un efecto principal más marcado es el B (método de extracción), en éste se observa que con el método de Soxhlet nuevamente se obtiene un mejor rendimiento en comparación con el método de sonicación. El porcentaje de disolvente también afecta el rendimiento, ya que con etanol al 96% se observa que se obtiene un mejor rendimiento que realizando el extracto con etanol al 70%.



El tipo de propóleo tiene un menor efecto principal en la obtención de porcentajes de rendimiento, sin embargo se observa que con el propóleo de Valentín se obtienen mejores resultados que con el propóleo de Bonilla.

Los tres efectos son positivos, y al considerar estos efectos principales, los tres factores se deben correr en el nivel alto (propóleo de Valentín extraído por el método de Soxhlet con etanol al 96%) a fin de maximizar el porcentaje de rendimiento.



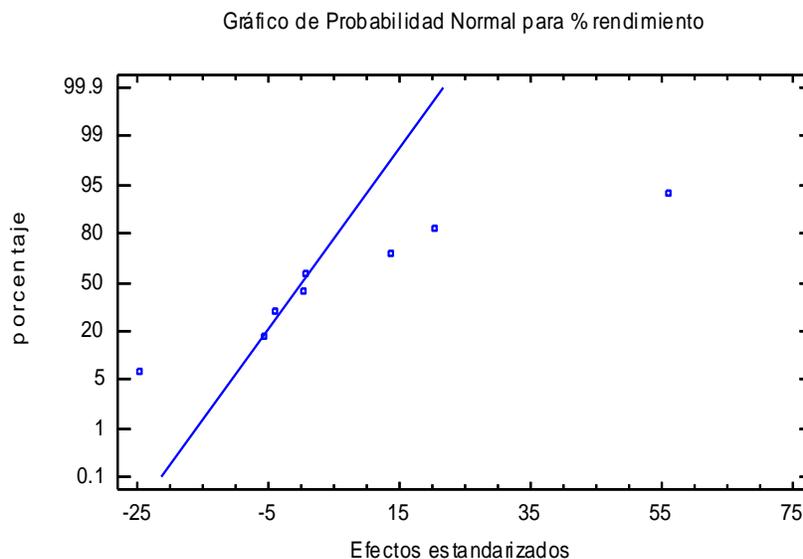
**Figura 20.** Gráfica de Efectos Principales para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.

En la **Figura 21** se observa que la mayoría de los datos se encuentran ubicados sobre la recta, esto indica que éstos siguen una distribución normal, concordando con lo observado en la **Figura 19**, es decir, se observa que el método de extracción, el porcentaje de disolvente, la combinación de tipo de propóleo con método de extracción y en menor cantidad el tipo de propóleo, son significativos, ya que se encuentran alejados de la línea recta.

En otras palabras, todos los efectos que caen sobre la recta son insignificantes, mientras que los efectos grandes están apartados de ella.



Por lo tanto, los efectos importantes a tomar en cuenta que surgen de este análisis son método de extracción, el porcentaje de disolvente y el tipo de propóleo.



**Figura 21.** Gráfico de Probabilidad Normal para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.

La **Figura 22** representa una superficie de respuesta que muestra el comportamiento del porcentaje de rendimiento al ser modificados los factores método de extracción y porcentaje de disolvente, manteniendo constante uno de los propóleos. De aquí se infiere a partir de extrapolaciones que, el método por el que se obtienen mejores rendimientos es con el que corresponde al nivel alto, que es el método de Soxhlet y el porcentaje de disolvente adecuado para la extracción es el de etanol al 96%. Con las condiciones anteriores se logran obtener porcentajes de rendimiento mayores al 70%, mientras que el método de extracción con el que se obtienen menores rendimientos es sonicación con etanol al 70%, obteniendo de aquí porcentajes de rendimiento de aproximadamente 50%.

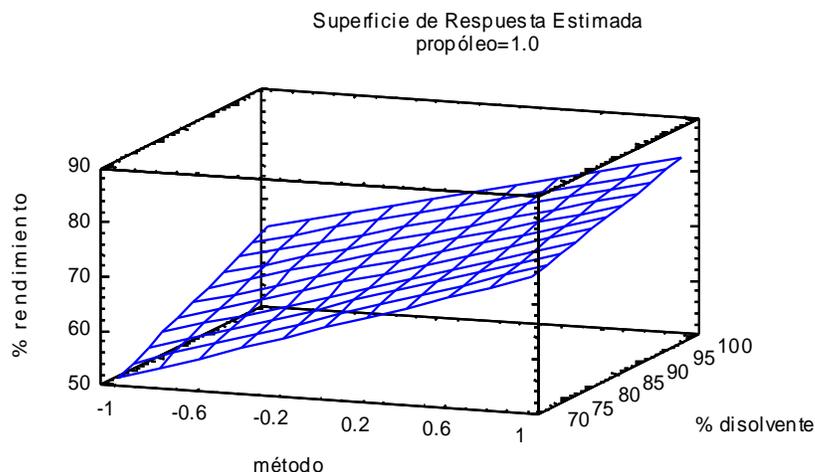


Figura 22. Gráfico de Superficie de Respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.

En la **Figura 23** se pueden localizar con exactitud las coordenadas del punto de la respuesta deseada. En ésta gráfica se observa que el mayor porcentaje de rendimiento se observa al realizar los extractos con el método de Soxhlet y con etanol al 96% obteniendo casi el 80% de rendimiento, mientras que el menor rendimiento se obtiene al extraer por el método de sonicación con etanol al 70% obteniendo rendimientos del 55%.

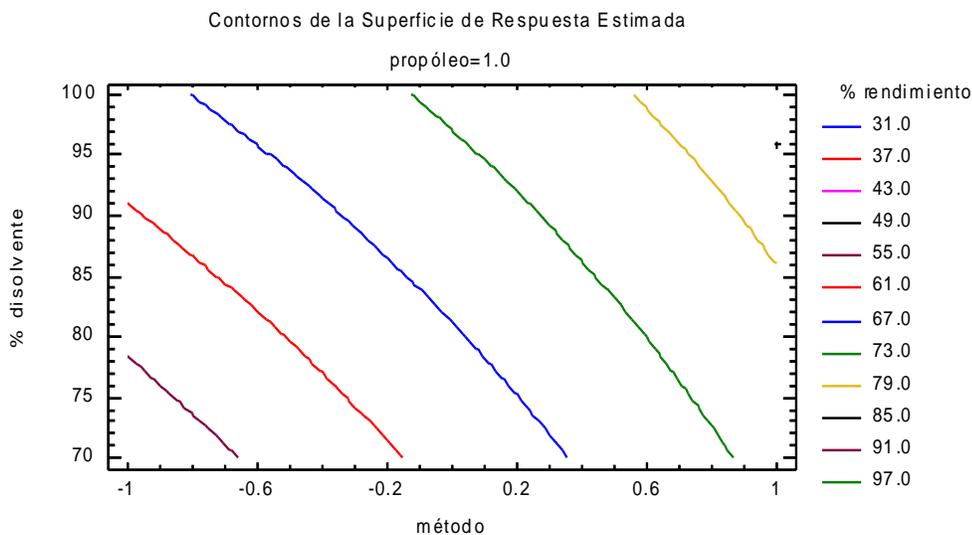
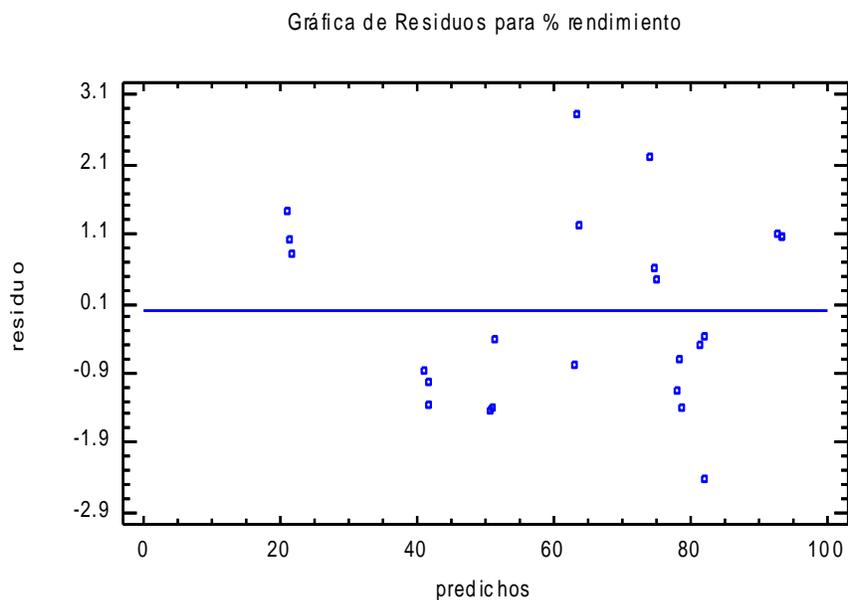


Figura 23. Gráfica de Contornos de Superficie de Respuesta para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.



En la **Figura 24** se muestra la gráfica de residuos en la cual no se observa ningún patrón ni forma de embudo que indicaría que el modelo no es adecuado, por lo tanto se puede considerar que los datos satisfacen la linealidad.



**Figura 24.** Gráfica de Residuos para porcentajes de rendimiento. Modelo 2.



## 6.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para la determinación de la actividad biológica de los extractos etanólicos se utilizó a la bacteria *Streptococcus mutans* como microorganismo de prueba. Este microorganismo se considera como uno de los principales agentes de la formación de caries, debido a su capacidad de producir glucosiltransferasas, las cuales le ayudan a sintetizar glucanos a partir de sacarosa, éstos glucanos permiten la formación de la placa dentobacteriana mediante adherencia de *Streptococcus mutans* y otras bacterias de la flora de la superficie de los dientes (Pimenta *et al.*, 2004).

El valor de CMI está definido como la mínima concentración del compuesto de prueba que no permite el desarrollo de la bacteria en estudio, visualmente se interpreta como la ausencia de turbidez en el medio. Es importante destacar que un extracto preparado a partir de materiales vegetales es considerado activo si presenta un CMI menor a 1000 µg/mL (Rosas-Piñon, 2012).

Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en el **Cuadro 5**. donde se indica que los extractos con mejores CMIs fueron los extractos de Valentín obtenidos por maceración al 96%, 70% y 50%, Valentín obtenido por sonicación al 96% y Valentín obtenido por Soxhlet al 70%; los extractos del propóleo las Trojes obtenido por maceración al 96%, 70% y al 50%; y los extractos del propóleo de Bonilla obtenidos por maceración al 96%, 70%, 50% y por sonicación al 50%, es decir, los extractos que tienen una mejor acción inhibitoria son principalmente los extraídos por maceración y en algunos casos los de sonicación, los de más extractos presentan CMIs mayores a la concentración límite de 1000 µg/mL.

