



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIA DE FARMACOGNOSIA

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE UN PROPÓLEO DE CHIHUAHUA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

ESLI SHARAI VARGAS LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017





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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dra. María Margarita Canales Martínez

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla

Mtra. Judith

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

PAPIIT IN211614 y IN213713

PAPCA 2014 (No.9)

El análisis de HPLC-MS fue realizado en el Laboratorio Nacional (CONACyT)
de la FES Iztacala (UNAM)

"Para triunfar en la vida, no es importante llegar primero,
para triunfar simplemente hay que llegar levantándose cada vez
que se cae en el camino"

Anónimo

"Sigo la naturaleza sin ser capaz de alcanzarla"

Claude Monet

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por permitir mi formación dentro de sus aulas y comprender el verdadero significado de una carrera universitaria.

A la Dra. Margarita Canales por todo el apoyo y paciencia.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy por las valiosas aportaciones y ayuda brindada para la realización de esta tesis.

Al Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz por tomarse el tiempo para leer, corregir y enriquecer este proyecto.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla le agradezco su ayuda en los experimentos y sus correcciones.

A la M. en C. Judith Salas Oropeza por su tiempo para leer, por sus aportaciones y correcciones.

DEDICATORIAS

A MI MAMÁ:

A ti mi hermosa mamirínga, gracias por ser mi guía, mi consejera, mi apoyo, mi amiga, pero sobre todo mi madre. Gracias por esos regaños en momentos indicados, gracias por las enseñanzas que me brindaste, gracias por la educación que me diste, gracias por siempre darme una palabra de aliento para salir adelante, gracias por haber hecho de mí una gran mujer, gracias por siempre estar orgullosa de tu RATONA. Esta tesis te la dedico a ti por creer en mí todos los días y por estar conmigo en los momentos más difíciles, porque no sé qué hubiese hecho sin esos abrazos, sin esas sonrisas, sin esos regaños, sin esos mensajes que sólo tú me sabes dar. Por todo esto y muchísimas cosas más. TE AMO MAMIRINGA.

A MI PAPÁ:

A ti mi conejito de la suerte, porque sin duda eres un extraordinario padre. Tus risas, tus regaños de vez en cuando, tu manera de decirme que no me rinda, han hecho de mí una mujer capaz de lograr grandes retos y decir uno entre mil yo triunfaré. Eres un padre ejemplar que nos ha dado todo su amor y ha velado por el bienestar de esta hermosa familia. Gracias por apoyarme en esta aventura, gracias por enseñarme a que de las circunstancias más difíciles nos levantemos, gracias por apoyarme en mis estudios. Gracias por ser mi conejito de la suerte, mi padre, mi amigo. Esta tesis te la dedico a ti por creer en mí día a día. TE AMO PAPIRINGO

A MI ABUELITA:

A ti mi abuelita guerrera a quien su fortaleza y coraje distinguen. Agradezco cada día que estés a mi lado, gracias por quererme tanto, gracias por esas pláticas interminables, gracias por los consejos que me dabas, gracias por creer en mí, gracias por estar ahí al pie del cañón conmigo, gracias por esos abrazos, gracias por esas lágrimas de felicidad que hemos tenido, gracias por apoyarme y sobre todo gracias por confiar en mí. Esta tesis te la dedico a ti por creer y esperar lo mejor de mí. TE AMO ABUE

A MI HERMANO EDU (CHOCOLATE):

A ti Edu, por ser ese hermano que a pesar de ser más pequeño que yo está conmigo tendiéndome una mano, por guardar mis secretos, por hacerme compañía en todo momento, por darme consejos, por escucharme hablar horas y horas de mi hermosa carrera

aunque te desesperaba, gracias por los momentos de desestrés que me hacías tener viendo películas, cantando, bailando jéje. Gracias por demostrarme que eres un niño con mente y corazón grande. TE AMODORO CHOCOLATE.

A MI HERMANO ERICK (BOLA):

A tí bola por tu peculiar forma de hacerme burla cada que puedes, por tus bromas, por ser tan gracioso y por hacerme los días más divertidos en casa. Gracias por apoyarte en mí y hacerme compañía en las madrugadas. Eres un hermano extraordinario y tienes la capacidad para lograr todo aquello que te propongas. Sabes que puedes contar siempre conmigo. TE AMODORO BOLA

A MI HERMANO RAMSES (RANA):

A tí pequeño ranita travieso, gracias por las travesuras que me haces, gracias por ayudarme en algunas ocasiones, gracias por ponerme a jugar contigo tatos para desaburrirme, gracias por hacerme enojar jajaja, gracias por compartir tu música conmigo. Recuerda que aun tienes un camino largo por recorrer en el cual no estarás solo, me tienes a mí, a Erick y a Uriel para apoyarte en lo que necesites, y que siempre estaremos buscando lo mejor para tí. TE AMODORO RANITA

A TI "MIAN":

Por estar conmigo desde el día que te conocí, por siempre tener una buena actitud, por acompañarme en todo momento, por explicarme aquello que no entendía y/o preguntaba.

Te agradezco por estar a mí lado y disfrutar hermosos momentos conmigo, gracias por el amor que me tienes, gracias por ser tan lindo conmigo, gracias por esos debates que luego teníamos, gracias por ser como eres, gracias por enseñarme a defenderme un poco jéjeje, gracias por protegerme y cuidarme cuando lo necesitaba, pero sobre todo gracias por ser ese niño lindo y tierno con el que sé que puedo contar en cualquier situación. No me queda duda de que el destino nos colocó en el mismo camino y de nosotros depende seguir caminando juntos, así que toma mí mano y sigamos por ese gran camino junto. TE AMO!!!

A LA DRA. MARGARITA CANALES:

A usted quien confió en mí, a usted que es un gran ejemplo a seguir, le agradezco inmensamente el apoyo incondicional que me ha brindado, gracias por enseñarme lo

hermoso que es estar en un laboratorio, gracias por formar parte de mi vida, gracias por enseñarme a que siempre hay que esforzarnos al máximo y siempre dar lo mejor de nosotros. LA QUIERO MUCHÍSIMO

AL DR. MARCO RODRIGUEZ:

A usted quien con una sonrisa muestra el aprecio que nos tiene, le agradezco inmensamente el apoyo incondicional y desinteresado que me ha brindado. De usted se aprenden solo grandes cosas y espero algún día aprender más de ellas. LO QUIERO MUCHÍSIMO.

A MIS PRIMOS:

BRIAN, DANIELA y JIMENA a ustedes que tienen un camino largo que recorrer recuerden que la perseverancia es la clave del éxito y siempre contarán conmigo. LOS QUIERO MUCHO

A MIS AMIGOS

A ustedes que me brindaron su amistad, su confianza, sus enseñanzas y su manera tan peculiar de hacerme sonreír.

YAZMIN† a ti que más que mi amiga fuiste y serás siempre mi hermana mayor quien me enseñó que la vida hay que disfrutarla al máximo, a ti que con tus consejos, tu cariño, tu sonrisa, tu alegría, me hacían ver las cosas de otra manera, gracias por todo el cariño que me tuviste, gracias por ser parte de mi vida, gracias por esos campamentos compartidos, gracias por esa manera tan especial de entregarme mi pañoleta, gracias por haberme hecho parte de tu familia, te quiero muchísimo, siempre estarás en mi corazón y en mi mente.

ANI nena muchísimas gracias por todo el apoyo que me brindaste, por apoyarme a realizar algunos experimentos jéje que días verdad, gracias por todos los momentos que compartimos durante esa realización y gracias por ser como eres TKM.

RBK gracias por escucharme y darme tus consejos, gracias por apoyarme en mis experimentos y tenerme paciencia, de ti he aprendido mucho, sobre todo a no darte por vencida y siempre perseguir tus sueños, eres una guerrera y sé que en ti puedo confiar TKM. **NELLY** gracias por esas charlas, gracias por tu gran apoyo, enseñanzas brindadas, gracias por tener la paciencia de que te acompañara a ver a tus ratoncitos jéjéje, gracias

Vargas López Esli Ibarra

por ser como, eres una amiga en la cual puedo confiar TKM. **GAB REBELDE** gracias por cada momento compartido, por escucharme y darme tus consejos y sobre todo por apoyarme en cada momento TKM. **ELVIUX** gracias por la paciencia que me tenías jeje, gracias por esas risas y bromas, gracias por ser una chica carismática, TKM. **FANY** amiba jeje gracias por cada momento compartido, risas, lágrimas y charlas interminables TKM. **LUCERO** luciérnaga gracias por apoyarme en momentos difíciles, gracias por siempre levantarme con una palabra de aliento y una sonrisa, gracias por la confianza que me has brindado, eres una amiga súper genial TKM.

ALBA gracias por esas pláticas de viernes extensas, gracias por convivir conmigo durante tu estancia, gracias por brindarme tu amistad y sobre todo gracias por confiar en mí TKM.

ACOYANI gracias por esas pláticas interminables en donde nos faltaba más tiempo, gracias por el apoyo que me has brindado y por la grandiosa amistad, TKM.

GABY nena gracias por las risas compartidas, eres una amiga muy genial TKM.

ALI chamaca jejeje gracias por los momentos compartidos fuera y dentro del laboratorio, por esas salidas y esos experimentos juntas, gracias por ser una gran persona y sobre todo gracias por haberme dado la oportunidad de convivir contigo, que divertida nos damos caray jeje. TKM ALI

KARLITA gracias por explicar aquello que no entendía, gracias por tenerme la paciencia necesaria, y sobre todo gracias por compartir tu conocimiento. TKM

NATY amigozoca jajaja gracias por los momentos compartidos desde hace años, tarde un poco pero nunca es tarde jeje, gracias por las risas y tu manera peculiar de escribirme jajaja. TKM

ERICK a tí tronco por ser un buen amigo y por apoyarme, por ser ocurrente y divertido jejeje, por las risas y charlas que hemos compartido, TKM.

MANUEL gracias por haberme apoyado en mis experimentos y sobre todo gracias por brindarme tu amistad, risas, charlas, te quiero.

A **REFUGIO, IRI, TOÑO, POLLO, KAREN, FER, ABI, FERNANDA, PAVEL**, por despertarme todas las mañanas con algún mensaje de ánimo y por siempre hacerme reír en momentos indicados, por sus ocurrencias y locuras, **LOS QUIERO**.

Vargas López Esli Sharai

AL LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA E INMUNOBIOLOGIA

A ustedes que hicieron que los experimentos fueran más divertidos, gracias por su apoyo brindado, gracias por los congresos compartidos y las locuras vividas en ellos, gracias por mostrar el lado divertido a todo, gracias por sus ocurrencias, gracias por su manera peculiar de enseñarme, los quiero y los aprecio, OSCAR, MARIO, ALONSO, VANE, JUDITH, RUBÉN, PILI, GUS, MICHAEL, ANA, HAT, IVAN, MARLENE, LESSLIE, MARA, JOSE, EMMANUEL.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	14
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	16
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
Colecta del material	17
Obtención del extracto metanólico	17
Actividad antibacteriana	19
Evaluación cualitativa	19
Evaluación cuantitativa	19
Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	19
Actividad antifúngica	20
Hongos levaduriformes.....	20
Hongos filamentosos	21
Evaluación cualitativa	21
Evaluación cuantitativa	22
Actividad antioxidante del extracto	22
Fenoles totales.....	22
Flavonoides	23
Toxicidad general	23
Caracterización química del extracto	23
Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS	25
Características organolépticas	25
Rendimiento del propóleo	25
Actividad antibacteriana	25

Evaluación cualitativa	25
Evaluación cuantitativa	27
Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	28
Actividad antifúngica	31
Evaluación cualitativa	31
Evaluación cuantitativa	31
Actividad antioxidante del extracto	36
Cuantificación de Fenoles totales	37
Cuantificación de flavonoides totales	37
Toxicidad.....	38
Caracterización Química.....	40
Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	40
Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	45
Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM)	48
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	59
APÉNDICE 1. Zona de Colecta	60
APÉNDICE 2. Técnica de maceración	61
APÉNDICE 3. Método de difusión en agar Kirby-Baüer	62
APÉNDICE 4. Microtécnica de dilución en caldo	64
APÉNDICE 5. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano	66
APÉNDICE 6. Inhibición del crecimiento radial	68
APÉNDICE 7. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)	70
APÉNDICE 8. Determinación de la concentración de Fenoles Totales (CFT).....	74
APÉNDICE 9. Cuantificación de flavonoides totales.....	77
APÉNDICE 10. Método de toxicidad general	80
APÉNDICE 11. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	82
APÉNDICE 12. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	84

APÉNDICE 13. Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM)	86
REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos.	4
Cuadro 2. Principales componentes aislados en el propóleo	12
Cuadro 3. Características organolépticas para el propóleo	17
Cuadro 4. Cepas bacterianas utilizadas	20
Cuadro 5. Cepas de hongos levaduriformes utilizadas	21
Cuadro 6. Cepas de hongos filamentosos utilizadas	21
Cuadro 7. Características organolépticas del propóleo de Chihuahua obtenido del apiario de Eligio Concordia	25
Cuadro 8. Halos de inhibición en las bacterias frente a las concentraciones del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua	26
Cuadro 9. CMI y CBM del extracto metanólico de propóleo para las cepas bacterianas	28
Cuadro 10. Actividad del propóleo sobre hongos filamentosos	31
Cuadro 11. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial sobre <i>Fusarium moniliforme</i>	32

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	34
Cuadro 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial sobre <i>Aspergillus niger</i>	35
Cuadro 14. Concentración letal media del propóleo sobre larvas nauplio de <i>Artemia salina</i>	39
Cuadro 15. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del propóleo de Chihuahua	42
Cuadro 16. Compuestos presentes en el propóleo de Chihuahua	47
Cuadro 17. Compuestos del HPLC del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua	50
Cuadro 18. Curva patrón para la determinación de fenoles totales	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Maceración del propóleo.	18
Figura 2. Destilación del extracto metanólico crudo, en el rotavapor	18
Figura 3. Extracto metanólico del propóleo.	18
Figura 4. Sensibilidad de cada cepa bacteriana frente al propóleo	27
Figura 5. Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 33592	29
Figura 6. Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre la curva de crecimiento de <i>P.aeruginosa</i> .	30
Figura 7. Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium moniliforme</i>	33
Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	34
Figura 9. Inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i>	35
Figura 10. Reducción del radical DPPH por el extracto metanólico del propóleo	36
Figura 11. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales.	37
Figura 12. Curva patrón para el cálculo de flavonoides totales	38
Figura 13. Toxicidad general del propóleo de Chihuahua	39

Figura 14. Cromatograma del análisis HPLC del propóleo de Chihuahua.	41
Figura 15. Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua	46
Figura 16. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-EM) del extracto metanólico del propóleo	49
Figura 17. Ubicación del apiario donde se realizó la Colecta del propóleo de Chihuahua.	60

ABREVIATURAS

CA₅₀	Concentración Antioxidante Media
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil
DMSO	Dimetilsulfóxido
eAG	Equivalentes de ácido gálico
eC	Equivalentes de catequina
eQ	Equivalentes de quercetina
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución-acoplada a espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)

Vargas López Esli Sharaí

RESUMEN

Se sabe que el propóleo está constituido por una gran variedad de compuestos químicos y su composición es variable. Varía, según la fuente de procedencia, en su color, de amarillo claro a marrón o incluso negro. A temperaturas bajas es rígido y quebradizo, mientras que a temperaturas altas es suave y pegajoso. Sus propiedades medicinales son conocidas desde épocas antiguas y se le ha empleado en tratamiento de enfermedades como resfriados, infecciones, tos, úlceras, así como antiséptico y cicatrizante, ya que posee actividades como: antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiparasitario, anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, hepatoprotector e incluso citostático.

Es importante resaltar que no se han realizado estudios previos sobre la actividad antimicrobiana del propóleo de Chihuahua siendo este el objetivo principal. Se obtuvo el extracto metanólico del propóleo, se evaluó cualitativamente la actividad antimicrobiana, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se evaluó la sensibilidad de las cepas sobre la curva de crecimiento bacteriano, se determinó la concentración fungicida media (CF₅₀), se determinó la actividad antioxidante, se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides totales, se determinó la toxicidad general, se realizó la caracterización química del extracto por medio de una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y una cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM).

Como resultados se obtuvo que el extracto metanólico del propóleo mostró actividad inhibitoria en bacterias Gram positivas y Gram negativas con halos de inhibición de hasta 17 mm. Las cepas más susceptibles fueron *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (CMI= 1.25 mg/mL, 1.25 mg/mL y CBM= 5.0 mg/mL, 10.0 mg/mL respectivamente). La cinética bacteriana demostró que el extracto

presentó actividad bactericida para ambas especies. De la misma forma se evaluó la actividad antifúngica con pruebas cualitativas y cuantitativas sobre tres hongos filamentosos los cuales fueron sensibles al propóleo presentando una inhibición del crecimiento mayor al 50% desde las primeras concentraciones ensayadas. La capacidad antioxidante media (CA₅₀) mostrada en el ensayo de reducción de DPPH fue de 412µg/mL, la cual se correlaciona con el contenido de fenoles totales y flavonoides (2580 mg (AG)/g y 135,412 mg (eQ)/g). La prueba de toxicidad general demostró que presenta toxicidad moderada para larva nauplio II de *Artemia* salina. La caracterización química del extracto de propóleo por medio de diferentes cromatografías nos mostró que los compuestos detectados en mayor abundancia en la CG-EM son ácido benzoico, Crisina y Pinocembrina mientras que en HPLC son fenoles, Pinocembrina, Naringenina, Crisina y flavonol, el HPLC-EM nos mostró que el extracto del propóleo posee muchos compuestos, pero los que se pudieron identificar fueron Pinocembrina y Naringenina. El compuesto detectado en mayor abundancia en la GC-MS fue Pinocembrina.

Dados los resultados obtenidos, es evidente el potencial para posibles investigaciones basadas en las propiedades del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua, frente a otros microorganismos o agentes patógenos, en el tratamiento contra enfermedades crónico degenerativas, así como en futuras investigaciones.

Palabras clave: propóleo, actividad bacteriana, actividad fúngica

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud menciona que las infecciones por microorganismos patógenos (bacterias, hongos, parásitos y virus) son la principal causa de mortalidad en el mundo (OMS, 2010).

Desde el descubrimiento de la penicilina hasta su posterior comercialización, los antibióticos han sido el tratamiento esencial contra las enfermedades infecciosas. Su aplicación, en ocasiones no es efectiva, ya que su uso inapropiado, la automedicación, la dispensación de antibióticos no regulados y la interrupción del tratamiento contra las infecciones incrementa las bacterias patógenas resistentes a los mismos, como un mecanismo de defensa y estrategia de supervivencia de ellas mediante el empleo de su maquinaria genética y su adaptación al medio ambiente (Gibbons, 2004; Simões et al., 2009).

A pesar de que la penicilina era la mejor solución para las infecciones estafilocócicas, con el tiempo dichas bacterias han generado resistencia a este antibiótico en particular, en la actualidad son tratadas con penicilinas semisintéticas, como la metilina, sin embargo, también han surgido cepas de estafilococos resistentes a la metilina (Ingraham e Ingraham, 1998).

Esto llevó a la disminución rápida de la utilidad de la penicilina en infecciones por estafilococos, especialmente en pacientes hospitalizados, donde las cepas frecuentemente se encuentran antes que se diseminen a la comunidad (Gold y Moellering, 1996) y como este, existen varios ejemplos de antimicrobianos de los que ya se ha reportado resistencia, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes de los mismos (Errecalde, 2004).

<i>Droga</i>	<i>Descubrimiento</i>	<i>Uso clínico</i>	<i>Resistencia clínica</i>
<i>Penicilina</i>	1928	1943	1954
<i>Estreptomicina</i>	1944	1947	1956
<i>Tetraciclina</i>	1946	1942	1956
<i>Eritromicina</i>	1952	1955	1956
<i>Vancomicina</i>	1956	1972	1994
<i>Gentamicina</i>	1963	1967	1968
<i>Fluoroquinolonas</i>	1978	1982	1985

Por otro lado, cabe señalar que los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias pueden ser de naturaleza intrínseca (es decir, lo poseen todas las bacterias de la misma especie o grupo bacteriano) o bien de manera adquirida (sólo lo poseen ciertas bacterias de la especie) (Torres, 2012).

Las estrategias que utilizan las bacterias para hacerse resistentes o adquirir nuevos mecanismos de resistencia son:

Mutaciones: desde el punto de vista evolutivo, las mutaciones supondrían no sólo un error útil, sino una estrategia evolutiva de adaptación (Amoroso et al., 2006 y Gómez, 2011). Hoy en día se sabe que los antibióticos no se limitan a favorecer la selección de bacterias resistentes a los mismos, sino que también son capaces de incrementar la tasa de mutación de las bacterias (Baquero et al., 2001).

Adquisición y movilización de genes de resistencia exógenos mediante determinadas plataformas genéticas: por lo general, la resistencia farmacológica se

adquiere por transferencia horizontal de una célula donadora por uno de conjugación, transducción y transformación (Chambers, 2006).

La conjugación es la transferencia de genes por contacto entre dos células a través de un puente sexual (pilus). Este mecanismo es muy importante puesto que es posible transferir varios genes de resistencia en un sólo evento a través de un plásmido conjugativo (Chambers, 2007).

En la transducción, el ADN de la célula donadora penetra en la célula receptora por infección viral. Cuando el ADN posee un gen de resistencia farmacológica, la célula bacteriana recién infectada adquiere la resistencia (Passerini de Rossi, 2007).

El proceso de transformación involucra la captación e incorporación en el genoma de la bacteria receptora del ADN desnudo liberado en el ambiente por otras células bacterianas (Passerini de Rossi, 2007).

Con lo mencionado anteriormente, se sabe que la resistencia bacteriana a los antibióticos es un hecho conocido desde hace más de 50 años. Respecto a los hongos, este fenómeno era poco frecuente (Hudson, 2001). De tal manera que el desarrollo de los fármacos antifúngicos se inició más tardíamente y de manera lenta en comparación con la de los antibacterianos. Esto se dio debido a la poca relevancia que tenían las enfermedades fungosas y a la dificultad que representaban y que aún se tiene para lograr un fármaco con efectividad frente a células fúngicas (Sheehan et al., 1999).

Durante muchos años, los compuestos antimicóticos fueron escasos y poco efectivos. Para el tratamiento de las micosis superficiales se contaba únicamente con griseofulvina y nistatina. A partir de mediados del siglo pasado, la comercialización de anfotericina B, aunque tóxica, ayudó de manera importante en el tratamiento de micosis sistémicas (Chapman, 2003).

El creciente interés hacia los antifúngicos, se debe al aumento de las enfermedades fungosas que están estrechamente vinculadas a cambios producidos en la práctica médica como son: uso de fármacos que producen inmunosupresión (quimioterapia contra el cáncer, tratamiento con esteroides, tratamiento con inmunosupresores en pacientes con trasplantes de órganos), uso frecuente y a veces indiscriminado de antibióticos de amplio espectro que elimina la flora normal y el uso de catéteres intravenosos (Sevilla et al., 1998 ; Marr et al., 2002).

Aunado a esto, el uso profiláctico de antimicóticos durante largos periodos en pacientes con inmunosupresión, ha manifestado el riesgo de aparición de cepas resistentes en hongos causantes de micosis sistémicas, y también en agentes de micosis superficiales como las onicomycosis (Evans, 1998). La resistencia clínica que han creado estos organismos puede definirse como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección (Mellado et al., 2002).

Los mecanismos identificados hasta ahora, por los que una célula inicialmente sensible se hace refractaria a agentes citotóxicos son:

- A) Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de una célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior.
- B) Cambios en la interacción fármaco-diana (aumento del número de copias de la diana o modificaciones debido a mutaciones).
- C) Modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas
- D) Alteraciones en el procesamiento intracelular (degradación o modificación) del fármaco.

A pesar de que son pocas las observaciones que se han registrado, una cepa podría presentar más de uno de estos mecanismos, lo que explicaría la multiresistencia desarrollada en algunos hongos (Carrillo-Muñoz et al., 1997).

Es por ello que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento contra estas bacterias y hongos está enfocada básicamente en las plantas medicinales.

En México, el uso de las plantas medicinales data de épocas anteriores a la conquista. Los indígenas, en consecuencia de su íntimo contacto con la naturaleza, adquirieron amplios conocimientos sobre las virtudes curativas de las plantas (Martínez, 1967).

Muchas de las civilizaciones usaron la naturaleza como fuente de remedios curativos. Los registros más antiguos de medicina datan de hace 3500 años, pero los paleontólogos han encontrado manojos de hierbas medicinales entre los restos fosilizados de nuestros ancestros neandertales (Polunin y Robbins, 1992).

Años más tarde, con el auge de la medicina occidental y el inicio de la revolución industrial, se encontró que muchos de los compuestos responsables de las propiedades medicinales de las plantas (metabolitos secundarios), podían ser sintetizados a partir de reactivos químicos en el laboratorio, aminorando el interés por la medicina herbolaria y facilitando la producción de medicamentos para cubrir la demanda médica. Sin embargo, la sociedad médica no estaba conforme pues encontró que diversas sustancias usadas para tratamientos médicos, tenían efectos drásticos en el organismo provocando en ocasiones hasta la muerte del paciente (Peña, 1976).

Por otro lado, se sabe que las infecciones de la piel pueden ser producidas por bacterias, virus, hongos y artrópodos. Generalmente la mayoría de las infecciones bacterianas de la piel son infecciones localizadas, aunque algunas pueden extenderse y originar enfermedades sistémicas potencialmente mortales (Ingraham e Ingraham, 1998).

De entre los microorganismos capaces de ocasionar enfermedades sistémicas se encuentran los estafilococos tales como *Staphylococcus epidermidis* que se encuentra en la piel y mucosa nasal de casi todas las personas, muchas personas sanas también albergan cepas virulentas de *S. aureus* en sus conductos nasales. Los estafilococos suelen infectar la piel y los tejidos blandos subyacentes, aunque está documentada la existencia de infecciones estafilocócicas que afectan a cualquier órgano del cuerpo, como los huesos, las articulaciones, pulmones y el corazón principalmente (Ingraham e Ingraham, 1998).

Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros o con actividad antioxidante (Croteau et al., 2000). La síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo de herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda et al., 2004).

Debido a esto se ha volteado la vista al mundo botánico, del cual se sabe que las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda et al., 2004).

Productos naturales

Los productos naturales han constituido materias primas valiosas para la industria farmacéutica de fuentes potenciales para fabricar productos con actividad

antimicrobiana (Clardy et al., 2006). Eloff (1998) reporta que entre el 14-28% de las especies de plantas superiores, se utilizan medicinalmente y que el 74% de los componentes farmacológicamente activos derivan de las plantas superiores, que fueron descubiertos después de una evaluación etnomédica.

Los tratamientos tanto clásicos como alternativos tienen como fin maximizar los efectos positivos (tales como la inactivación de las bacterias o su muerte) durante el periodo en el cual los niveles de los compuestos activos están presentes, y minimizar los efectos negativos (crecimiento, inducción de la resistencia, citotoxicidad, interacción con microorganismos que no son su blanco y efectos adversos sobre el medio ambiente) cuando se encuentran los efectos activos en concentraciones sub-inhibitorias (Simões et al., 2009).

Funciones generales de los productos naturales

Los productos naturales con reconocida actividad antibacteriana pertenecen principalmente a las siguientes clases estructurales: fenoles, terpenoides, alcaloides, lectinas, polipéptidos y poliacetilenos (Cowan, 1999; Gibbons, 2004; Copping y Duke, 2007; Stavri et al., 2007). Se considera que cada clase de productos, además de su función potencial contra patógenos invasores, posee otras funciones en la fisiología y funcionalidad de la planta.

Actividad antibacteriana de compuestos derivados de las plantas

En este marco de referencia, los compuestos derivados de las plantas pueden inhibir el crecimiento de las bacterias mediante mecanismos diferentes a los que presentan los antibióticos utilizados comúnmente en la terapéutica.