Los extractos obtenidos por el método de soxhlet no presentan una buena actividad inhibitoria del microorganismo, esta falta de actividad se le atribuye a las condiciones que requiere el método para la extracción, ya que al utilizar calor, esto promueve la disolución de ceras pasando al extracto, y debido a que las ceras no tienen actividad biológica o terapéutica y en la determinación de ceras, bálsamos y resinas se observó una gran cantidad de cera en la composición de estos propóleos, este material ceroso le resta actividad inhibitoria al extracto etanólico.



**Cuadro 5.** CMI's de extractos de propóleos de la Delegación Milpa Alta en la evaluación de la actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*.

<b>Extracto etanólico de propóleo</b>	<b>CMI's de extractos etanólicos (mg/ml) para <i>S. mutans</i></b>
<b>Valentín. Maceración 96%</b>	<b>0.73</b>
<b>Valentín. Maceración 70%</b>	<b>0.088</b>
<b>Valentín. Maceración 50%</b>	<b>0.73</b>
<b>Valentín. Sonicación 96%</b>	<b>0.74</b>
Valentín. Sonicación 70%	2.95
Valentín. Sonicación 50%	2.88
Valentín. Soxhlet 96%	1.41
<b>Valentín. Soxhlet 70%</b>	<b>0.74</b>
Valentín. Soxhlet 50%	2.75
<b>Trojes. Maceración 96%</b>	<b>0.19</b>
<b>Trojes. Maceración 70%</b>	<b>0.74</b>
<b>Trojes. Maceración 50%</b>	<b>0.69</b>
Trojes. Sonicación 96%	1.39
Trojes. Sonicación 70%	1.37
Trojes. Sonicación 50%	1.39
Trojes. Soxhlet 96%	1.9
Trojes. Soxhlet 70%	1.98
Trojes. Soxhlet 50%	1.7
<b>Bonilla. Maceración 96%</b>	<b>0.18</b>
<b>Bonilla. Maceración 70%</b>	<b>0.35</b>
<b>Bonilla. Maceración 50%</b>	<b>0.35</b>
Bonilla. Sonicación 96%	2.9
Bonilla. Sonicación 70%	2.95
<b>Bonilla. Sonicación 50%</b>	<b>0.74</b>
Bonilla. Soxhlet 96%	NI
Bonilla. Soxhlet 70%	NI
Bonilla. Soxhlet 50%	NI

NI= no inhibió (>4mg/ml)



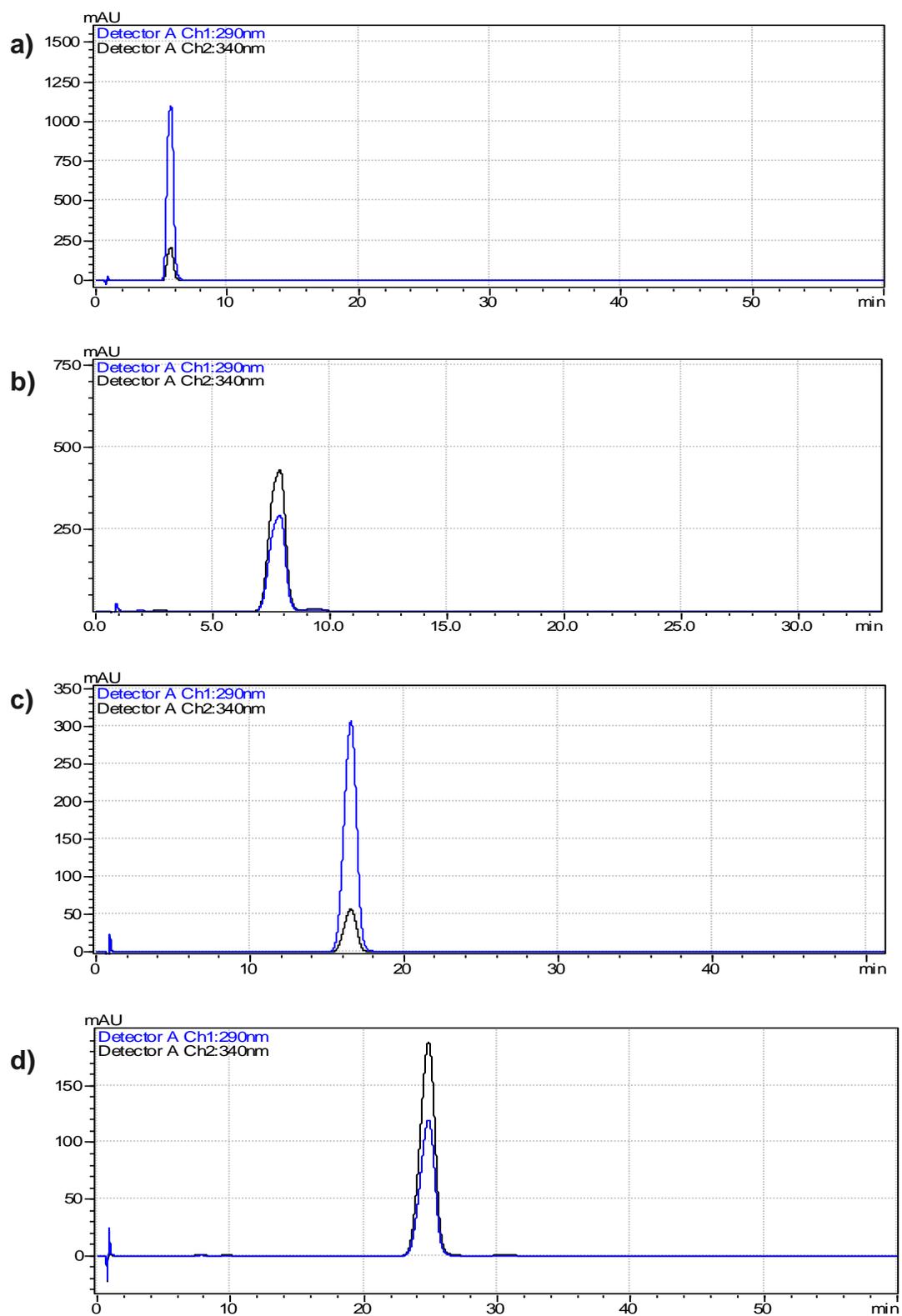
## 6.6. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES EN EXTRACTOS ETANÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC).

La identificación de los flavonoides presentes en los EEP se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y los picos que presentaron cada uno de los estándares contra los picos presentes en los cromatogramas obtenidos para cada uno de los extractos.

También se realizó la co-elución de los estándares con la matriz de trabajo utilizada para validar el método. Los tiempos de retención obtenidos para cada flavonoide estándar se muestran en el **Cuadro 6**.

**Cuadro 6.** Tiempos de retención para estándares de flavonoides.

FLAVONOIDE	$t_R$ (min)	Figura 25.
Pinocembrina (1)	5.8	a)
Acacetina (2)	7.8	b)
4',7-dimetilnaringenina (3)	16.2	c)
4',7-dimetilapigenina (4)	25.1	d)



**Figura 25.** Cromatogramas de los flavonoides estándar. a) Cromatograma de pinocembrina. b) Cromatograma de acetina. c) Cromatograma de 4',7-dimetilnaringenina. d) Cromatograma de 4',7-dimetilapigenina.



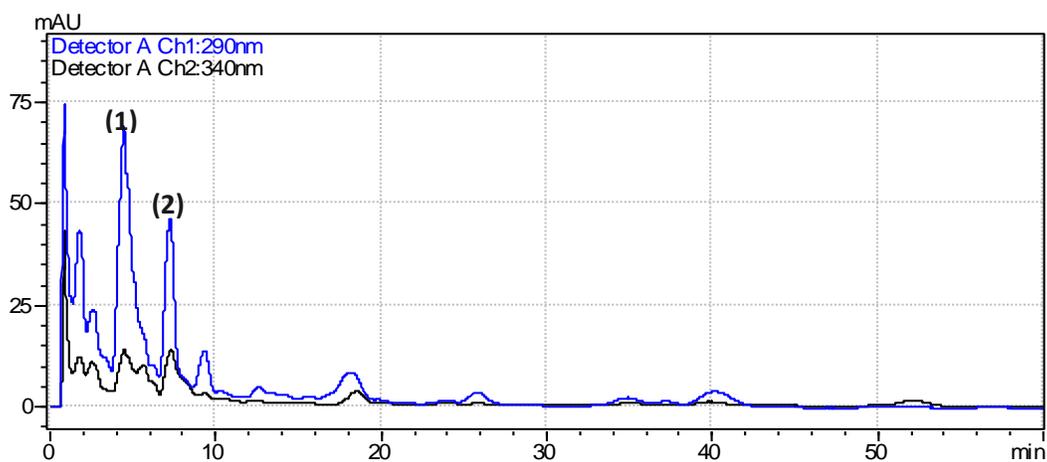
El estudio que se realizó para conocer los flavonoides presentes en los propóleos analizados se llevó a cabo mediante un análisis cualitativo por medio de una comparación entre los picos de los cromatogramas de los flavonoides estándar contra los picos de los cromatogramas de los extractos de las muestras de propóleo estudiadas, donde para los cromatogramas correspondientes a los extractos del propóleo de Valentín que se muestran en las **Figuras 26, 27 y 28** se observa que el porcentaje de disolvente no tiene gran impacto en la concentración de cada flavonoide presente en las muestras como lo tiene el método de extracción, sin embargo, al comparar los picos de los extractos de las muestras de propóleo obtenidos con diferentes proporciones de etanol, se observa que presentan mayor concentración de cada flavonoide los EEP obtenidos con etanol al 50%.

Al comparar los picos de los mismos extractos de propóleo, variando el método de extracción, se muestra que el método de Soxhlet es un método no recomendable para la extracción de propóleo si se quieren obtener buenas concentraciones de compuestos de interés, ya que por éste método, los picos de los flavonoides son menores con respecto a los métodos de maceración y sonicación. Por otro lado, realizando los extractos con el método de maceración es como los picos de los flavonoides se ven aumentados.

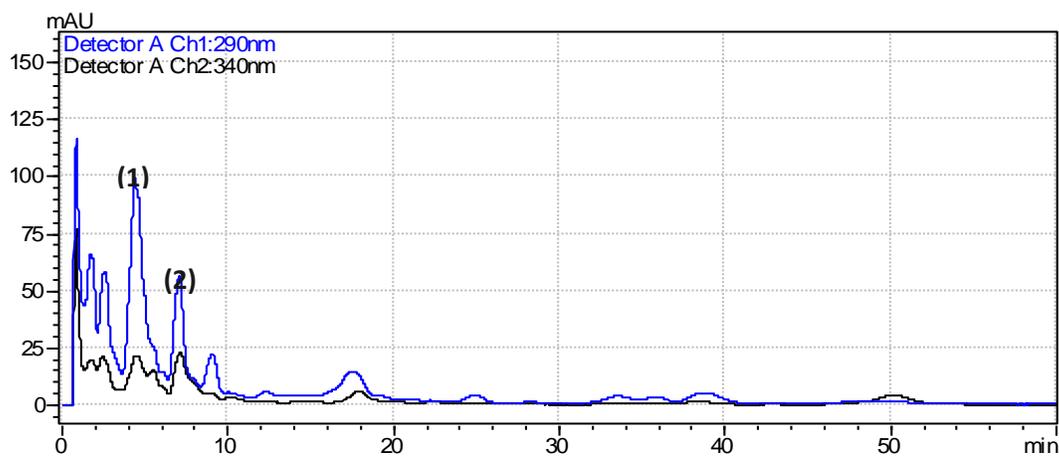
Se buscó identificar algunos flavonoides en el propóleo de Valentín determinándolos por comparación con estándares identificados que se muestran en la **Figura 25**, de los cuales, los que están presentes son la pinocembrina y la acacetina, con  $t_R$  de 5.8 y 7.8 respectivamente, cabe mencionar que de los flavonoides identificados en los extractos de éste propóleo, la pinocembrina es el que se encuentra en mayor proporción.