Actualmente, en la literatura se encuentran numerosos reportes sobre la actividad antibacteriana de plantas (Mendoza et al., 1997; Griffin et al., 1999), sobre algunas

cepas, tales como *Staphylococcus aureus* (Khan et al., 2006), *Helicobacter pylori* (Lin et al., 2005), de *E. coli* (Plaper et al., 2003), entre otras. Estos estudios indican que los compuestos aislados pueden poseer diversos sitios blancos y muchos de los mecanismos de acción no están completamente elucidados.

Un ejemplo de estos productos naturales es el propóleo, el cual ha causado interés en los investigadores de las últimas décadas debido a varias propiedades biológicas y farmacológicas, como inmunomodulador, antitumoral, antibiótico, antiinflamatorio, antioxidante, entre otros (Bankova et al., 2000).

Propóleo

Definición: El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena (Farré et al., 2004). Es también el responsable de la sanidad de los panales en especial contra microorganismos (Marcucci et al., 2001).

Su recolección responde a un patrón de forrajeo, donde las abejas pecoreadoras extraen las resinas y demás componentes de las yemas de las plantas valiéndose de sus mandíbulas y de un primer par de patas, durante este proceso la secreción del ácido 10-hidroxidecenoico por las glándulas mandibulares permite el ablandamiento y trituración del propóleo para facilitar su transporte en los cestillos de polen de las patas traseras. Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, dejando que las abejas propolizadoras, tomen algunas partículas de la sustancia, para comprimirla, agregarle cera y proceder al propolizado (Farré et al., 2004).

Al propóleo se le considera una de las medicinas más antiguas, la cual es conocida y usada en tratamientos hasta el día de hoy, ya que se le confieren diferentes

propiedades como son: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, anticancerígena, antiinflamatoria (Armutcu et al., 2015) antitumoral, anestésica, antioxidante, (Bankova et al., 2000).

Hoy en día el propóleo es un remedio no oficial en los preparados farmacéuticos que no posee lineamientos de calidad y se apoya únicamente en la experiencia. Sus propiedades ya eran conocidas por los egipcios, los griegos y los romanos (Ghisalberti, 1979).

Composición química del propóleo

Su composición química es muy compleja y depende en gran medida de la flora correspondiente a las zonas donde es recolectado. Más de 300 compuestos han sido identificados en muestras de propóleo crudo de diferentes orígenes (Salatino et al., 2005), incluyendo polifenoles, terpenos, esteroides, azúcares y aminoácidos (Kumazawa et al., 2004, Kalogeropoulos et al., 2009).

La composición básica del propóleo consta de 50% a 70% de resinas y bálsamos (formada principalmente por compuestos polifenólicos), 30 % de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de otros constituyentes como ácidos grasos, minerales, vitamina A y algunas del complejo B (Burdock, 1998; Ataç et al., 2005).

La localización geográfica y la flora presente determina la composición del propóleo, por ejemplo, el propóleo de Europa predominantemente contiene flavonoides y ésteres de ácido fenólico (Popova et al., 2001).

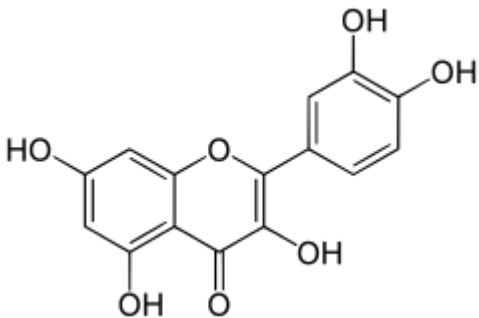
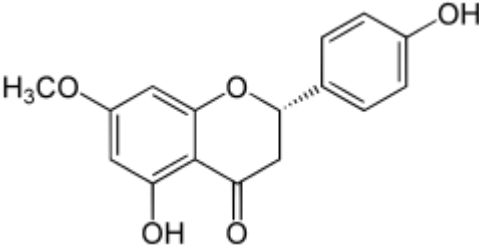
El propóleo al ser uno de los materiales más heterogéneos de la naturaleza además de contener flavonoides contiene ácidos fenol-carboxílicos modificados bioactivos en contra de patógenos humanos, además estos compuestos también tienen actividad antiulcerosa, antiinflamatoria y antitumoral. En la estructura del propóleo

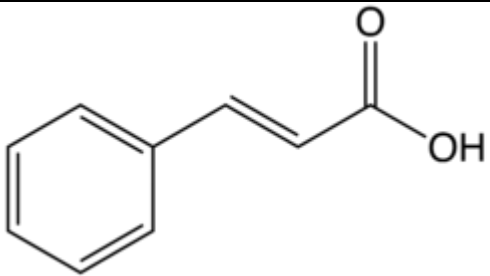
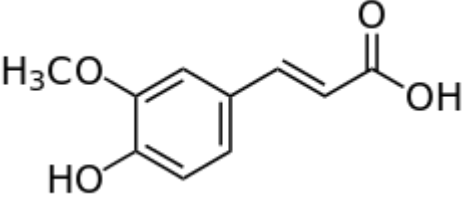
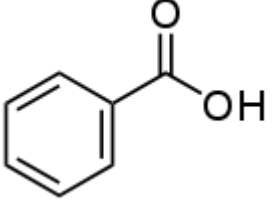
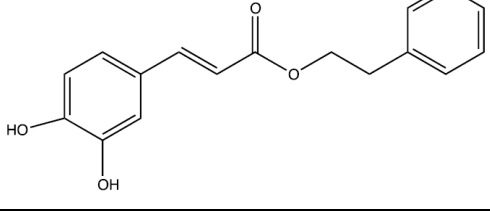
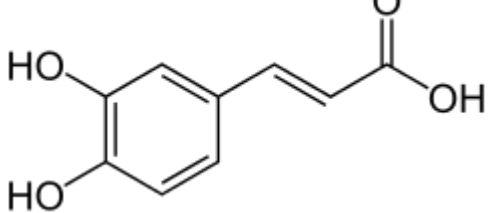
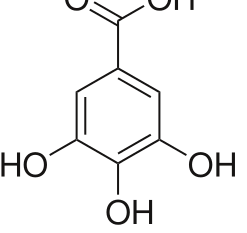
de diferentes regiones del planeta se han caracterizado más de 4000 tipos de flavonoides con actividades biológicas (Adelmann, 2005).

Los flavonoides (flavonas, flavonoles y flavanonas) son el grupo de compuestos mayoritariamente aislados del propóleo. Son químicamente clasificados de acuerdo a la presencia o no del anillo C, la doble ligadura entre los carbonos C-2 y C-3 en el anillo y de un grupo hidroxilo en C-3.

En el Cuadro 2 se muestran las estructuras de algunos de los flavonoides y compuestos con importancia terapéutica aislados a la fecha a partir de muestras de propóleos de diferentes orígenes.

Cuadro 2. Principales componentes aislados en el propóleo

Nombre del Compuesto	Estructura	Procedencia	Referencia
Quercetina		Corea	Yang et al., 2015.
Sakuranetina		Corea	Yang et al., 2015.
	ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÉSTERES		

Ácido Cinámico		China	Yang et al., 2015.
Ácido ferúlico		China Corea Chile	Yang et al., 2015.
Ácido Benzoico		Turquía	Koru et al., 2007
CAPE (Feniletíl éster del ácido caféico).		China Chile	Yang et al., 2015. Castro et al., 2002.
Ácido caféico		Chile	Koru et al., 2007
Ácido gálico		Canadá Australia	Cottica et al., 2015.

ANTECEDENTES

Autor	Título del trabajo	Resultados	Año
Zulma Moreno et al.	Efecto antimicrobiano in vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	Evaluaron la actividad antimicrobiana de cuatro extractos de propóleos argentinos, cinco colombianos y uno cubano frente a <i>Streptococcus mutans</i> . En donde muestran que los propóleos colombianos tuvieron una mayor actividad.	2007
Antonio J. Manrique	Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional,	Colectaron muestras de propóleos provenientes de dos apiarios del estado Miranda, Venezuela, ubicados en diferentes zonas de vida. En donde todos los extractos estudiados mostraron actividad antimicrobiana.	2006
Kujumgiev et al.	Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.	Estudiaron muestras de propóleo de diferentes orígenes geográficos, los evaluaron frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> , antifúngicos (<i>Candida albicans</i>) y antivirales contra la gripe aviar. Todas las muestras fueron activas contra el hongo y cepas de bacterias Gram-positivas.	1999
Quintero et al.	Efecto de extractos de propóleos mexicanos de <i>Apis mellifera</i> sobre el crecimiento in vitro de <i>Candida albicans</i>	Evaluaron la actividad antifúngica de cuatro extractos etanólicos de propóleos de tres diferentes estados de la República Mexicana y de cuatro extractos comerciales sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> .	2008
Tolosa, L., Cañizares, E.	Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche	Evaluaron la actividad antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i> . En donde la cepa bacteriana más sensible fue <i>P.aeruginosa</i> y <i>S. typhi</i> la más resistente.	2002
Rivera Yañez N.	Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes Estados de la República Mexicana	Evalúo las propiedades biológicas así como la composición química del propóleo, y también evaluó cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica.	2013

JUSTIFICACIÓN

Con el paso de los años y con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, decayó el uso de la apiterapia y del propóleo, pero es a partir de los últimos veinte años que los científicos se han dedicado a estudiarlo y han demostrado las propiedades y actividades del mismo, coincidiendo con lo que pensaban y obtenían como resultados nuestros antepasados (Farré et al., 2004). Adicionalmente, algunas investigaciones han sido dirigidas hacia el estudio de la actividad antioxidante (Wang et al., 2004; Ahn et al., 2004; Trusheva et al., 2006) obteniéndose resultados altamente prometedores.

Es por este motivo que en el presente estudio se pretende ampliar el conocimiento sobre este producto natural, a partir de su extracto metanólico, al determinar su actividad antibacteriana frente a algunas cepas de bacterias, ya sean Gram positivas o Gram negativas, su citotoxicidad, su capacidad antioxidante, la cuantificación de sus compuestos fenólicos y flavonoides, además de la caracterización de algunos de sus compuestos químicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la actividad antimicrobiana y establecer el perfil químico del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua.

Objetivos particulares

- ✓ Cuantificar el rendimiento del extracto metanólico del propóleo por diferencia de peso
- ✓ Evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) del extracto metanólico del propóleo mediante el método de difusión en agar y método de inhibición del crecimiento radial.
- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de las cepas sensibles al extracto metanólico del propóleo mediante el método de difusión en caldo
- ✓ Determinar la actividad bacteriostática o bactericida con una cinética de crecimiento
- ✓ Determinar la concentración fungicida media (CF50) (inhibición del crecimiento radial)
- ✓ Determinar la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del radical DPPH
- ✓ Cuantificar la cantidad de fenoles totales a partir del método de Folin-Ciocalteu
- ✓ Cuantificar la cantidad de flavonoides mediante el método de Dowd
- ✓ Evaluar toxicidad general del propóleo (Ensayo de toxicidad general sobre Artemia salina)
- ✓ Determinar la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM), HPLC y HPLC-EM

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta del material (APÉNDICE 1)

La colecta del material de estudio (propóleo), se realizó a finales del 2014 en el apiario ubicado en el Ejido de Concordia en el Estado de Chihuahua. Las características organolépticas del propóleo se determinaron con base al cuadro 3 (Vargas et al., 2013).

Cuadro 3. Características organolépticas para el propóleo

CARACTERISTICAS					
COLOR	Amarillo	Pardo	Marrón	Rojizo	Variado
AROMA	Resinoso	Balsámico			
SABOR	Variable	Suave	Balsámico	Picante	
CONSISTENCIA	Maleable	Rígido			

Obtención del extracto metanólico (APÉNDICE 2)

El extracto metanólico se llevó a cabo por el método de maceración (Domínguez, 1973). El material colectado se limpió y fue pesado y colocado en un matraz (Figura 1), para posteriormente obtener el extracto metanólico crudo, el cual se filtró y fue destilado a presión reducida en un rotavapor (Figura 2). El rendimiento del extracto se determinó con relación al peso seco del propóleo (Figura 3).



FIGURA 1. Maceración del Propóleo



FIGURA 2. Destilación del extracto metanólico crudo, en el rotavapor



FIGURA 3. Extracto metanólico del propóleo

Actividad antibacteriana

Evaluación cualitativa

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer, en el cual los discos fueron impregnados con 10mg del extracto a probar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25µg de cloranfenicol; como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10 µL del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (APÉNDICE 3).

Evaluación cuantitativa

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) así como la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó la microtécnica de dilución en caldo, con concentraciones de 100, 80, 50, 12.5 y 6.25 mg/mL del extracto metanólico. Las cajas se inocularon con 50µL de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL y se incubaron durante 24 horas (Koneman et al., 1996) (APÉNDICE 4).

Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano

El efecto bactericida o bacteriostático de los extractos se identificó sobre una curva de crecimiento bacteriano. Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa (aquellas que presentaron los valores menores en las pruebas cuantitativas, es decir una mayor sensibilidad al extracto). Se monitoreó su crecimiento en nueve tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes

concentraciones del extracto (1/2 CMI, CMI y CBM) y un grupo testigo (Muroi et al., 1993) (APÉNDICE 5).

Cuadro 4. Cepas bacterianas utilizadas

Tipo	Cepa	ATCC, clasificación o donadas
Gram positivas	<i>Streptococcus mutans</i>	CDBB-B-1455
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12398
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Staphylococcus aureus</i>	33592
	<i>Staphylococcus aureus</i>	85S
Gram negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDBB-B-999
	<i>Escherichia coli</i>	FES Iztacala (caso clínico 1)
	<i>Escherichia coli</i>	FES Iztacala (caso clínico 2)

*el nombre de las cepas y su número según la American Type Culture Collection (ATCC), clasificación o por quien fueron donadas.