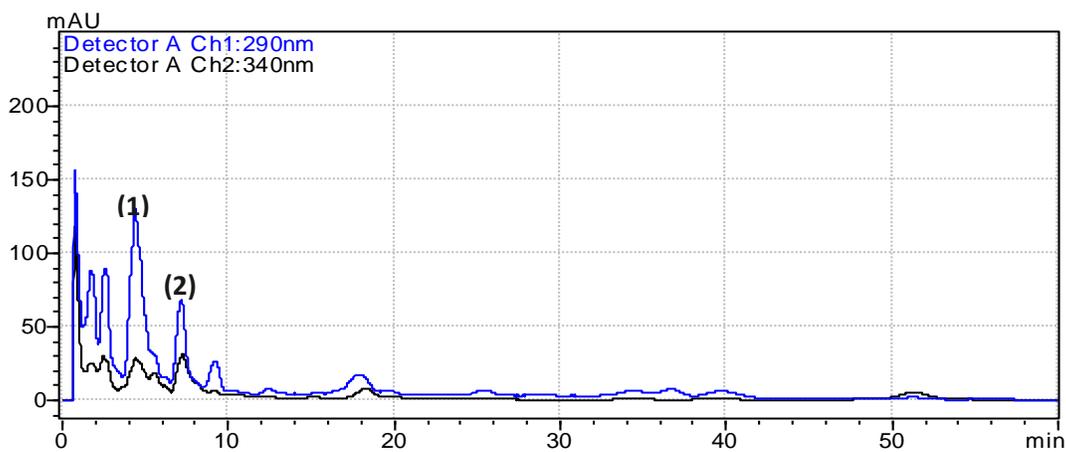
a)



b)



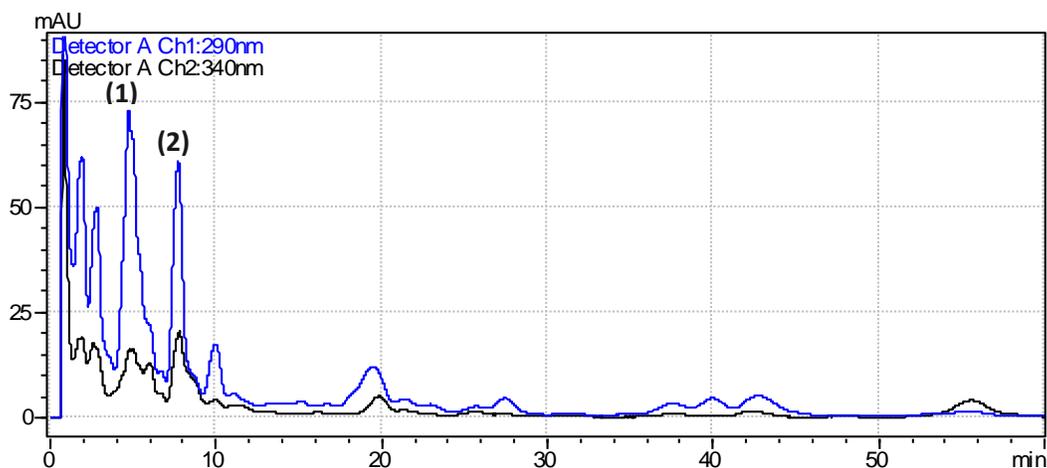
c)



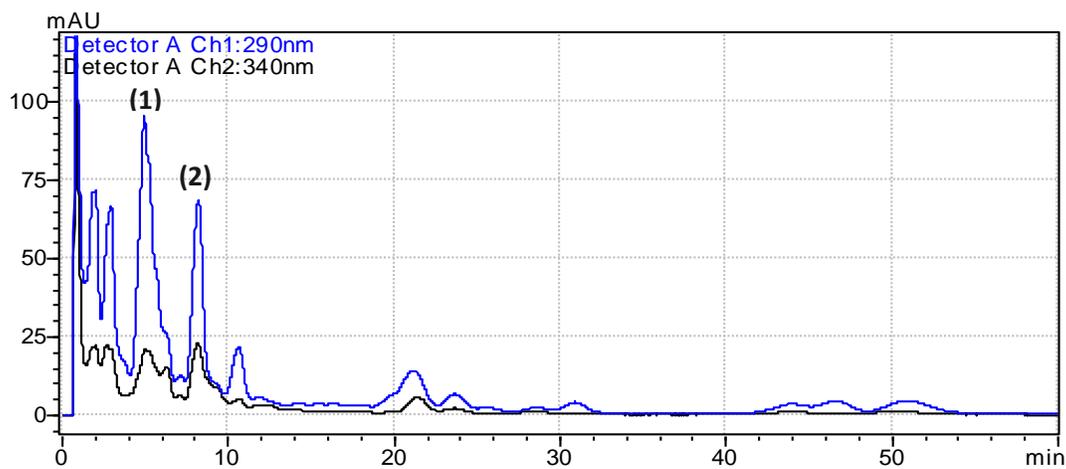
**Figura 26.** Cromatogramas de los EEP del apiario de Valentín, obtenidos con etanol al 96%. a) Por método de Soxhlet. b) Por método de sonicación. c) Por método de maceración.



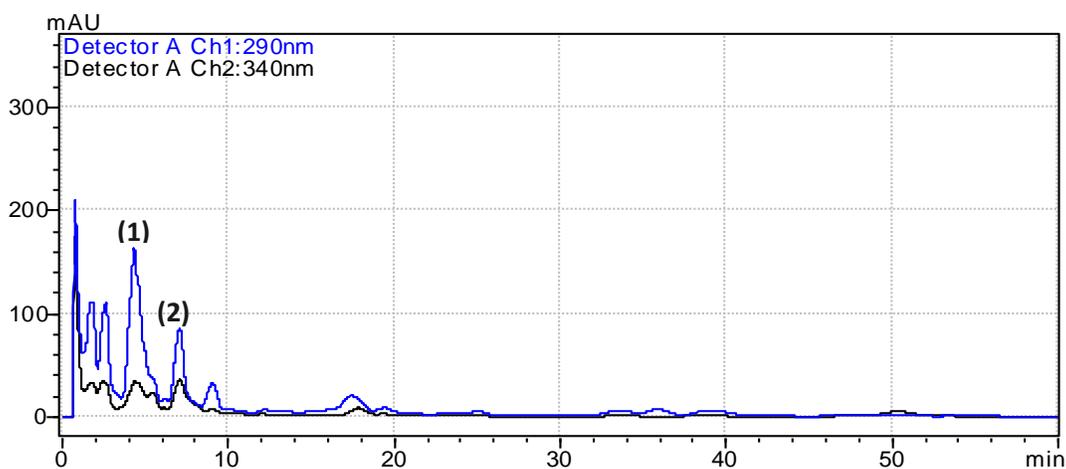
a)



b)



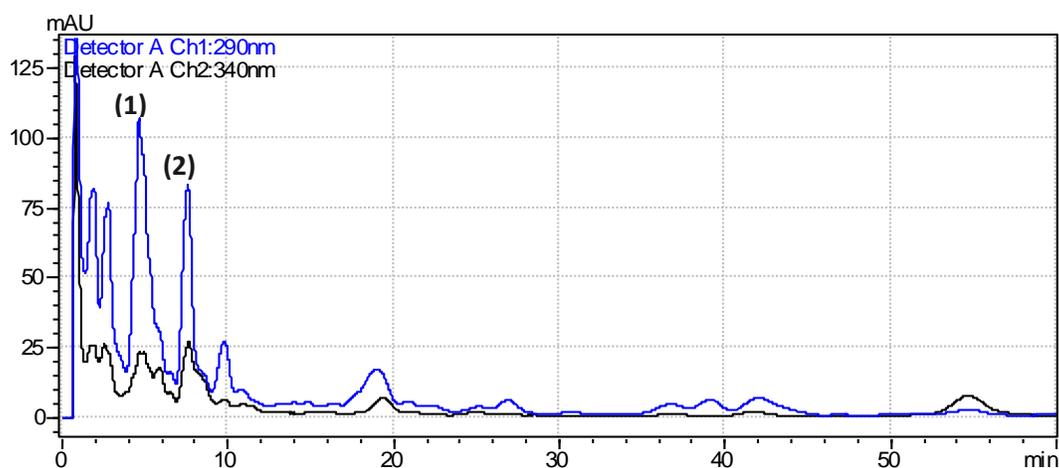
c)



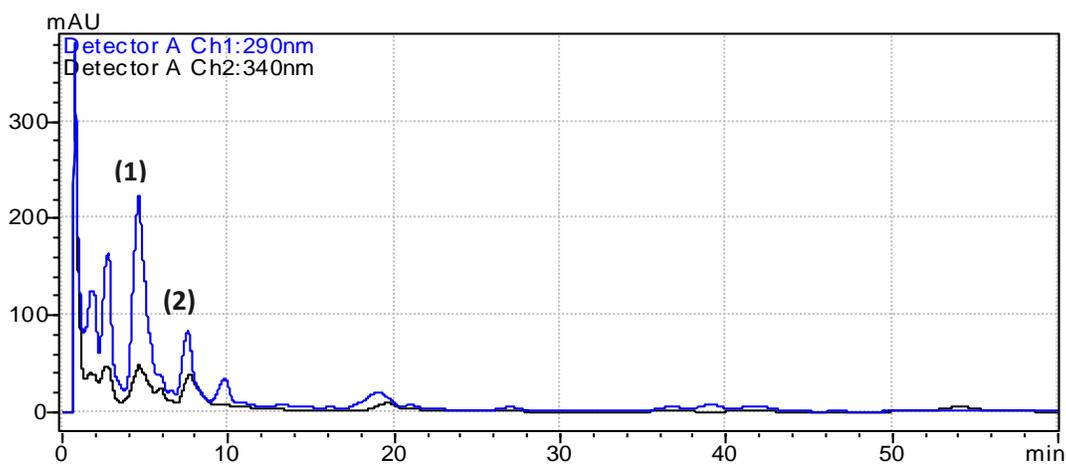
**Figura 27.** Cromatogramas de los EEP del propóleo de Valentín, obtenidos con etanol al 70%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración.



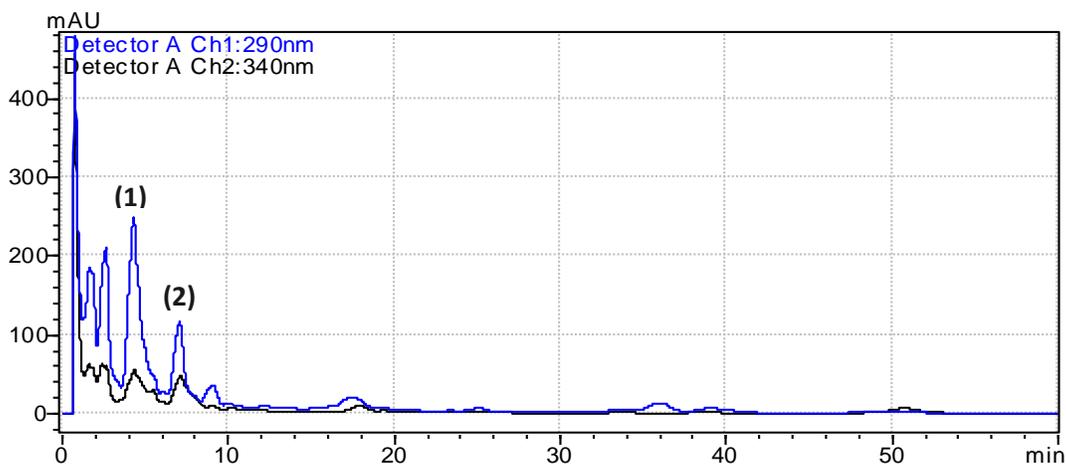
a)



b)



c)



**Figura 28.** Cromatogramas de los EEP del apiario de Valentín, obtenidos con etanol al 50%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración.

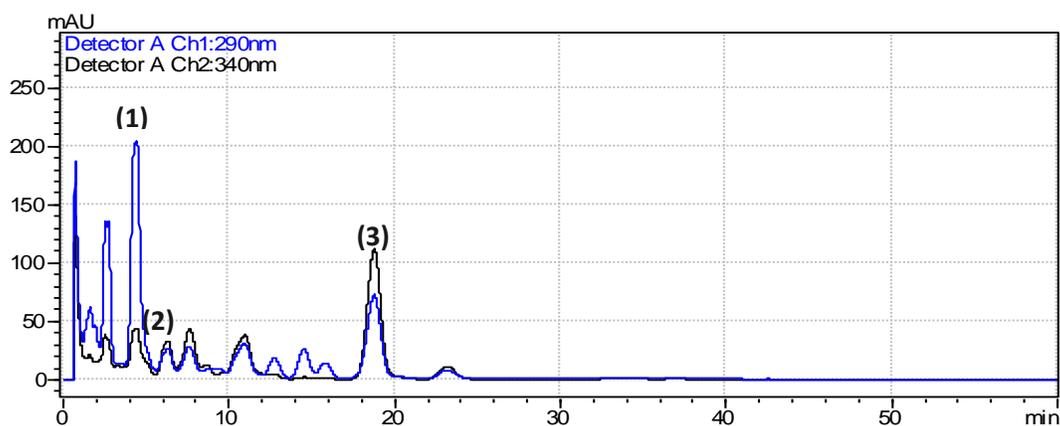


Con respecto al propóleo de las Trojes, se determinaron los flavonoides presentes de la misma manera que se hizo para el propóleo de Valentín. En éste se encontraron los flavonoides pinocembrina (en mayor concentración), acacetina (en muy poca concentración) y también 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina.

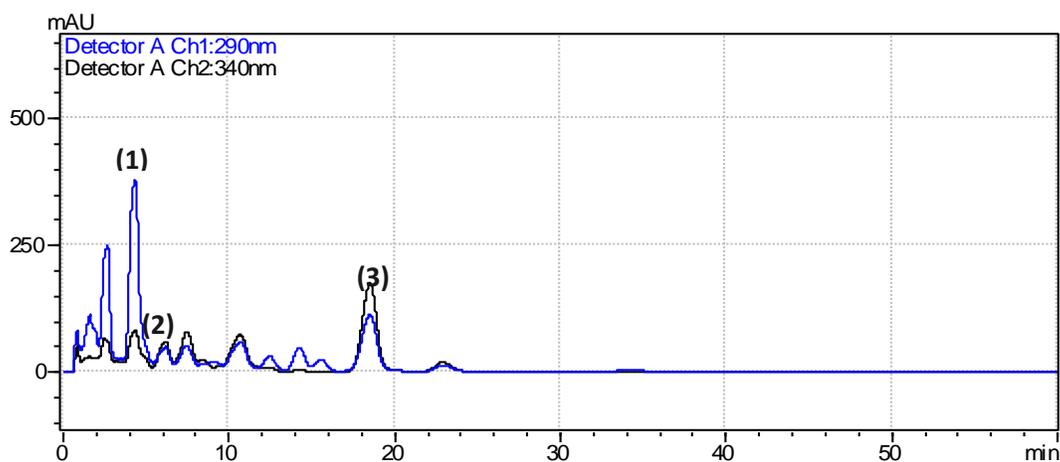
En este propóleo se observa un comportamiento similar al propóleo de Valentín en cuanto a extracción por diferentes métodos y porcentajes de disolvente, es decir, se obtienen cromatogramas que se muestran en las **Figuras 29, 30 y 31** con picos de mayor intensidad para pinocembrina y acacetina en las muestras extraídas con etanol al 50% y con el método de maceración, y los picos de menor intensidad se observan en las muestras extraídas por el método de Soxhlet al 96%. Para el flavonoide 4',7-dimetilnaringenina se observa se obtiene mayoritariamente por el método de maceración principalmente con un porcentaje de etanol al 96%. La 4',7-dimetilapigenina sólo se obtiene en tres de las muestras de éste propóleo, por lo tanto, no se puede concluir algún método por el cual se pueda extraer mayor o menor cantidad de éste compuesto. Sin embargo, dos de las muestras obtenidas, se lograron con el método de Soxhlet, y una se obtiene por sonicación, por ésta razón se podría pensar que para extraer mayor cantidad de 4',7-dimetilapigenina, se logra mejor aplicando calor o energía como la del baño ultrasónico a la muestra.



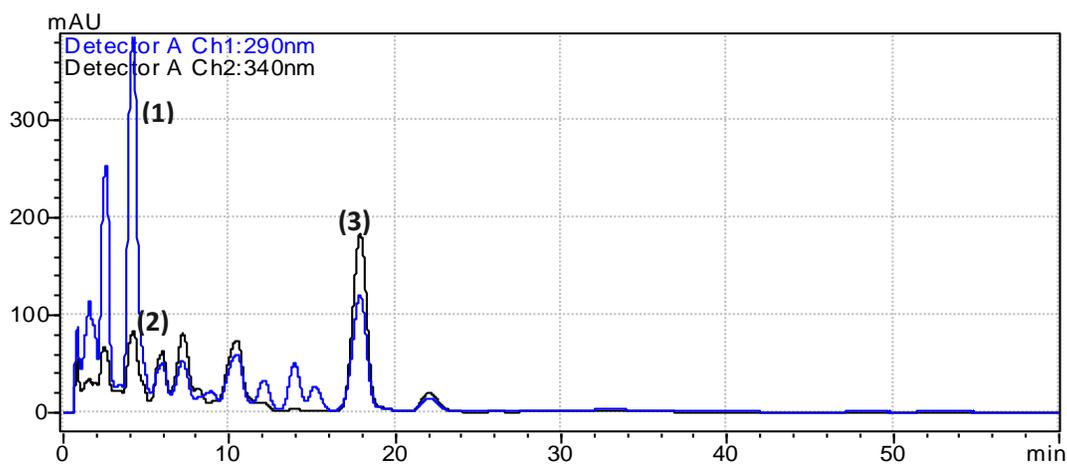
a)



b)



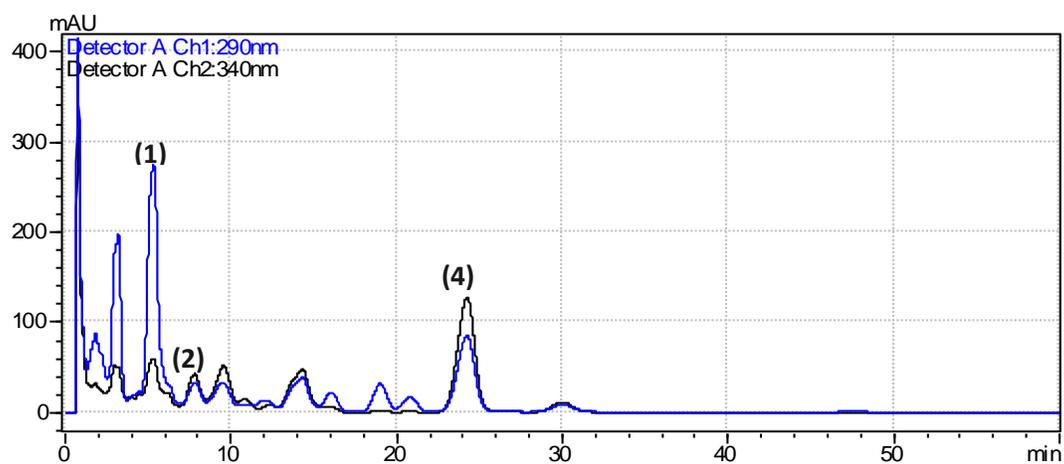
c)



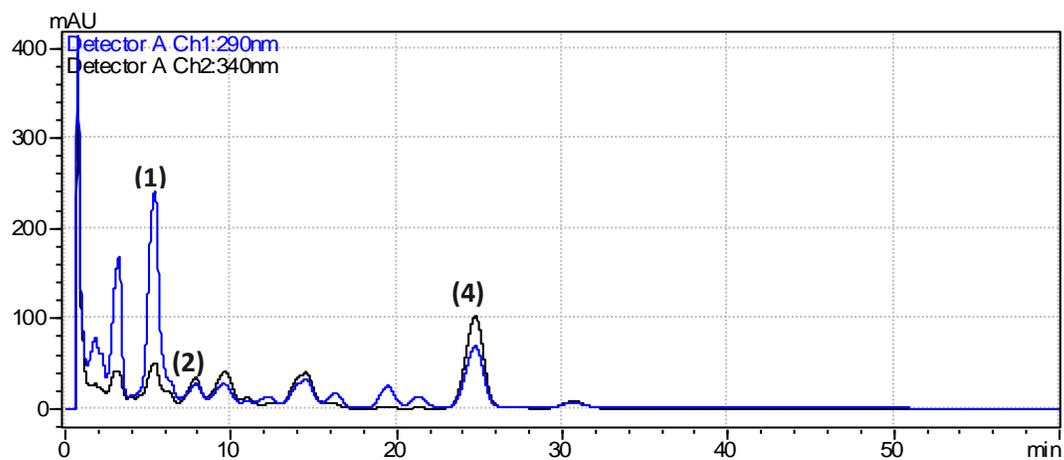
**Figura 29.** Cromatogramas de los EEP del apiario de las Trojes, obtenido con etanol al 96%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración.