Actividad antifúngica

Hongos levaduriformes

Evaluación cualitativa

Se realizó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (APÉNDICE 3). Los discos se impregnaron con 2000 µg del extracto metanólico. Para el control positivo se utilizaron discos impregnados con Nistatina (25 µg por cada disco) y para el control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10 µL de metanol. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

Cuadro 5. Cepas de hongos levaduriformes utilizadas

Cepa	*ATCC, clasificación o donadas por:
<i>Candida albicans</i>	Laboratorio de Análisis clínicos FES Iztacala
<i>Candida glabrata</i>	CDBB-L-1003 Cepario del CINVESTAV

*El nombre de las cepas y su número según la American Type Culture Collection (ATCC), su clasificación o por quien fueron donadas.

Hongos filamentosos

Evaluación cualitativa

Se realizó mediante la técnica de inhibición del crecimiento radial (APÉNDICE 6) usando una concentración de 2000 µg por disco del extracto metanólico y como control positivo Ketoconazol (7 µg) y como control negativo se utilizaron discos impregnados con 10 µL de metanol (Wang y Bun, 2002).

Cuadro 6. Cepas de hongos filamentosos utilizadas

Cepa	*ATCC, clasificación o donadas por:
<i>Fusarium moniliforme</i>	CDBB-H-265 Cepario CINVESTAV
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CDBB-H-1112 Cepario CINVESTAV
<i>Aspergillus niger</i>	CDBB-H-179 Cepario CINVESTAV

*El nombre de las cepas y su número según la American Type Culture Collection (ATCC), su clasificación o por quien fueron donadas.

Evaluación cuantitativa

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF_{50}) y la concentración fungicida mínima (CFM), se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun, (2002). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron 0.5, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 mg/mL., cada bioensayo se realizó por triplicado (APÉNDICE 6).

Actividad antioxidante del extracto

Se determinó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se cuantificó la Concentración Antioxidante media (CA_{50}), utilizando las siguientes concentraciones: 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 μ g/mL. Como control positivo se utilizó catequina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como blanco se utilizaron pozos con 200 μ L de MeOH grado HPLC (Okusa et al., 2007) (APÉNDICE 7).

Fenoles totales

La concentración de fenoles totales (CFT) se cuantificó por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redox por el método modificado de Singleton et al., 1999. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico en una solución estándar de 2.0 mg/mL. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener concentraciones seriadas de ácido gálico (APÉNDICE 8).

Flavonoides

El contenido total de flavonoides presentes en el extracto se determinó utilizando el método de Dowd modificado de Praveen y Awang, 2007. Donde 1 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2 % en metanol se mezclaron con el mismo volumen del extracto en solución (2 mg/mL). Las lecturas de absorbancia a 415 nm se tomaron después de 10 minutos de reacción, contra un blanco que consiste en 1 mL de la solución del extracto con 1 mL de metanol sin AlCl_3 . El contenido total de flavonoides se determinó utilizando una curva de calibración con quercetina en una solución estándar de 1mg/mL (1-100 ppm) (APÉNDICE 9).

Toxicidad general

La toxicidad general se evaluó en el propóleo. Los ensayos se realizaron con larvas nauplio II de *Artemia* salina, siguiendo el método de McLaughlin (1991), a concentraciones de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. (APÉNDICE 10)

Caracterización química del extracto

Se realizó una caracterización química por medio de un análisis con una cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC y HPLC-EM), así como una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) (APÉNDICE 11, 12 Y 13).

Análisis estadístico

Para los datos obtenidos de las pruebas cualitativas bacterianas, fueron calculados por cepa y concentración, las siguientes medidas descriptivas: (media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo). Así mismo se obtuvieron los diagramas de caja.

Para determinar si existieron o no diferencias significativas entre las diferentes cepas y concentraciones, se realizó un análisis de varianza factorial, en el cual los factores considerados fueron: concentración y cepa.

Todo el análisis realizado fue hecho con el paquete de cómputo estadístico Minitab versión 16.

RESULTADOS

Características organolépticas

De forma cualitativa se observó que el propóleo de Chihuahua presentó las siguientes características (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características organolépticas del propóleo de Chihuahua obtenido del apiario del Ejido de Concordia.

Características	
Color	Pardo
Aroma	Resinoso
Sabor	Balsámico
Consistencia	Rígido

Rendimiento del propóleo

Se colectaron y pesaron 565.4 g de propóleo (peso seco), de lo cual se obtuvo 373.55 g de extracto metanólico (rendimiento 66.18%).

Actividad antibacteriana

Evaluación cualitativa

Como se puede observar en el cuadro 8, el propóleo mostró mayor actividad en las cepas Gram positivas con concentraciones de 5mg. La bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 presentó mayor diámetro de los halos de inhibición en las concentraciones de 2mg y 5mg. En cuanto *Escherichia coli*, Caso clínico 2, presentó

el menor diámetro de los halos de inhibición en la concentración de 2mg y *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 en la concentración de 5mg.

Cuadro 8. Halos de inhibición en las bacterias frente a las concentraciones del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua.

CEPA	[2mg]	[5mg]
<i>Escherichia coli.</i> <i>Caso clínico 2</i>	7.400 ± 0.548	10.400 ± 0.548
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.400 ± 0.894	11.400 ± 0.548
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	9.00 ± 1.871	8.400 ± 0.548
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.400 ± 0.894	17.20 ± 2.59
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	9.600 ± 1.140	12.000 ± 1.581
<i>Streptococcus mutans</i>	11.200 ± 1.304	11.600 ± 2.074
<i>Staphylococcus aureus</i> 85S	9.200 ± 1.095	10.000 ± 1.414

Longitud promedio en mm de diámetro de los halos de inhibición ± la desviación estándar.

La figura 4. Muestra el comportamiento de las diferentes cepas de bacterias frente al extracto del propóleo, cabe destacar que para *S.aureus* ATCC 12398, *S. aureus* ATCC 25923 y *S.mutans* los halos de inhibición tuvieron una gran variabilidad, en contraparte, *E. coli* Caso clínico 2 y *P. aeruginosa* presentaron una menor variación en sus halos de inhibición.

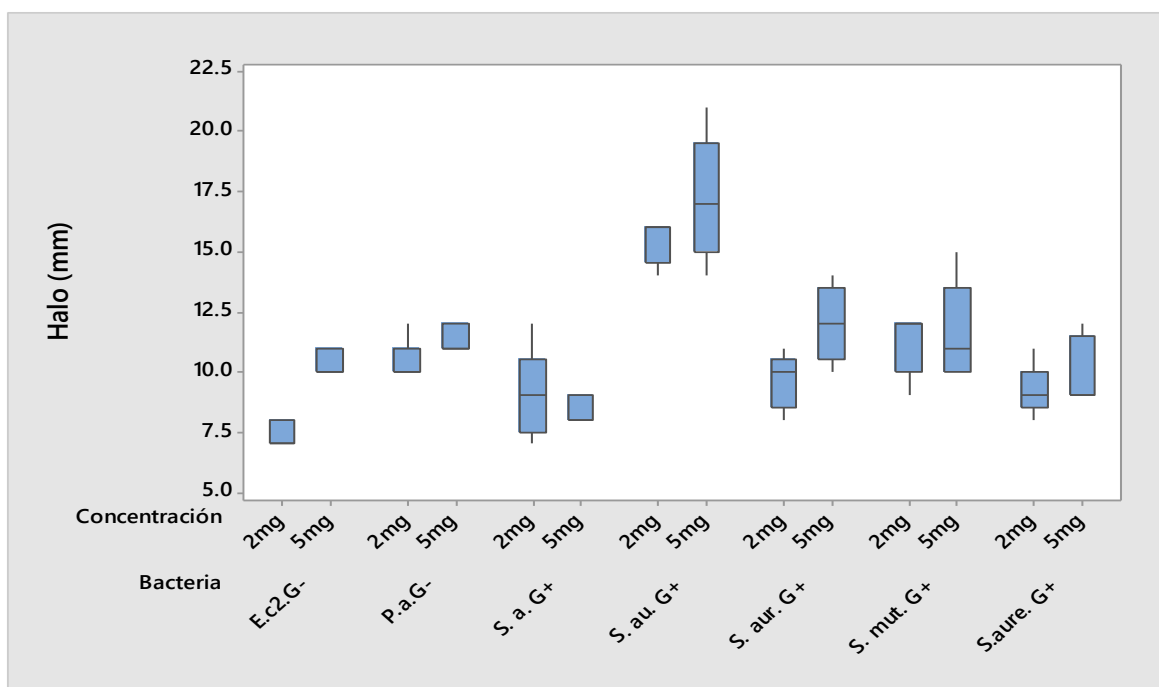


Figura 4. Sensibilidad de cada cepa bacteriana frente al propóleo de Chihuahua.

Evaluación cuantitativa

Al comprobar que las cepas fueron sensibles al efecto del extracto se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto de propóleo, los resultados indicaron las concentraciones a las cuales el extracto provocó un efecto inhibitorio, el cual refiere una mortalidad de la mayor parte de la población bacteriana, haciendo evidente una mayor sensibilidad en las cepas pertenecientes a las bacterias Gram positivas, tal como se observa en el cuadro 9.

Cuadro 9. CMI y CBM del extracto metanólico de propóleo para las cepas bacterianas.

NOMBRE DE LA BACTERIA	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Streptococcus mutans</i> CDBB-B-1455	0.625	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	5.0	20.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10.0	20.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	1.25	5.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.25	10.0
<i>Escherichia coli</i>. Caso clínico 2	20.0	20.0

CMI= Concentración Mínima Inhibitoria; CBM= Concentración Bactericida Mínima

Como se puede observar, con respecto a las bacterias Gram positivas, como lo son *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 y ATCC 25923, ambas mostraron una CBM de 20mg/mL respectivamente, mientras que *Streptococcus mutans* CDBB-B-1455 fue la más baja. En el caso de las bacterias Gram negativas se observó que *Escherichia coli* (caso clínico 2) tuvo un CMI y CBM de 20 mg/mL.

Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano

De la actividad del propóleo sobre la curva de crecimiento bacteriano se determinó si había y el tiempo de un descenso drástico de las poblaciones bacterianas.

Las cepas bacterianas tipo Gram positiva y negativa que se eligieron fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 y *Pseudomona aeruginosa* CDBB-B-999, por lo tanto se estudió la actividad del extracto metanólico del propóleo sobre la curva

de crecimiento bacteriano, mediante lo cual se pudo observar un comportamiento bactericida en ambas cepas.

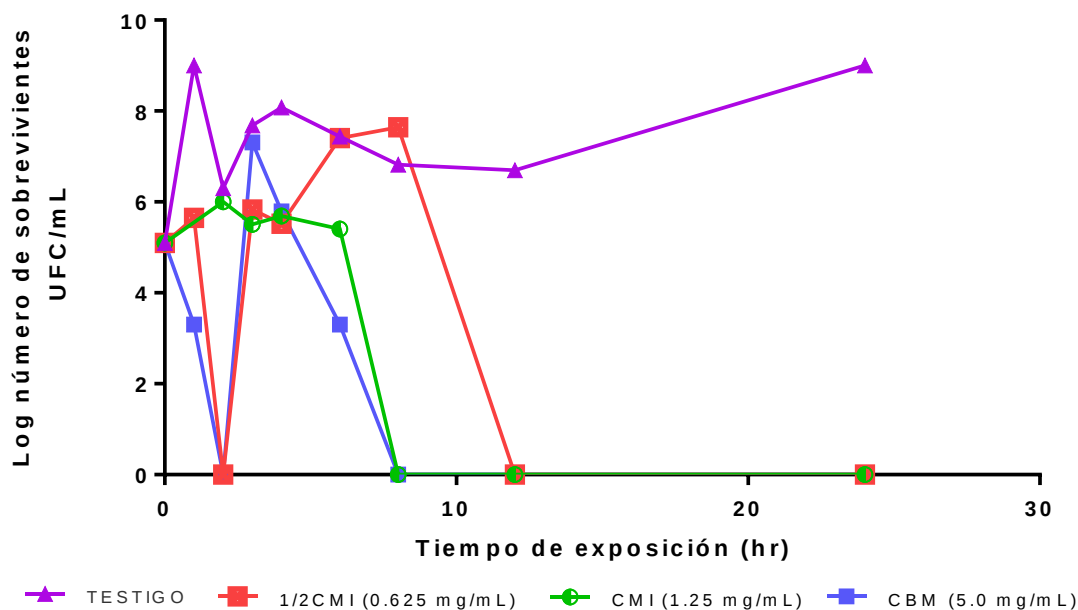


Figura 5. Actividad del extracto metanólico del Propóleo sobre la curva de crecimiento de *S.aureus* ATCC 33592

El extracto del propóleo muestra una actividad bactericida sobre *Staphylococcus aureus* a partir de los tres primeros tiempos CBM, sin embargo aumenta en el cuarto tiempo y vuelve a descender la población en los siguientes tiempos, en CMI se mantiene la población durante los cinco primeros tiempos y en los siguientes tres tiempos la población descende, en $\frac{1}{2}$ CMI la población sobre pasa al testigo en el sexto tiempo, sin embargo la población descende al tiempo séptimo y octavo. Es muy importante mencionar que aunque las poblaciones en determinados tiempos aumentan, hubo una modificación de su morfología de las colonias pues en los últimos tiempos las colonias, eran cada vez de menor tamaño.