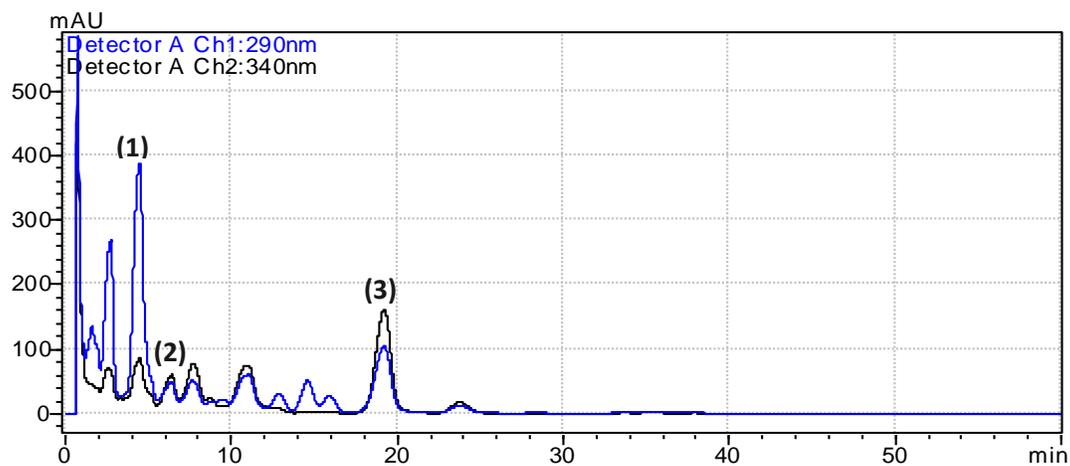
a)



b)



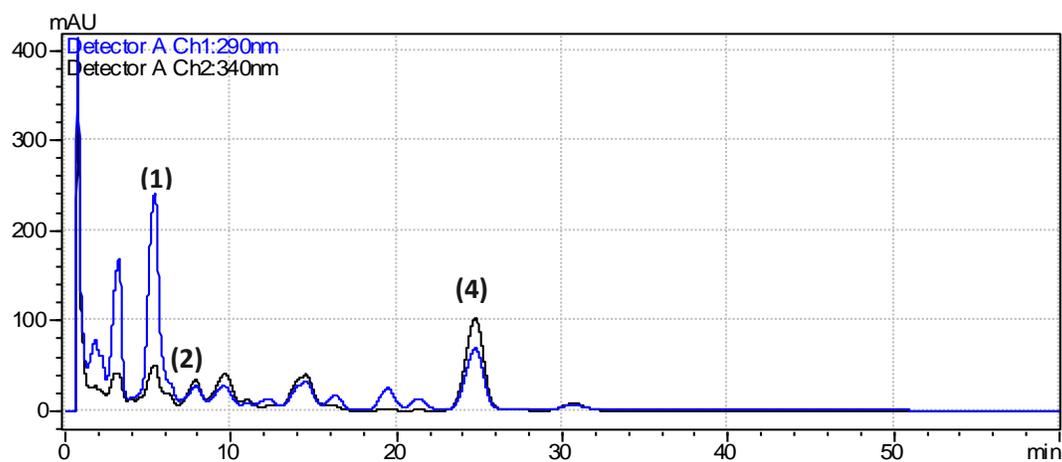
c)



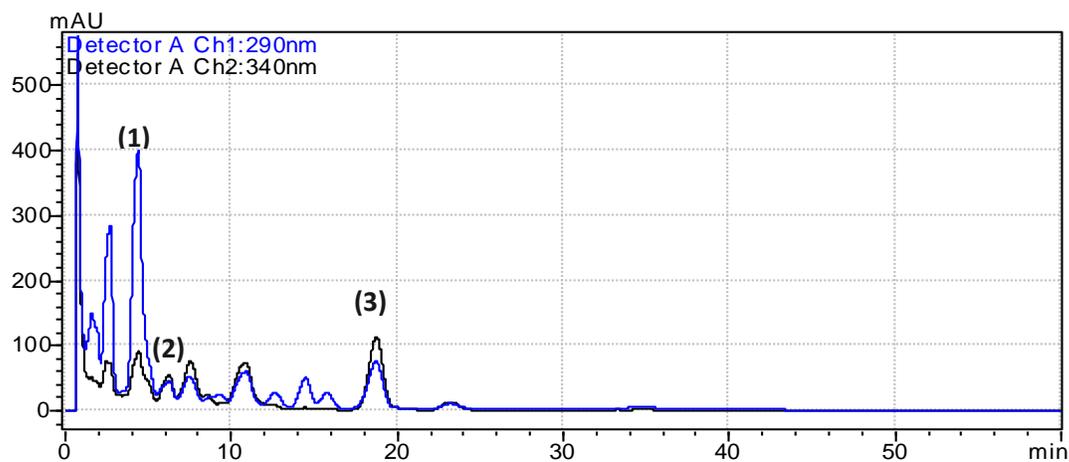
**Figura 30.** Cromatogramas de los EEP del apiario de las Trojes, obtenidos con etanol al 70%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración.



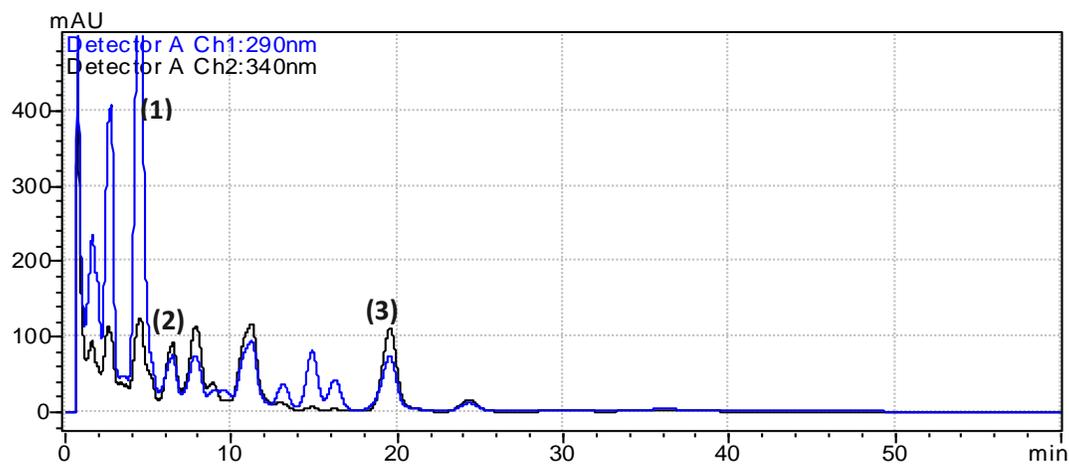
a)



b)



c)



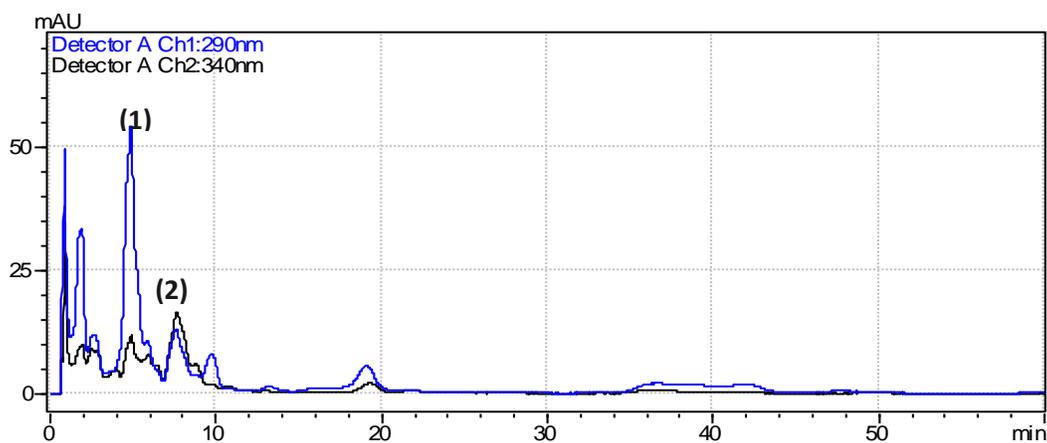
**Figura 31.** Cromatogramas de los EEP del apiario de las Trojes, obtenidos con etanol al 50%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración.



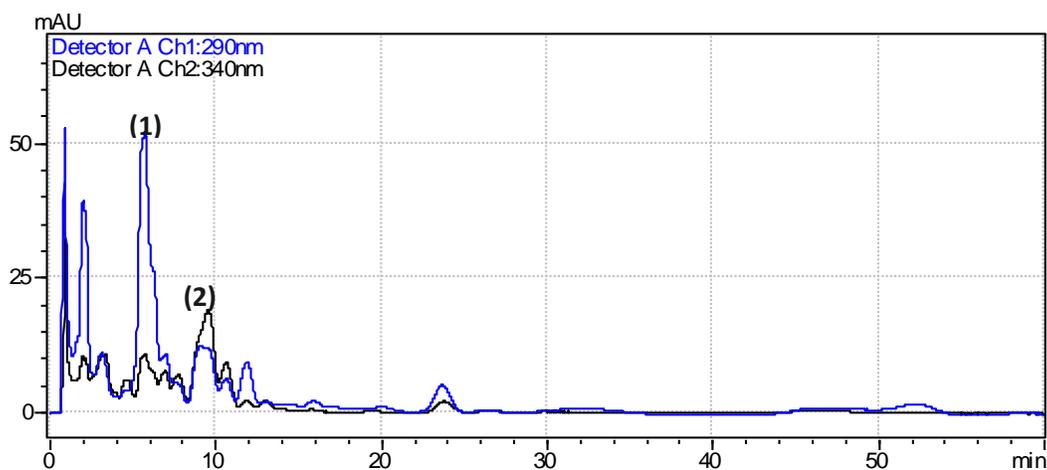
En cuanto al propóleo de Bonilla, al realizar el análisis se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en las **Figuras 32, 33 y 34** en los cuales se observa que los flavonoides presentes en los extractos etanólicos de este propóleo son la pinocembrina y acacetina, siendo la pinocembrina de igual manera que en los extractos de los propóleos anteriores, el flavonoide que se encuentra en mayor proporción. Los picos con mayor intensidad de los flavonoides aparecen en las muestras extraídas por el método de maceración y etanol al 50%, mientras que, las muestras extraídas con el método de Soxhlet muestran picos que corresponden a los flavonoides identificados para éste propóleo con intensidad baja.



a)



b)



c)

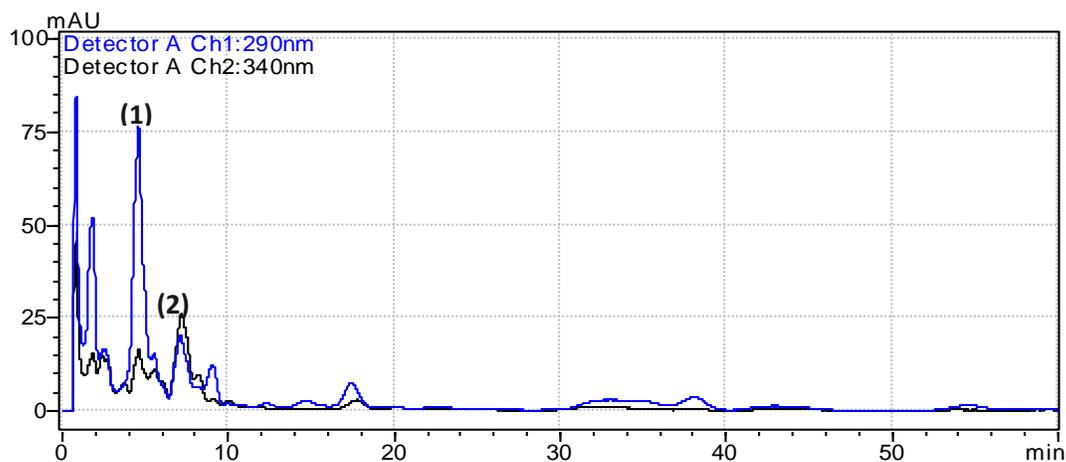
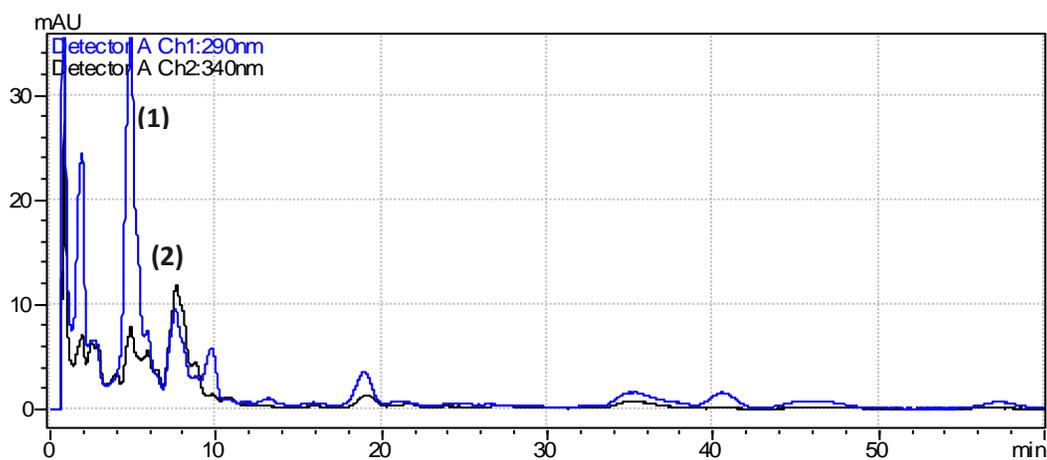


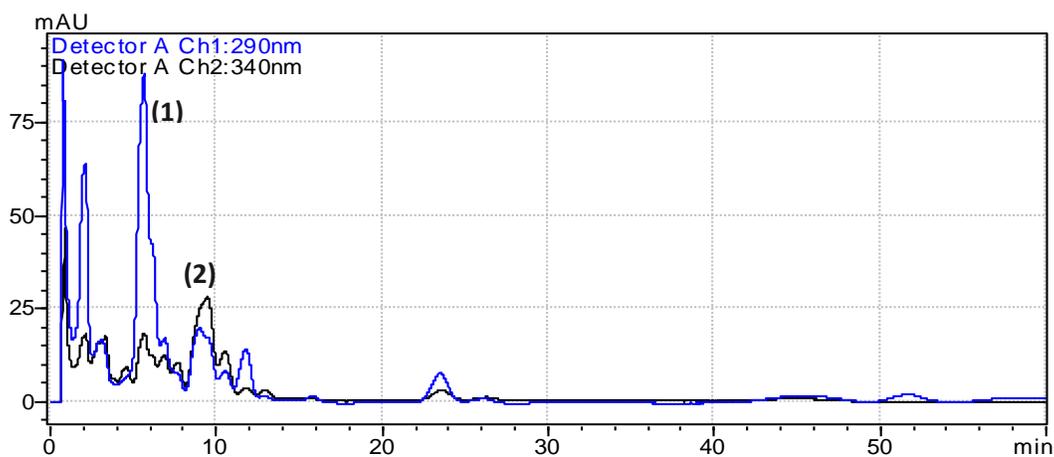
Figura 32. Cromatogramas de los EEP del apiario de Bonilla, obtenidos con etanol al 96%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) por el método de maceración.



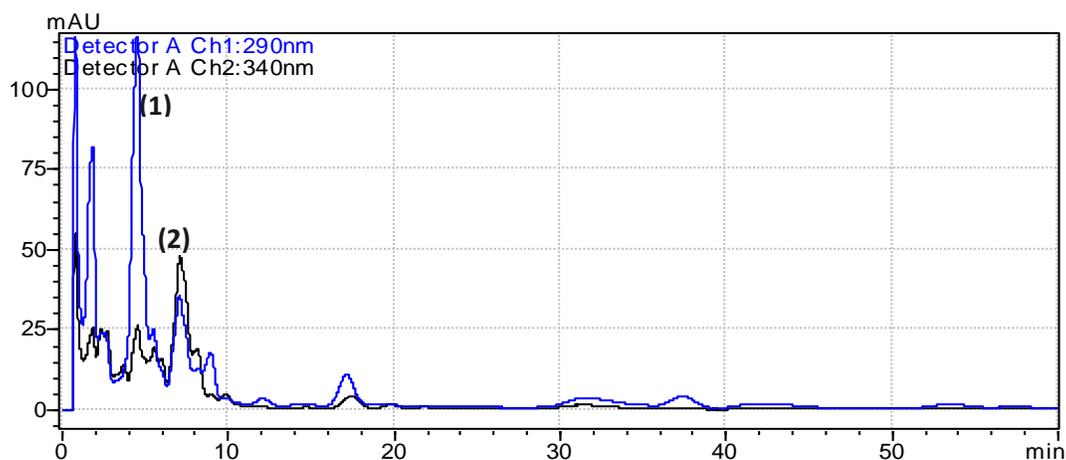
a)



b)



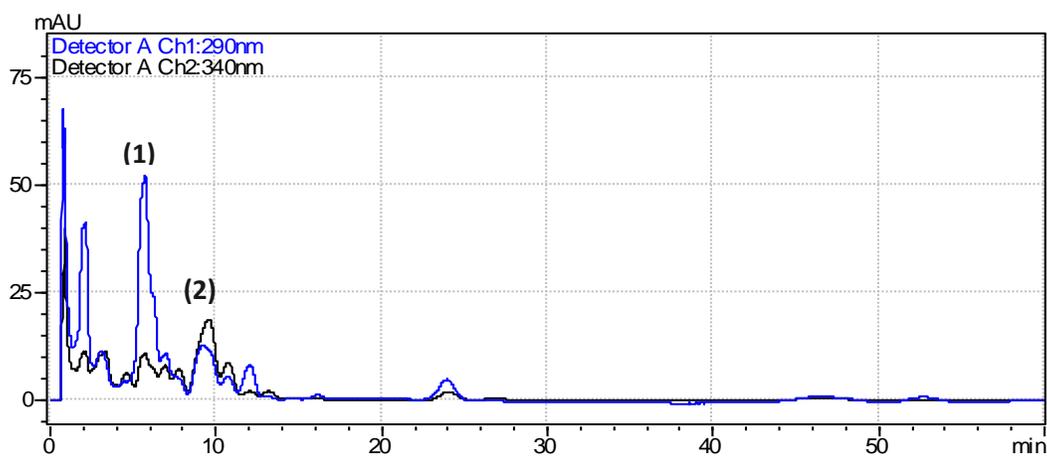
c)



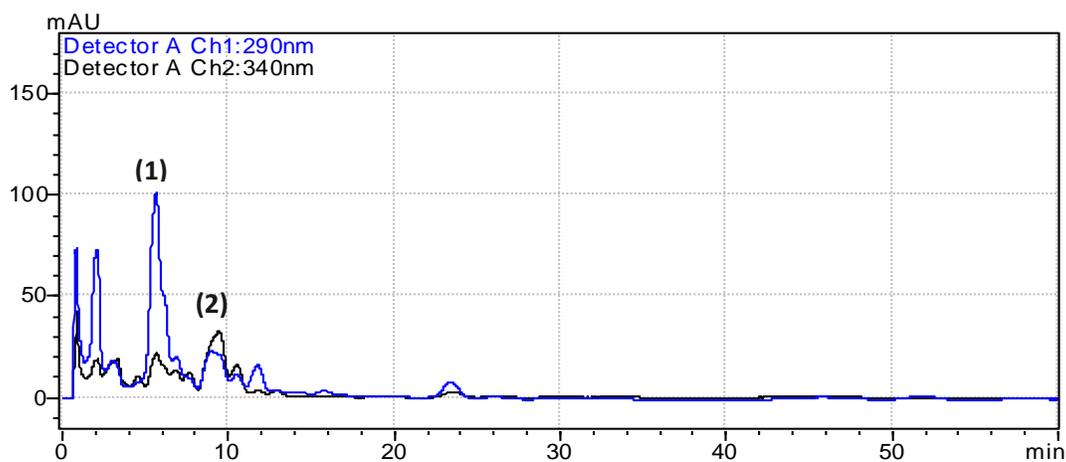
**Figura 33.** Cromatogramas de los EEP del apiario de Bonilla, obtenidos con etanol al 70%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración.



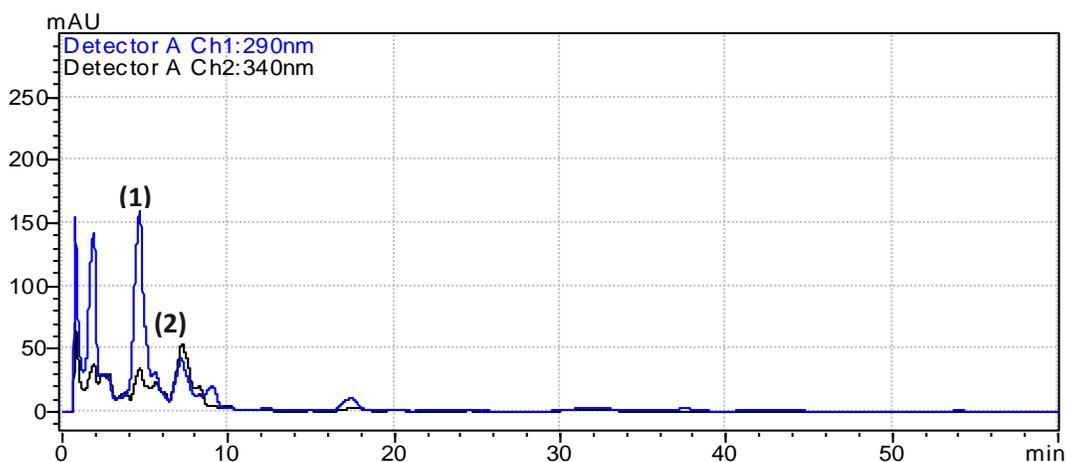
a)



b)



c)



**Figura 34.** Cromatogramas de los EEP del apiario de Bonilla, obtenidos con etanol al 50%. a) Por el método de Soxhlet. b) Por el método de sonicación. c) Por el método de maceración.