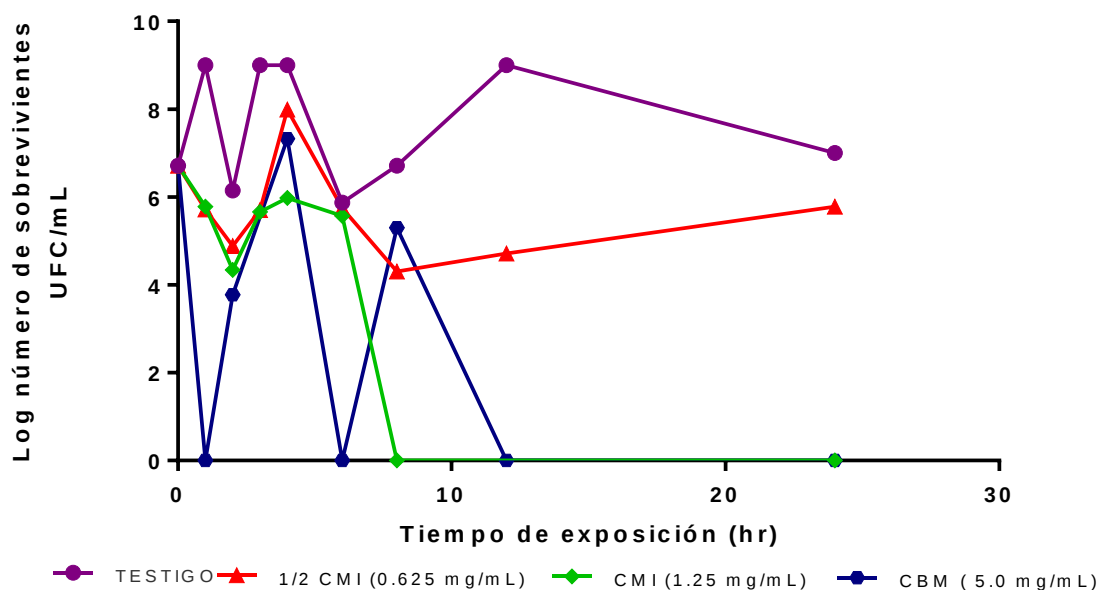


Figura 6. Actividad del extracto metanólico del Propóleo sobre la curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la figura 6, se puede observar que el comportamiento de *P. aeruginosa* tiene un efecto bactericida en la CMI y CBM a partir del primer tiempo, aunque posteriormente en un tiempo las UFC tienen un incremento y en el siguiente las UFC vuelven a descender y así durante los últimos tiempos, mientras que el comportamiento en la 1/2 CMI tuvo un efecto bacteriostático, ya que durante los tres primeros tiempos las UFC descendieron pero después del tiempo seis las UFC se mantuvieron y hubo un incremento de estas, cabe destacar que fue por debajo del testigo.

Actividad antifúngica

Evaluación cualitativa

En el caso de los hongos levaduriformes en ninguna cepa se observó actividad antifúngica del extracto metanólico del propóleo, no obstante de que en los hongos filamentosos, en todas las cepas se observó actividad sobre las mismas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Actividad del propóleo sobre hongos filamentosos

Hongos	Extracto
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265	**
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	*
<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H-179	**

** mayor inhibición del crecimiento radial

* menor inhibición del crecimiento radial

Evaluación cuantitativa

La concentración del propóleo que inhibió el crecimiento de los hongos fue determinada con el ensayo cuantitativo:

En los siguientes cuadros se muestran las CF_{50} y el porcentaje de inhibición del propóleo sobre el crecimiento de los diferentes hongos filamentosos.

***Fusarium moniliforme* CBB-H-265**

Las concentraciones del extracto y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se puede observar en el cuadro 11, en donde se alcanza la CF_{50} , es decir el 50% a partir de 0.5 mg/mL y el máximo porcentaje de inhibición fue de 95.55%. En la figura 7 se observa el comportamiento del hongo frente al extracto en donde queda de manifiesto una tendencia logarítmica en la inhibición del crecimiento radial.

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Fusarium moniliforme*

Concentración mg/mL	% de inhibición
0.5	53.33
1	66.66
2	73.33
4	93.33
6	93.33
8	95.55

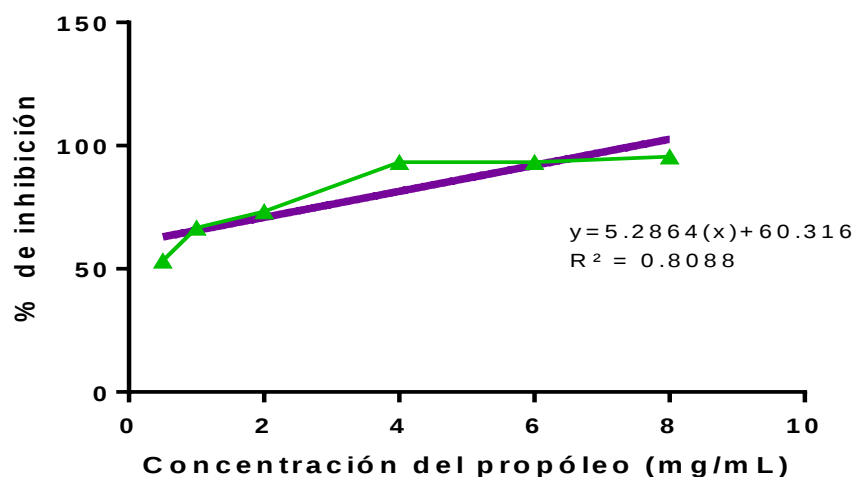


Figura 7. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium moniliforme*

***Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112**

El porcentaje de inhibición para cada concentración evaluada se muestra en el cuadro 12, en donde se observa que a partir de una concentración de 0.5 mg/mL se alcanza una inhibición de más del 50% y la máxima de inhibición (100%) se alcanzó con la concentración de 8.0 mg/mL. En la figura 8 se muestra el comportamiento logarítmico de la inhibición del crecimiento radial del hongo frente al extracto.

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Trichophyton mentagrophytes*

Concentración mg/ML	% de inhibición
0.5	68.88
1	86.66
2	86.66
4	93.33
6	93.33
8	100

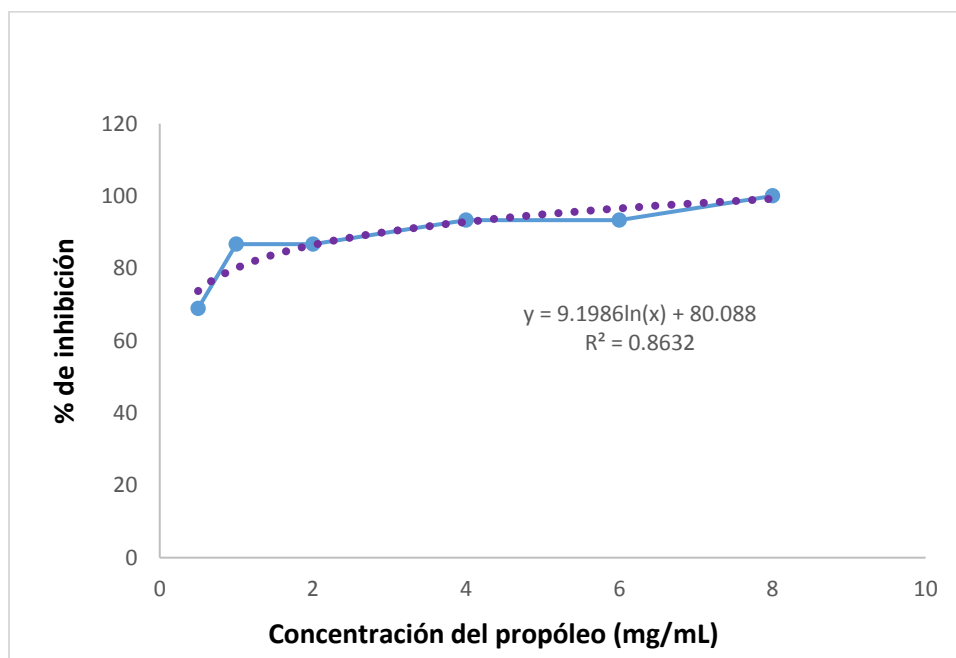


Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de *Trichophyton mentagrophytes*

***Aspergillus niger* CDBB-H-179**

De las concentraciones evaluadas cuadro 13, aplicando el modelo obtenido a partir de los datos experimentales se obtuvo el 50% de la inhibición a una concentración de 4.06 mg/mL y la máxima inhibición es del 66.66% con una concentración de 8 mg/mL. En la figura 9 se muestra el comportamiento de la cepa frente al extracto, en la cual se observa un comportamiento lineal en la inhibición del crecimiento radial.

Cuadro 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Aspergillus niger*.

Concentración mg/mL	% de inhibición
0.5	31.11
1	35.55
2	40
4	55.55
6	57.77
8	66.66
CF ₅₀ 4.06	50

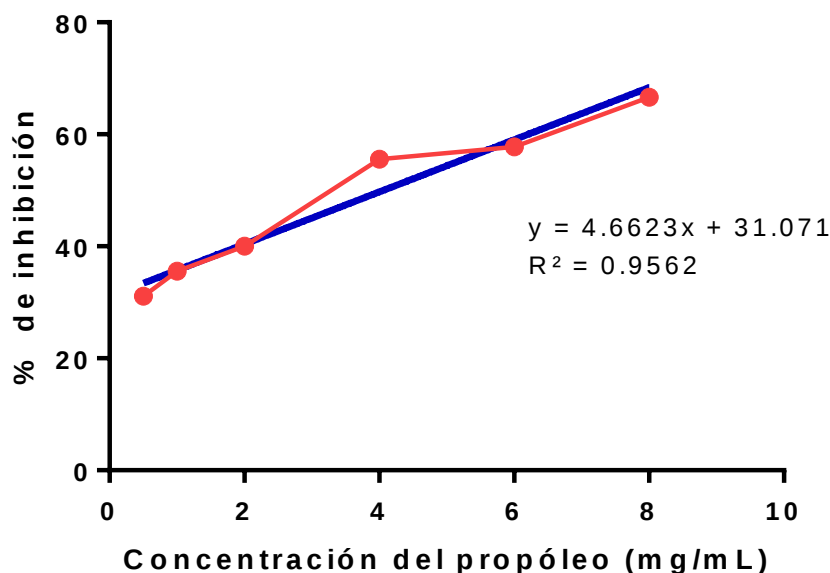


Figura 9. Inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus niger*.

Actividad antioxidante del extracto

Dadas las propiedades biológicas mostradas, es sabido que algunas de ellas están relacionadas con los compuestos antioxidantes presentes en el propóleo.

El extracto metanólico del propóleo presentó una capacidad antioxidante media (CA_{50}) de 412 $\mu\text{g/mL}$ obtenida a partir de la reducción en un 50% del radical DPPH (figura 10).

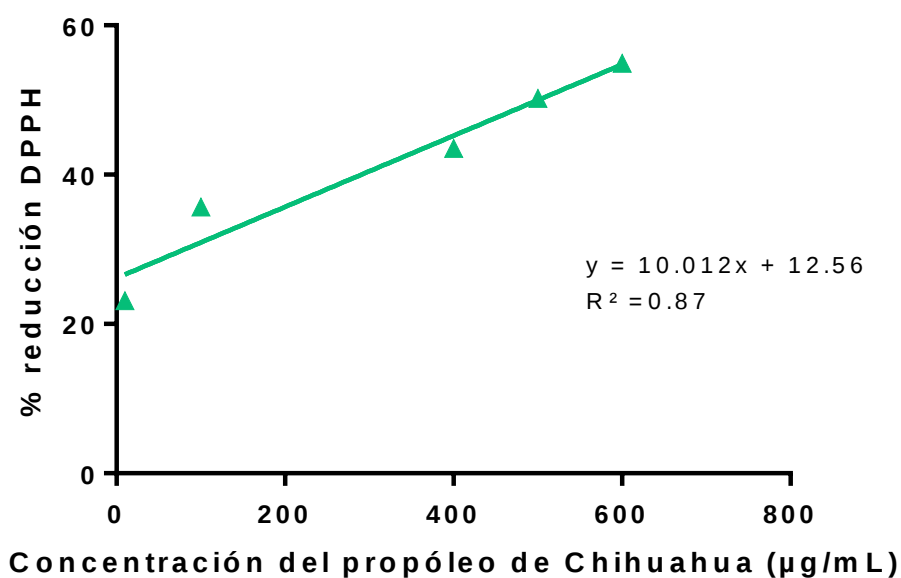


Figura 10. Reducción del radical DPPH por el extracto metanólico del propóleo

Cuantificación de Fenoles totales

Los compuestos fenólicos están correlacionados en parte con la capacidad antioxidante mostrada, por lo cual se evaluó su contenido presente en el extracto metanólico del propóleo, obteniendo una concentración de 258 mg e AG/g (Figura 11).

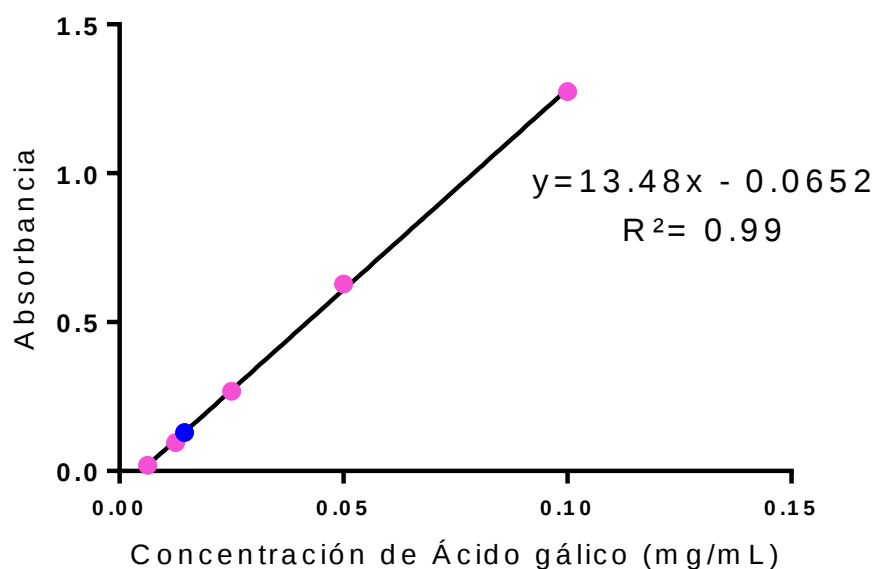


Figura 11. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales. El estándar empleado fue ácido gálico.

Cuantificación de flavonoides totales

El extracto metanólico del propóleo de Chihuahua presentó flavonoides, el cual es un grupo perteneciente a los fenoles, con una estructura que le permite tener un

poder antioxidante, para atrapar especies reactivas de oxígeno. Como se muestra en la figura 12, contiene 135.412 mg de equivalentes de quercetina/g de extracto, lo que equivale al 13.54% del extracto metanólico del Propóleo de chihuahua.

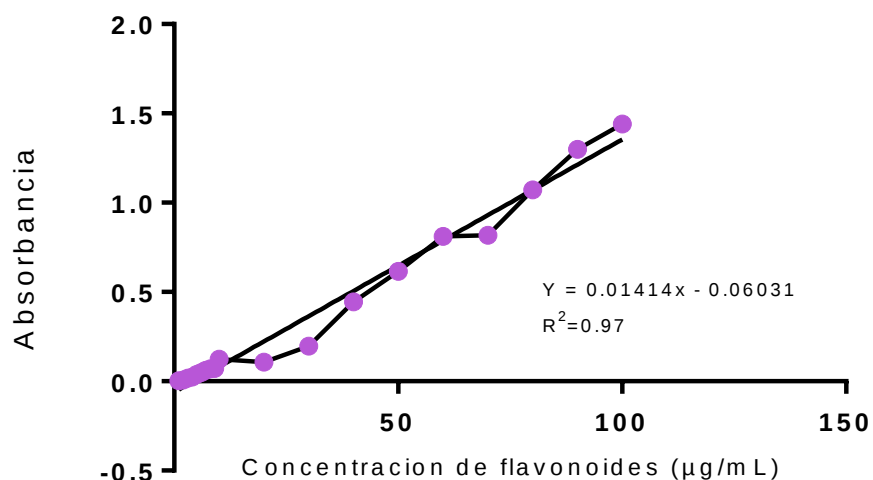


Figura 12. Curva patrón para el cálculo de flavonoides totales

Toxicidad

El resultado sobre la concentración letal media (CL_{50}) del extracto metanólico del propóleo sobre las larvas nauplio de *Artemia* salina se muestra en el cuadro 14 y en la figura 13. En la que se observa que el propóleo presenta una toxicidad moderada de acuerdo al criterio de McLaughlin (1991), el cual considera una toxicidad débil cuando la CL_{50} está entre 1000 y 500 ppm, moderada cuando la CL_{50} está entre 100 y 500 ppm y fuerte cuando la CL_{50} se extiende a partir de la 0 a 100 ppm.

Cuadro 14. Concentración letal media del propóleo sobre las larvas nauplio de *Artemia salina*

Extracto	CL ₅₀ µg/mL
Propóleo	305.29
Ácido gálico	69.94

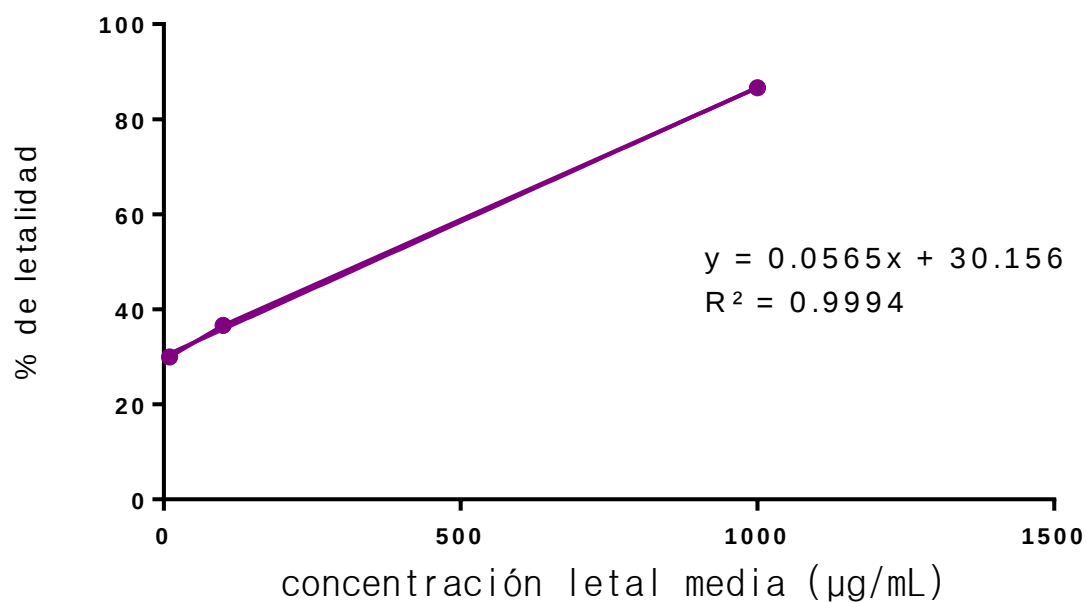


Figura 13. Toxicidad general del extracto metanólico propóleo de Chihuahua.

Caracterización Química

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

De acuerdo a los resultados del cromatograma (figura 14), con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, el extracto presentó los siguientes compuestos que se pueden observar en el (cuadro 15).

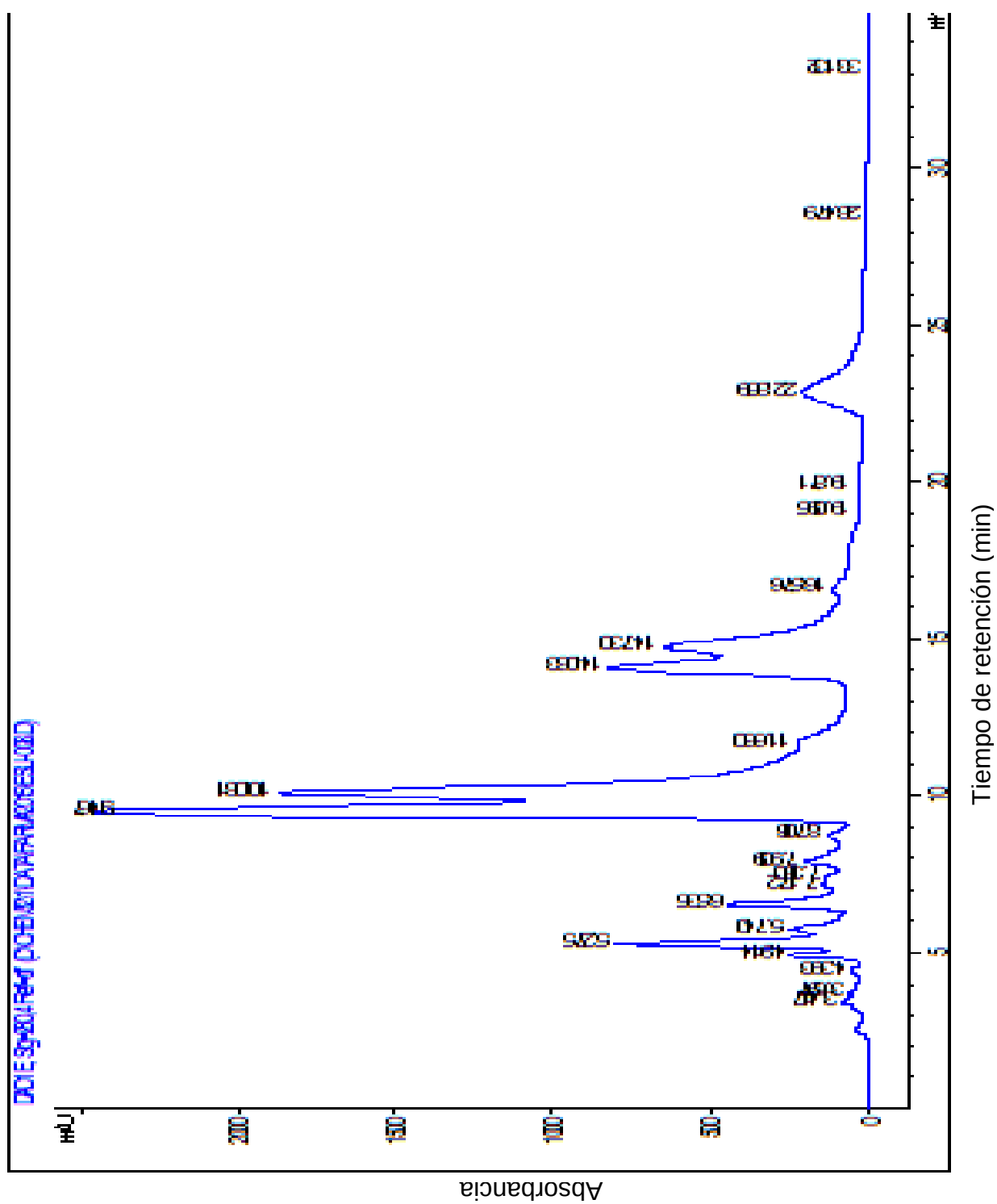
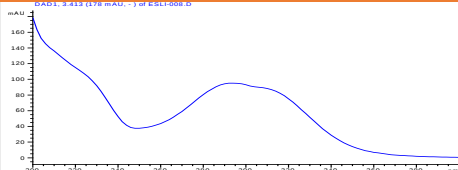
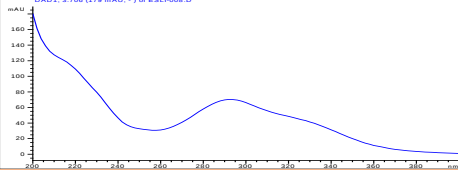
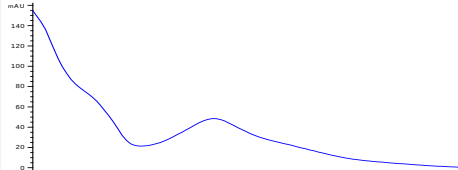
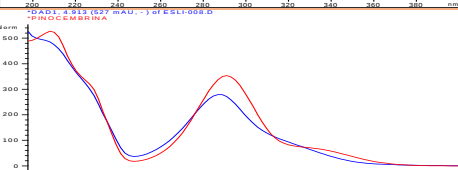
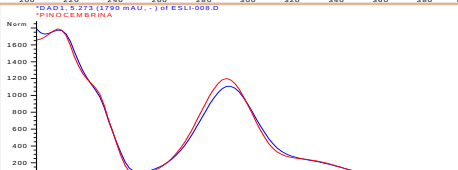
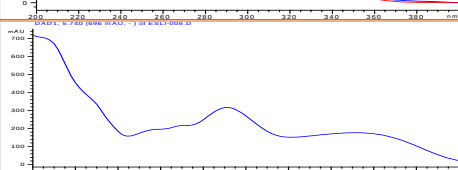
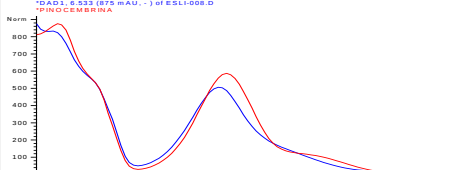
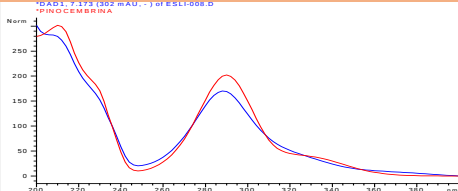
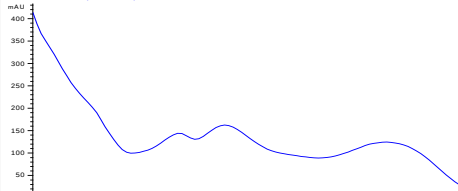
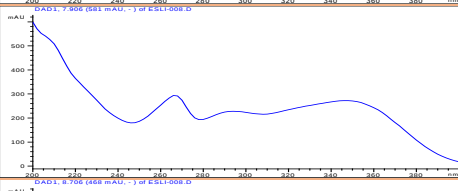
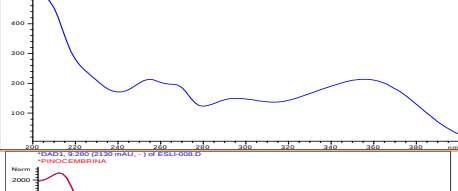
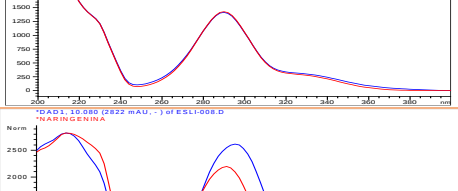
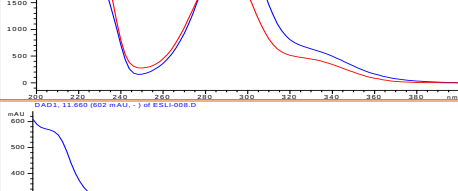
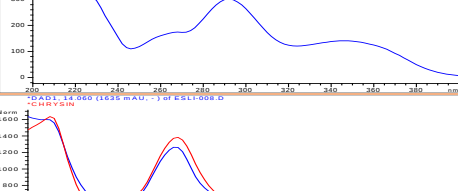
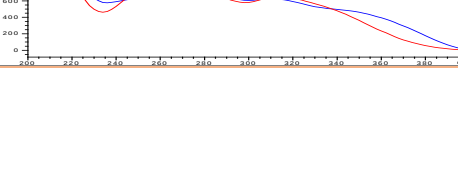
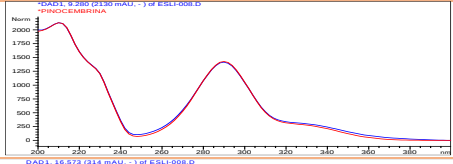
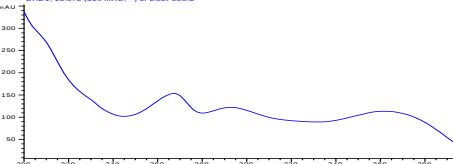
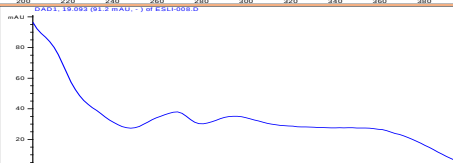
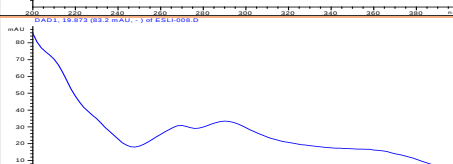
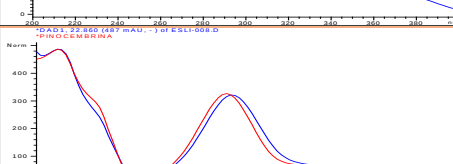
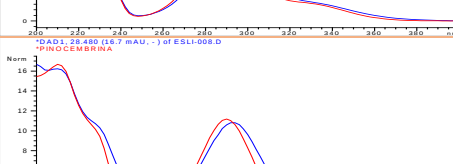
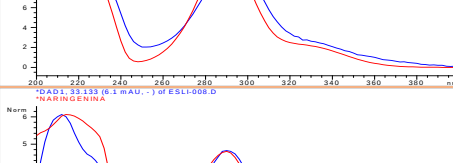


Figura 14. Cromatograma del análisis HPLC del propóleo de Chihuahua

Cuadro 15. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del propóleo de Chihuahua

No.	Espectro de UV	Tiempo de Retención (min)	λ_{max} (nm)	Compuesto
1		3.413	230, 294	Fenol
2		3.706	220, 290	Fenol
3		4.393	232, 284	Fenol
4		4.913	230, 288	Naringenina
5		5.273	212, 230, 292	Flavonoide
6		5.740	208 sh, 290, 356	Flavonol
7		6.533	210, 228, 286	Flavonoide

8		7.173	210, 230, 290	Flavonoide
9		7.380	228, 270, 290, 368	Flavonol
10		7.906	210, 268, 292, 352	Flavonoide
11		8.706	206, 254, 268,294, 356	Flavonol
12		9.466	216, 232, 296, 334	Pinocembrina
13		10.080	216, 230, 294, 334	Flavonoide
14		11.660	210, 232, 262, 290, 350	Flavonoide
15		14.060	210, 268, 312, 348	Crysina

16		14.733	210, 294	Pinocembrina
17		16.573	212, 268, 294, 362	Flavonol
18		19.093	212, 268, 298, 364	Flavonol
19		19.873	210, 268, 290, 360	Flavonol
20		22.860	212, 230, 294	Flavonoide
21		28.480	212, 230, 294	Flavonoide
22		33.133	212, 228, 290	Flavonoide

N.I= no identificado

Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

El propóleo estudiado fue sometido a un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el cromatograma se muestra en la figura 15 y cuadro 16, pudiéndose observar los diferentes componentes volátiles del propóleo.