Los flavonoides determinados (acacetina, pinocembrina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina), se obtienen de fuentes naturales por mencionar algunas se refieren las siguientes:

Acacetina: obtenida principalmente de las plantas de la familia Asterácea, dentro de las especies más abundantes son *Eupatorium*, *Senecio* y *Helichrysum*.

Pinocembrina: obtenida de la corteza de los pinos, jengibre chino, orégano y otras fuentes naturales.

4',7-dimetilnaringenina: presente en la cáscara de algunos cítricos, está presente también en la pulpa de los frutos, hojas, flores y semillas de la planta.

4',7-dimetilapigenina: obtenida de la salvia blanca (Romo De Vivar., 2006).

Para los tres propóleos analizados, la pinocembrina es el principal flavonoide presente en los extractos etanólicos, siendo el propóleo de las Trojes el que contiene en mayor proporción este compuesto. Estos resultados son similares a los obtenidos por Gardana *et al.* (2007), quienes demostraron que la pinocembrina era uno de los flavonoides más abundantes en las muestras de propóleos de varios países.

Con estos resultados se demuestra porque en la evaluación de la actividad antibacteriana los extractos etanólicos que resultaron ser activos son en su mayoría los extraídos con el método de maceración, ahora se puede atribuir este comportamiento al hecho de que los compuestos activos para la inhibición bacteriana, específicamente de la bacteria analizada *Streptococcus mutans*, se encuentran en su mayoría en las muestras extraídas con el método de maceración, siendo la pinocembrina el flavonoide que se encuentran en mayor concentración en los EEP.

Los resultados anteriores son congruentes con estudios previos realizados en el laboratorio del doctor José Fausto Rivero, donde se aislaron compuestos de tipo flavonoide como responsables de la actividad antibacteriana a partir de propóleos recolectados en el Altiplano mexicano, dentro de los compuestos con actividad antibacteriana se encuentran la pinocembrina, la acacetina y otros (Medina, 2011; Ortega y Téllez, 2010).



## 7. CONCLUSIONES

- En México, no se cuenta con información suficiente sobre la composición química y la actividad biológica de los propóleos, siendo esta necesaria debido a la amplia utilización y complejidad del propóleo, por esto se debe centrar la atención en la estandarización de las técnicas de extracción y de los extractos del mismo para así poder garantizar la actividad biológica de dichos extractos, que posteriormente pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.
- A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que para obtener porcentajes de rendimiento altos de los propóleos de Valentín, las Trojes y de Bonilla, pertenecientes a la Delegación Milpa Alta, se deben realizar los extractos etanólicos por el método de extracción continua (Soxhlet) ya que de acuerdo a los resultados experimentales, es el método por el cual se obtienen los mayores rendimientos. Por otra parte, la mejor concentración de etanol para preparar el extracto etanólico para obtener buenos rendimientos con cualquiera de los tres métodos de extracción estudiados, es con etanol al 96%.
- Sin embargo, para obtener los mejores resultados sobre la inhibición del crecimiento de las bacterias *S. mutans*, el método de Soxhlet no es el más adecuado ya que la mayoría de los extractos etanólicos de los propóleos obtenidos por éste método no inhibieron con concentraciones límite de 1000 µg/mL. Por otro lado, al realizar la cuantificación de la actividad antibacteriana para los extractos obtenidos por el método de maceración se encontró que los MICs eran de Valentín obtenidos por maceración al 96%, 70% y 50%, los extractos del propóleo las Trojes obtenido por maceración al 96%, 70% y al 50%; y los extractos del propóleo de Bonilla obtenidos por maceración al 96%, 70%, 50%, por lo cual los extractos se consideran activos.
- La actividad de inhibición bacteriana en extractos de propóleo obtenidos por el método de maceración, se atribuye principalmente a los resultados obtenidos al realizar el análisis de las muestras en HPLC, donde se observa en los cromatogramas obtenidos para los tres métodos de extracción que los extractos de propóleo obtenidos por maceración contienen mayor concentración de sus



flavonoides presentes, siendo la pinocembrina la que se encuentra en mayor cantidad en los propóleos estudiados de la Delegación Milpa Alta.

- En cuanto a la caracterización química de los propóleos estudiados, se observa una diferencia notable de estos con respecto a lo descrito por Papotti y cols. (2012), siendo los extractos del propóleo de Valentín los que se asemejan más a la composición descrita por los autores. Con respecto al propóleo de las Trojes y al de Bonilla, se puede observar que la mayor composición de estos es cera presentando más del 50% de este componente, difiriendo de lo descrito por Papotti y cols (2012) y del propóleo de Valentín.



## 8. PERSPECTIVAS.

- Aplicar los métodos utilizados en éste trabajo para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos y alimenticios preparados con propóleo como principio activo.
- Desarrollar un método por HPLC para determinar cuantitativamente los flavonoides pinocembrina, acacetina, 4,7-dimetilapigenina y 4,7-dimetilnaringenina.
- Aislar y determinar los compuestos mayoritarios presentes en las resinas y bálsamos de los propóleos con la mejor actividad biológica
- Determinar el efecto de los extractos etanólicos sobre un número más amplio de microorganismos.



## 9. ANEXO I



**Cuadro A.** Rendimientos en porcentajes de la extracción etanólica del propóleo de Valentín.

Números 1.- corresponden a 96% de etanol; números 2.- corresponden a 70% etanol; 50% de etanol.

<b>PROPÓLEO DE VALENTÍN</b>									
	<b>MACERACIÓN</b>			<b>SONICACIÓN</b>			<b>SOXHLET</b>		
	Peso inicial	peso final	%R	Peso inicial	peso final	%R	Peso inicial	peso final	%R
<b>1</b>	2.0047 g	1.1888 g	59.3	2.0025 g	1.2451 g	62.18	2.0001 g	1.6171 g	80.9
<b>1'</b>	2.0013 g	1.2457 g	62.24	2.0014 g	1.2987 g	64.89	2.0029 g	1.6360 g	81.7
<b>1''</b>	2.0016 g	1.2800 g	64.02	2.0006 g	1.3271 g	66.34	2.0039 g	1.5923 g	79.5
<b>2</b>	2.0006 g	0.9979 g	49.88	2.0024 g	0.9838 g	49.13	2.0024 g	1.5288 g	76.4
<b>2'</b>	2.0018 g	0.9952 g	49.72	2.0042 g	1.0189 g	50.84	2.0022 g	1.5078 g	75.3
<b>2''</b>	2.0020 g	0.9150 g	45.7	2.0068 g	0.9968 g	49.67	1.9800 g	1.4907 g	75.3
<b>3</b>	2.0015 g	0.5454 g	27.25	2.0025 g	0.6500 g	32.46	1.9880 g	1.3042 g	65.6
<b>3'</b>	2.0012 g	0.5815 g	29.06	2.0008 g	0.6764 g	33.81	2.0013 g	1.3401 g	67
<b>3''</b>	2.0007 g	0.6058 g	30.28	2.0027 g	0.6902 g	34.46	2.0014 g	1.3619 g	68.1



**Cuadro B.** Rendimientos en porcentajes de la extracción etanólica del propóleo las Trojes.

PROPÓLEO LAS TROJES									
	MACERACIÓN			SONICACIÓN			SOXHLET		
	Peso inicial	peso final	%R	Peso inicial	peso final	%R	Peso inicial	peso final	%R
<b>1</b>	2.0013 gr	0.8921 g	44.58	2.0018 g	1.0101 g	50.46	2.0010 g	1.7257 g	86.2
<b>1'</b>	2.0000 gr	0.9133 g	45.66	2.0010 g	1.0057 g	50.26	2.0012 g	1.7179 g	85.8
<b>1''</b>	2.0001 gr	0.8785 g	43.92	2.0018 g	0.9996 g	49.94	2.0015 g	1.7199 g	85.9
<b>2</b>	2.0011 gr	0.6841 g	34.19	2.0018 g	0.7970 g	39.81	2.0012 g	1.5414 g	77
<b>2'</b>	2.0000 gr	0.6665 g	33.33	2.0010 g	0.8086 g	40.28	2.0016 g	1.5751 g	78.7
<b>2''</b>	2.0010 gr	0.6815 g	34.06	2.0012 g	0.8191 g	40.93	2.0015 g	1.5374 g	76.8
<b>3</b>	2.0006 gr	0.4561 g	22.8	2.0008 g	0.7488 g	37.43	2.0015 g	1.0808 g	54
<b>3'</b>	2.0003 gr	0.4636 g	23.18	2.0011 g	0.7739 g	38.67	2.0016 g	1.1167 g	55.8
<b>3''</b>	2.0003 gr	0.4798 g	23.98	2.0010 g	0.7644 g	38.2	2.0017 g	1.1039 g	55.2



**Cuadro C.** Rendimientos en porcentajes de la extracción etanólica del propóleo de Bonilla.

PROPÓLEO DE BONILLA									
	MACERACIÓN			SONICACIÓN			SOXHLET		
	Peso inicial	peso final	%R	Peso inicial	peso final	%R	Peso inicial	peso final	%R
<b>1</b>	2.0016 g	0.8420 g	42.07	2.0008 g	0.8036 g	40.16	2.0010 g	1.8784 g	93.87
<b>1'</b>	2.0014 g	0.8438 g	42.16	2.0009 g	0.8082 g	40.39	2.0011 g	1.8921 g	94.55
<b>1''</b>	2.0009 g	0.8403 g	42.02	2.0008 g	0.8112 g	40.54	2.0006 g	1.8879 g	94.37
<b>2</b>	2.0014 g	0.6352 g	31.74	2.0004 g	0.4469 g	22.34	2.0011 g	1.5353 g	76.72
<b>2'</b>	2.0015 g	0.6307 g	31.51	2.0001 g	0.4487 g	22.43	2.0010 g	1.5440 g	77.16
<b>2''</b>	2.0013 g	0.6311 g	31.53	2.0001 g	0.4496 g	22.48	2.0008 g	1.5541 g	77.67
<b>3</b>	2.0014 g	0.4261 g	21.29	2.0009 g	0.2698 g	13.48	2.0007 g	1.0113 g	50.55
<b>3'</b>	2.0015 g	0.4201 g	20.99	2.0009 g	0.2637 g	13.18	2.0011 g	1.0358 g	51.76
<b>3''</b>	2.0016 g	0.4193 g	20.95	2.0009 g	0.2771 g	13.85	2.0011 g	1.0191 g	50.93



**Cuadro D.** Se muestra la cuantificación y extracción en gramos y porcentajes de cera, bálsamo y resina del propóleo de Valentín.