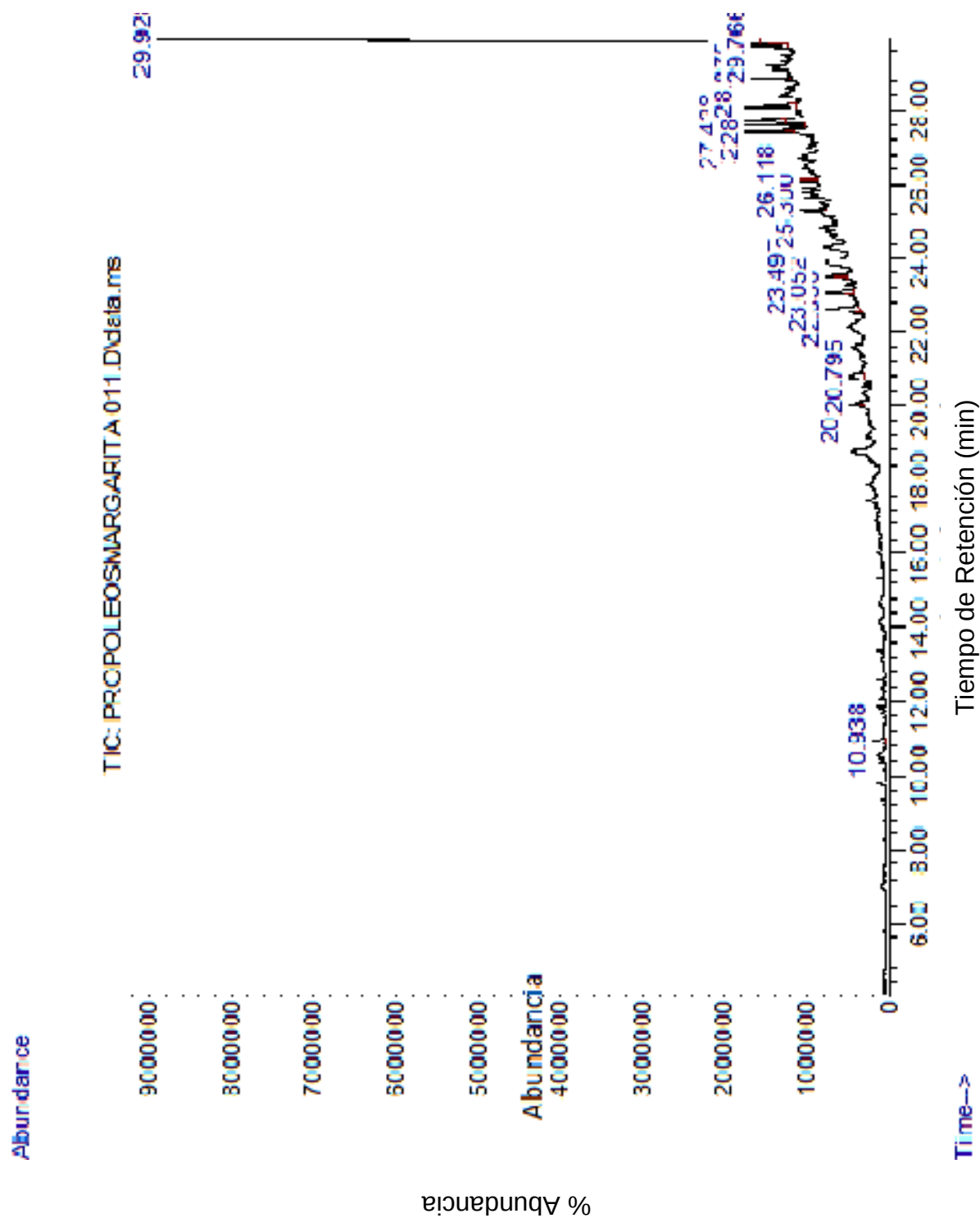
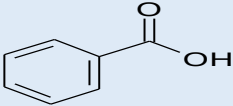
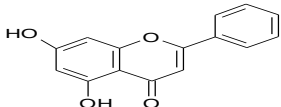
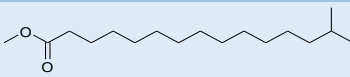
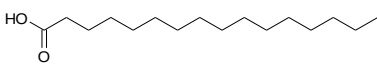
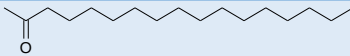
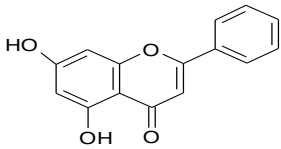
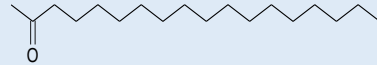
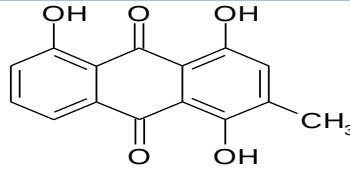
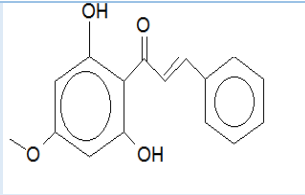
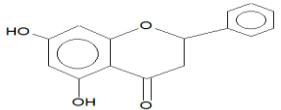


Figura 15. Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua

Cuadro 16. Compuestos volátiles presentes detectados en el propóleo de Chihuahua

No.	TIEMPO DE RETENCION (min)	ABUNDANCIA	COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA
1	10.938	0.651	Ácido benzoico	
2	22.636	2.379	Crisina	
3	23.052	4.654	Metil éster del ácido palmítico	
4	23.497	3.135	Ácido hexadecanoico	
5	25.300	3.772	2-heptadecanona	
6	26.118	0.734	Crisina	
7	27.603	2.493	N – metil - hexadecilcetona	
8	27.715	4.169	1,4,5- trihidroxi-2- metil— antracenodiona	
10	28.875	2.405	2-Propen-1-ona, 1-(2,6-dihidroxi-4-metoxifenil)-3-fenil	
11	29.928	2.519	Pinocembrina	

Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM)

Para el análisis por medio de HPLC-EM fue sometido a esta prueba el extracto metanólico de Propóleo. El cromatograma se muestra en la figura 16. Asimismo, se muestran sus compuestos, tiempo de retención y abundancia (cuadro 17).

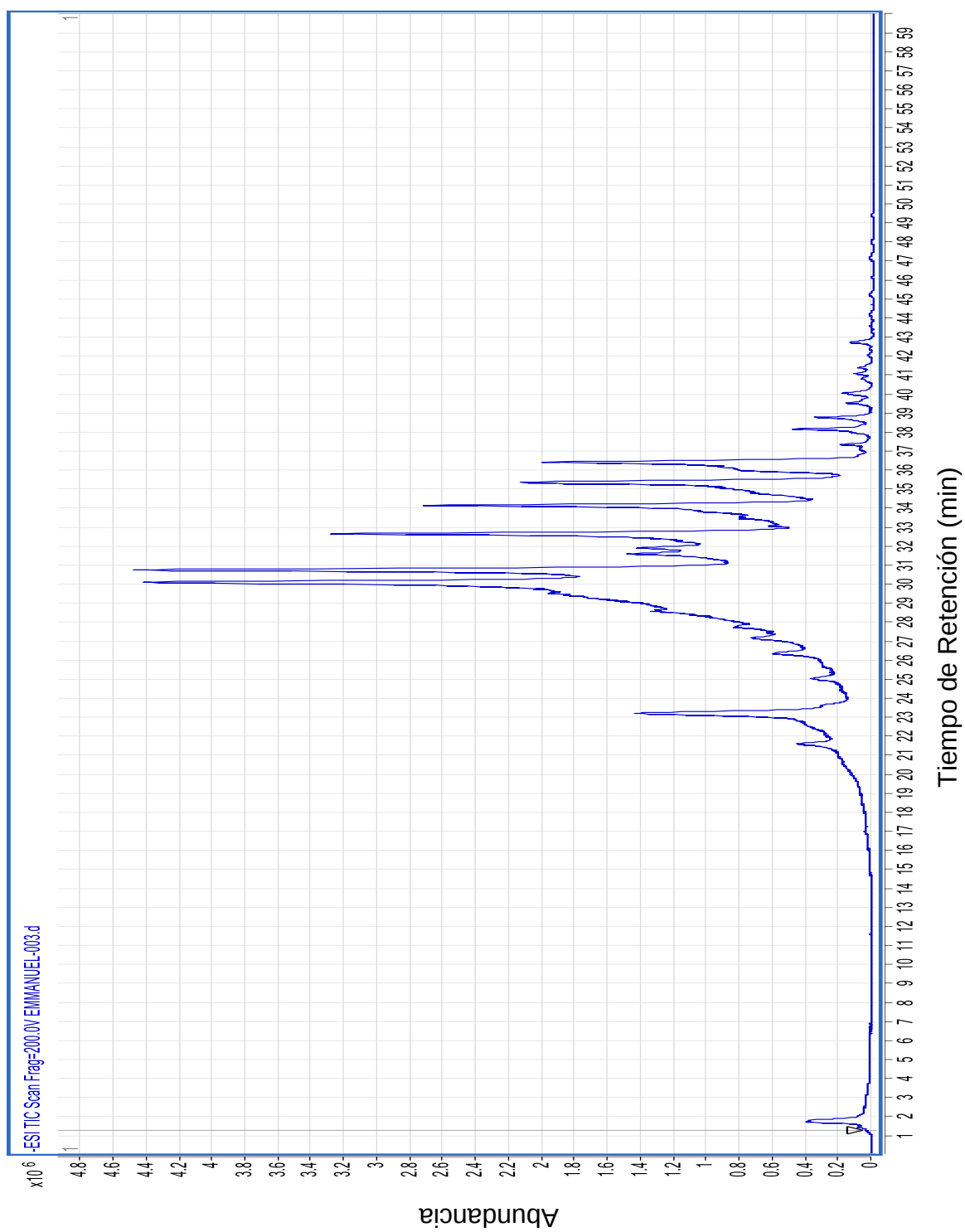


Figura 16. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-EM) del extracto metanólico del propóleo.

Cuadro 17. Compuestos presentes del extracto metanólico del propóleo de Chihuahua detectados en el HPLC-EM

Ion (m/z)	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	% de abundancia
271.0659	Nd	1.773	1.534416015
285.0796	Pinocembrina [M-H] ⁻	21.525	1.237944101
271.0642	Naringenina [M-H] ⁻	23.169	1.534416015
255.0696	Ni	30.057	17.67782354
313.0751	Ni	30.704	16.1315343
253.053	Ni	31.534	6.467825746
269.0481	Ni	31.866	7.291209002
327.0902	Ni	32.597	12.97108374
341.1068	Ni	34.091	11.22347013
355.1217	Ni	35.302	9.918928525
369.1369	Ni	36.348	9.223670031
383.1531	Ni	37.277	0.89511011
397.1692	Ni	38.107	2.525902789
343.2891	Ni	38.722	1.36666596

DISCUSIÓN

El estudio del propóleo durante los últimos años ha tenido una gran importancia, ya que se han encontrado un gran número de propiedades que este contiene, tales como la actividad antibacteriana (Chaillou et al., 2004) antioxidante (Palomino et al., 2009; Bedascarrasbure et al., 2004) antifúngica (Cafarchia et al., 1999; Martínez et al., 2002), entre otras, algunas de estas propiedades han sido relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides (Palomino, 2009).

A pesar de que en México el propóleo es empleado desde hace muchos años como parte de la medicina tradicional y de que existe una gran variedad de productos comerciales, son muy pocos los estudios que se han realizado respecto a su actividad biológica (Quintero et al., 2008).

En el último siglo se ha observado un aumento de las enfermedades producidas por bacterias que se han vuelto resistentes a los antibióticos convencionales empleados para combatirlos, es por esto que se ha optado por buscar antimicrobianos de origen natural. En el propóleo se han encontrado moléculas con actividad antimicrobiana como los metabolitos secundarios que son utilizados como mecanismos de defensa contra patógenos, esto concuerda con lo reportado por autores como Moreno et al. (2007), donde observaron la actividad antibacteriana de propóleos de Colombia, Argentina y Cuba. Además Katircioglu y Mercan (2006), compararon propóleos de diferentes regiones de Turquía sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, observando diferencias en la actividad antibacteriana. Por lo que en este trabajo por primera vez se demuestra la actividad antimicrobiana del extracto metanólico del propóleo del estado de Chihuahua.