Cuadro D. Cantidad de cera, bálsamo y resina del propóleo de Valentín.									
	peso inicial g	cera (g) / cera (%)		bálsamo (g) / bálsamo (%)		resina (g) / resina (%)		total (g) / total (%)	
1er réplica	2.9998	1.2829g	42.73%	0.1943g	6.48%	1.1963g	39.88%	2.6725	87.57%
2da réplica	3	1.2806g	42.69%	0.1915g	6.38%	1.1970g	39.90%	2.6691	88.97%
3er réplica	3	1.2638g	42.13%	0.1887g	6.29%	1.1848g	39.49%	2.6373	87.91%
Promedio	2.9999	1.2754g	42.52%	0.1915	6.38%	1.1927	39.76%	2.6596	88.15%

En el **cuadro E.** Se muestra la cuantificación y extracción en gramos y porcentajes de cera, bálsamo y resina del propóleo las Trojes.

Cuadro E. Cantidad de cera, bálsamo y resina del propóleo las Trojes.									
	peso inicial g	cera (g) / cera (%)		bálsamo(g) / bálsamo (%)		resina (g) / resina (%)		total (g) / total (%)	
1er réplica	3.0010	1.8047	63.80	0.1752	5.5	0.3508	11.69	2.3307	80.99
2da réplica	3.0014	1.8891	62.94	0.1775	5.91	0.3556	11.85	2.4222	80.7
3er réplica	3.0009	1.8675	62.23	0.1807	6.02	0.3567	11.87	2.4049	80.12
Promedio	3.0011	1.8538	62.99	0.1778	5.81	0.3544	11.80	2.3859	80.60

En el **cuadro F.** Se muestra la cuantificación y extracción en gramos y porcentajes de cera, bálsamo y resina del propóleo de Bonilla.

Cuadro F. Cantidad de cera, bálsamo y resina del propóleo de Bonilla.									
	peso inicial g	cera (g) / cera (%)		bálsamo(g) / bálsamo (%)		resina (g) / resina (%)		total (g) / total (%)	
1er réplica	3.0010	1.9282	64.25	0.4267	14.22	0.2839	9.46	2.6388	87.93
2da réplica	3.001	1.9539	65.11	0.4492	14.96	0.2738	9.12	2.6769	89.19
3er réplica	3.0011	1.9559	65.17	0.4357	14.52	0.2803	9.34	2.6719	89.03
Promedio	3.0010	1.9460	64.84	0.4372	14.57	0.2793	9.31	2.6625	88.72



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., et al. **2007**. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*. 101, 1400-1409.
- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. **2005**. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*. 89, 27-36.
- Bankova, S., Castro, S. and Marcucci, M.C., **2000**. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31, 3-15.
- Bankova, V. **2005**. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1): 29-32.
- Basim, E., Basim, H., Özcan, M. **2006**. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *J. Food Eng*. 77, 992-996.
- Bosio, K., Avanzini, C. **2000**. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett. Appl. Microbiol*. 31, 174-177.
- Burdock, G. A. **1998**. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol*. 36, 347-363.
- Dausch, A., Morales, C., Fort, P., Park, Y. **2008**. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative Medicine*, 5 (4), 435-441.
- Castaldo, S., Capasso, F. **2002**. Propolis an old remedy used in, modern medicine. *Fitoterapia*. 73, 1-6.
- Cirasino, L., Pisati, A., Fasani, F. **1987**. Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, 16, 110-111.
- Coneac, G., Gafitani, E., Hadaruga, D. I., Hadaruga, N. G., Pinzaru, I. A., Bandur, G., Ursica, L., Paunescu, V., Gruia, A. **2008**. Flavonoid Content of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activity. *Chem Bull. Politechnica Univ*. 53 (67), 1-2-
- Correa, B. A., Becerra-Guzmán, F. J., Contreras-Escareño, F., Rodríguez, Galicia, B., Gómez Peña, M., Gris Valle, A. G., López Ramírez, A., Reyes Retana, E. T., Oropeza Aguilar, M. I. **2004**. Abejas. *Imagen Veterinaria*. 4(1), 4-57.



- Crane, E. **1999**. History of other products from bees. The World history of beekeeping and honey hunting. *Gerald Duckworth y Co.*
- De Castro Ishida, V.F., Negri, G., Salatino, A., Bandeira, M.F. **2010**. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*. 125, 966-972.
- Domínguez, G., **2009**. Pulpotomía en dientes de la primera dentición con MTA y propóleo. Tesina de licenciatura, UNAM, México, D.F.
- Duarte, J., Pérez-Vizcaíno, F., Utrilla, P., Jiménez, J., Tamargo, J., Zarzuelo, A. **1993**. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology: The vascular System*. 24, 857-862.
- Dunne Jr, W. M. **2002**. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155-166.
- Falçao, S.I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L.M., Barros, C., Domingues, M.R.M., Cardoso, S.M. **2010**. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396:887-897.
- Farré, R., Frasset, I. and Sánchez, A., **2004**. El propólisis y la salud. *Ars. Pharmaceutica*. 45, 21-43.
- Fearnley, J. **2001**. Bee propolis: natural from the hive, Souvenir Press, London.
- Gardana, C. *et al.* **2007**. Análisis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 45:390-399.
- Ghisalberti, E. L. **1978**. Propolis: A review. *Bee World*. 60, 59-84.
- González, A y Bernal, R., **2002**. Propóleos: un camino hacia la salud. Editorial Cuarto día, tercera edición México. Jalisco., 8, 12,15.
- Hegazi, A., Abd El Hady, F. **2002**. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z Naturforsch.* 57 (3-4), 395-402.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. **2012**. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, 2ª edición, Churchill Livingstone, Elsevier.
- 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. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Hsiang, S., Yang, M., Ween, H., Chern, J. **2005**. Analysis of Flavonoids in Propolis by Capillary Electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13(1): 43-50.
  - Kalogeropoulos, N., Spyros, J. Konteles., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Vaios, T. Karathanos. **2009**. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 116, 452-461.
  - Krzysciak, W., Jurczak, A., Koscielniak, D., Bystrowska, B., Skalniak, A. **2014**. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 33 (4), 499-515.
  - 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., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T. **2003**. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull*. 51(6):740-742.
  - Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., Krol, W. **2013**. Historical aspects of propolis research in modern times, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2013:1-11.
  - Lesser Preuss Rodolfo. **1997**. Manejo y crianza práctica de las abejas. Como usar los productos de las abejas en la salud del hombre. Editorial Andrés Bello, primera edición, Chile., 130-131.
  - Lin, S., Chung, C., Chiang, C., Hsu, S. **1999**. The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. *Am J Chin Med*. 27(1):83-94.
  - 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.
  - Marcucci, M. C. **1995**. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26:83-99



- Marcucci, M. A., **1996**. Propiedades biológicas e terapéuticas dos constituintes químicos da propolis. *Química nova*. 19, 529-536.
- Martínez, C., **2008**. Efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento y el daño estructural de *Candida albicans*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Martínez, L. Delgado, M. Rojas, N. Casillas, R., **2010**. El propóleo y las técnicas para su colecta. *Notiabeja*. Núm. 6.
- Medina, M., **2011**. Compuestos derivados del extracto etanólico del propóleo con actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Tesis de licenciatura. UNAM, México, D.F.
- Montgomery, D. Diseño y análisis de experimentos, Limusa Wiley, 2ª. Edición, **2011**, 228-246.
- Moreno, H. Zulema., Martínez, A. Patricia., Figueroa, J. **2007**. Efecto antimicrobiano *In vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubanos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *NOVA*. 5 (7), 70-75.
- Moskaug, J., Carlsen, H., Myhrstad, M. C., Blomhoff, R. **2005**. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*. 81 (1), 277-283.
- Murat, K., Serdar, K., Semra, K. GC-MS. **2002**. Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z Naturforsch*. 57: 905-909.
- Niraldo, P., Avaliacao, **2005**. Da actividade antiinflamatória do extracto padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin C. Tesis de Doctorado, Florianópolis, Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Orsolid, N., Basid. **2003**. Inmunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol*. 84 (2-3), 265-73.
- Ortega, F. y Téllez, B., **2010**. Influencia de compuestos derivados del propóleo en la formación de biocapas mono especie por *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Page W. Caudield., Dasanayake, P. Ananda., Yihong, L., Yaping, P., Jay, H., Hardin, J. Michael. **2000**. Natural History of *Streptococcus sanguinis* in the Oral Cavity of Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. *Infection and Immunity*. 68 (7), 4018-4023.



- Palomino, L., **2009**. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Tesis de maestría.
- Pappoti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L. Y Plessi, M., **2012**. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (11), 2852-2862.
- Peña, R., **2008**. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación agraria*. 35 (1), 17-26.
- Pimenta, D., Alves, A., Morseli, A., Kenupp, J. and Cropanese, A. **2004**. Comparative Evaluation of in-Vitro Effects of Brazilzn Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Biol. Pharm. Bull.* 27(11): 1834-1839.
- 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, México D.F.
- Romo De Vivar, A.R., **2006**. Química de la Flora Mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química. UNAM. 1ª. Ed. Instituto de Química.
- Rosas-Piñon, G., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M., Sánchez-Nieto, S. y Rivero-Cruz, F., **2012**. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane región of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*. 141(3): 860-5.
- 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.
- Thuy Do., Keith A. Jolley,., Martin C. J. Maiden., Steven C. Gilbert., Douglas Clark., William G. Wade., Beighton, D. **2009**. Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology*. 155 (8), 2593-2602.
- Toretì, V., Sato, H., Pastore, G., Park, Y. **2013**. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Touyz, R.M. y Schiffrin, E.L. **2004**. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*. 122, 339-352.



- Vynograd, N., Vynograd, I., Sosnowski, Z. **2000**. A comparative multicentre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*. 7(1), 1-6.
- Villar del Fresno, A., **1999**. Farmacognosia general. Ed. Síntesis, Madrid, pág. 87-93.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. **2008**. Functional properties of honey, propolis, and royal jell. *J Food Sci*. 73 (9), R117-24.
- Wollenweber, E., Hausen, B. M., Greenaway, W., **1990**. Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. *Bulletin de Groupe Polyphenols*. 15, 112-120.

#### REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

- “Cuaderno Estadístico Delegacional de Milpa Alta, Distrito Federal, edición 2007. Mapas.” Obtenido de: [www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem07/info/df/m009/mapas.pdf](http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem07/info/df/m009/mapas.pdf) el 3 de julio del 2016 a las 13:11 p.m.
- “El propóleo a través de la historia”. Sin autor. Obtenido de <https://dranaturaleza.wordpress.com/2013/02/19/el-peopoleo-a-traves-de-la-historia/> el 15 de abril del 2016 a las 8:29 p.m.
- “Nuestros primeros apicultores”. La Orza Ibérica<sup>R</sup>. **2014**. Obtenido de <https://laorzaiberica.wordpress.com/2014/02/> el 15 de abril del 2016 a las 9:22 p.m.
- “Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (seduvi).” **2010**. Obtenido de <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Estatal/Distrito%20Federal/wo63526.pdf> el 3 de julio del 2016 a las 14:23 p.m.