El primer paso para aislar los compuestos biológicamente activos de los extractos naturales, es el proceso de extracción, el cual se considera crítico, debido a que en este paso se debe obtener el o los compuestos de interés para su posterior

purificación (Fabricant y Farnsworth, 2001). Además el uso medicinal que se le da al propóleo es el de un extracto etanólico, del que la concentración puede variar dependiendo de la marca del producto. Este extracto etanólico lo utiliza la gente como antiséptico, fue por esto que el metanol (que es más fácil de eliminar por destilación) se seleccionó como solvente para la elaboración del extracto crudo, obteniendo así un rendimiento de 66.18%.

Dado que todas las bacterias que se utilizaron en este estudio son de importancia médica y se sabe que algunas presentan sensibilidad a algunos antibióticos, es de gran relevancia conocer que el extracto metanólico del propóleo tiene actividad sobre estas bacterias, esto se corrobora con los ensayos cualitativos y cuantitativos.

En el ensayo cualitativo sobre las cepas bacterianas, la actividad se observó sobre las 7 cepas en las dos diferentes concentraciones utilizadas (cuadro 8), destacando con mayores halos de inhibición a *S.aureus*. Esto concuerda con lo reportado con Chaillou et al. (2004) y Lotti et al. (2010) quienes estudiaron propóleos argentinos y encontraron que en el 50 % de las muestras los halos de inhibición registrados fueron de más de 12 mm en cepas de *S.aureus*, coagulasa positivo. La acción antimicrobiana que presentan los propóleos puede intervenir en la expansión de la membrana, el incremento de la fluidez y la permeabilidad de la misma, la perturbación de las proteínas embebidas en la membrana, la inhibición de la respiración y la alteración del proceso de transporte de iones en las bacterias Gram positivas y Gram negativas como lo menciona (Carson et al., 2002; Brehm y Johnson, 2003) de la misma manera se le atribuye esta propiedad gracias a la presencia de fenoles y ácidos fenólicos que pueden ocasionar una perturbación en la producción de energía ocasionando la inhibición enzimática por medio de productos oxidativos como lo refiere Mason y Wasserman en 1987, también se ha reportado que algunos flavonoides pueden actuar a nivel de la síntesis de ácidos nucleicos (Cushnie y Lamb, 2005).

Además de lo anterior, fue posible observar una mayor tendencia por inhibir bacterias Gram positivas por parte del propóleo, reduciendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. Esto puede deberse a que las bacterias Gram positivas estructuralmente presentan un peptidoglucano que se encuentra dentro de una matriz compuesta de ácidos tecoicos, teicurónicos y lipoteicos; lo cual confiere a la pared celular una carga negativa neta, necesaria para que la célula asimile cationes divalentes; esta característica la hace más sensible a los compuestos polares a diferencia de las Gram negativas en las que la membrana es más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga et al., 2002; Gros et al., 1985).

El ensayo cualitativo fue corroborado con la determinación de la CMI y CBM. Del propóleo se obtuvieron resultados distintos en cuanto a las concentraciones inhibitorias, así como también a las bacterias sensibles (cuadro 9). El propóleo presentó menor concentración en CMI con valores de 0.625 mg/mL y CBM de 1.25 mg/mL para *Streptococcus mutans* CDBB-B-1455, y presentó valor alto para las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 33592, *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999 y *Escherichia coli* (caso clínico 2), a diferencia de lo reportado por Rivera (2013) en donde menciona que propóleos de Guanajuato y del Estado de México obtuvieron la CMI por de debajo de 0.31 mg/mL, esto demuestra que existe diferencia entre cada uno de los propóleos debido a que provienen de diferentes estados de la República Mexicana.

Según el efecto de su acción sobre las bacterias, los antibióticos se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, y depende de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lizar la bacteria, inhibir una ruta metabólica o actuar sobre una enzima (Cué y Morejón, 1998). También para que sea un buen antibiótico debe actuar a cierta concentración y durante determinado tiempo, para asegurar la muerte o limitar el crecimiento de las bacterias (Pelczar y Chan, 1984).

Para conocer si el propóleo tiene una actividad bactericida o bacteriostática y en qué momento empieza a actuar se realizó la prueba de curva de crecimiento bacteriano. El propóleo tiene actividad bactericida sobre *S.aureus* ATCC- 33592 (Fig. 5) que es un patógeno que causa infecciones de diversa gravedad en niños y adultos además de presentar una frecuencia nosocomial alta, se estima en 28.4 casos por cada 100000 personas de todas las edades (Laupland et al, 2003). Sobre *P. aeruginosa* CDBB-B-999 (Fig. 6) el propóleo tiene actividad bactericida, esta tiene importancia para el hombre, ya que representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados, ya que produce una serie de compuestos tóxicos que causan no solo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Lo mencionado antes es de gran importancia debido a que los antibióticos usados correctamente pueden salvar vidas pero hay un creciente problema de resistencia a los mismos (Daza, 1998).

Con respecto a la actividad antifúngica del extracto metanólico del propóleo, se encontró que fue activo sobre tres cepas de hongos filamentosos (Cuadros 11-13), misma que probablemente esté asociada con la presencia de terpenos, fenoles y ácido fenólico dado que la disrupción de la membrana es uno de los mecanismos de acción de los antifúngicos comerciales (Cuenca–Estrella, 2010). Ejemplo de ello es el ketoconazol, que se utilizó como control positivo para las pruebas contra hongos filamentosos, este es un fármaco antimicótico que actúa a nivel de la membrana citoplasmática (Escobar y Zuluaga, 2004). De los flavonoides presentes en el propóleo, el modelo de acción de la pinocembrina se considera uno de los compuestos responsables del efecto inhibitorio sobre cepas fúngicas. De esta manera, se ha propuesto que las proporciones del ácido cafeico, flavonoides y ésteres fenólicos son los principales responsables de la actividad biológica (Kartal et al., 2003).

De acuerdo con lo obtenido en las pruebas cuantitativas, el extracto metanólico del propóleo tuvo actividad sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112, el cual es un hongo dermatófito causante del pie de atleta, dicho extracto presentó un 68% de inhibición sobre este hongo desde la concentración más baja (0.5 mg/mL), además, es importante mencionar que el extracto no sólo tuvo inhibición en *T.mentagrophytes*, sino que también presentó el 50% de inhibición en *Fusarium moniliforme* CBB-H-265 con una concentración de 0.5 mg/mL, el cual es un hongo que se presenta principalmente en maíz y posee la capacidad de producir toxinas caracterizadas como fumonisinas. La cepa menos sensible fue *Aspergillus niger* CDBB-H-179, puesto que alcanzó la CF50 hasta la concentración más alta (8mg/mL). El propóleo muestra una actividad relevante sobre estos hongos estudiados, esto puede deberse a la presencia de flavonoides y flavononas como la pinocembrina, presente en el extracto de propóleo, que son compuestos con actividad antifúngica (González, 2007; Martins et al., 2002). De la misma manera, autores hacen referencia a la actividad antifúngica de propóleos de Brasil contra *T.mentagrophytes* (Siqueira et al., 2008).

En cuanto a la actividad contra levaduras el extracto metanólico del propóleo no fue activo. Sin embargo, se ha reportado actividad frente a levaduras de propóleos argentinos en donde se presentó una fuerte inhibición contra aislados clínicos de *Candida* (Agüero et al., 2011). Así como también de un propóleo de Guanajuato el cual inhibió cuatro cepas, siendo *C.albicans* 14065 la que presentó los halos de inhibición mayores (Rivera, 2013).

Es sabido que muchas levaduras y en menor medida hongos filamentosos han desarrollado resistencia a fármacos como los azoles, tal es el caso de *Candida* y *Aspergillus sp*, donde alteraciones en sus genes como mutaciones puntuales, sobreexposición del gen, amplificación genética y recombinación mitótica producen una enzima alterada, con un descenso en la afinidad a estos fármacos. De esta forma se han desarrollado cepas resistentes a los fármacos y que muy

probablemente, como lo muestran los resultados de esta investigación, su desarrollo no sea susceptible a ser inhibido por el extracto de propóleo evaluado (Agüero et al., 2011), lo cual podría explicar la inactividad del extracto frente a levaduras.

De tal forma que la mayoría de los fármacos comerciales utilizados contra hongos como la anfotericina B, fluorocitosina, ketoconazol y nistatina, por mencionar algunos, son de amplio espectro, pero de una toxicidad muy alta debido a los efectos secundarios que estos causan (tóxico para los riñones, ampollas, enrojecimiento, picazón o irritación, náuseas, dolor abdominal, temblores, escalofríos, pérdida del apetito), además de que estos pueden favorecer el desarrollo de resistencias sobre las células. En el caso de la nistatina ésta fue utilizada como control positivo contra levaduras, la cual produce efectos tóxicos tan graves que no puede emplearse en infusión parental y sólo se emplea en forma de ungüentos o soluciones en infecciones superficiales (Cuenca-Estrella, 2010), es por ello que resulta de gran importancia la búsqueda de terapias alternativas contra las infecciones fúngicas, así como la ampliación del conocimiento en cuanto a los mecanismos de acción de los antifúngicos y de los mecanismos de resistencia que han desarrollado a éstos.

De acuerdo con la actividad biológica del extracto metanólico del propóleo frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y frente a hongos filamentosos, se procedió a evaluar la actividad antioxidante, en donde se sabe que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos) o carotenoides así como el ácido ascórbico como lo reporta Soto (2007). Éstos protegen a lípidos y otros compuestos celulares del ataque de agentes oxidantes como los radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos (Drago et al., 2006). Lo anterior es de suma importancia ya que las células están expuestas a especies reactivas de oxígeno y son capaces

de tolerar estados de estrés oxidativo leve. Sin embargo, situaciones extremas de estrés oxidativo pueden afectar el metabolismo celular (Soledad, 2007).

El extracto metanólico del propóleo mostró un total de compuestos fenólicos de 258 mg eAG/g y 135.412 μg (eQ)/g de flavonoides, esto es importante pues va relacionado con la capacidad antioxidante donde mostró una CA_{50} media de 412 $\mu\text{g/mL}$, pero si se compara con la quercetina que es un compuesto puro tuvo una CA_{50} de 3.4 $\mu\text{g/mL}$ es importante mencionar que el extracto es una mezcla de varios compuestos que actúan en conjunto. Entre estos compuestos los fenilpropanoides (ácido fenólico, flavonas, flavanonas, etc) juegan un papel determinante en la capacidad antioxidante, debido a su estructura química. (Cruz, 2007).

Para corroborar los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad general del propóleo se utilizó el criterio de McLaughlin et al. (1991), en donde menciona que si una CL_{50} está entre los 1000 y 500 ppm se le considera débil, entre 100 y 500 ppm se le considera moderada y por último si la CL_{50} se extiende a partir de 0 a 100 ppm se le considera fuerte, dado este criterio el resultado obtenido del propóleo resultó con un índice moderado de toxicidad con una CL_{50} de 305.29 $\mu\text{g/mL}$, esto concuerda con Palomino-García, 2009 en donde menciona que el propóleo de Antioquia presenta valores de toxicidad moderada (300 $\mu\text{g/mL}$).

El cromatograma de (HPLC), mostró que el extracto de propóleo de Chihuahua posee compuestos como las flavanonas que deben su actividad a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares (Domingo y López-Brea, 2003), flavonas, flavonoles, isoflavonas, son para los vegetales sustancias muy importantes pues son responsables del color de muchas flores, frutos y hojas, y por ello fundamentales para la polinización y para la protección frente a la radiación ultravioleta; además de otros compuestos como ácido fenólico y fenil propanoides los cuales poseen propiedades antioxidantes, antibacterianas, antiespasmódicos, antiulcerosos, antiinflamatorios, antialérgicos, antihepatotóxicos por mencionar algunas de ellas (Martínez, 2002; Pérez, 2003).

El análisis del cromatograma de gases masas mostró que los compuestos mayoritarios en el extracto son la pinocembrina la cual posee propiedades antibacterianas, antifúngicas (Cartaya y Reynaldo 2001), el ácido benzoico y crisina con propiedades antioxidantes, ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Castro, 2002).

El análisis de HPLC-MS mostró que el extracto de propóleo posee 14 flavonoides diferentes pero sólo 2 se encuentran en la base de datos y se pudieron identificar como la pinocembrina, que posee propiedades antibacterianas, antifúngicas (Cartaya, 2001), naringenina con propiedades antioxidantes (Reynaldo et al., 2001) los compuestos existentes actúan en sinergia y posiblemente son los que confieren las propiedades antimicrobianas al extracto del propóleo de Chihuahua.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de propóleo presentó actividad antibacteriana sobre Gram positivas y Gram negativas, así como también presentó una inhibición en hongos filamentosos importantes.
- El extracto es bactericida sobre *S.aureus* y *P.aeuginosa*
- El extracto presenta una cantidad importante de compuestos fenólicos totales y flavonoides.
- El compuesto de mayor abundancia fue la Pinocembrina
- El extracto presentó una toxicidad moderada

APÉNDICE 1. Zona de Colecta

El propóleo se obtuvo en greña (propóleo en bruto) por los propios apicultores en Noviembre de 2014 y antes de ser procesado se conservó en oscuridad y a temperatura ambiente.

El apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Chihuahua se encuentra ubicado en Ejido Concordia en la zona centro de Chihuahua, abarca los municipios de Aquiles Serdán y Chihuahua.

Esta zona tiene un clima semiárido, extremoso, con una temperatura máxima de 40°C y mínima de -7.4°C. Su vegetación está constituida por xerófilas, herbáceas, arbustos de diferentes tamaños, entremezclados con algunas especies de agaves, yucas y cactáceas leguminosas como el huizache, guamúchil, quiebre hacha, zacates, peyote, bonete, hojosas y chaparral espinoso. La flora más representativa del área donde se encuentra el apiario, son árboles de mezquite (Gobiernos municipales, 2014).

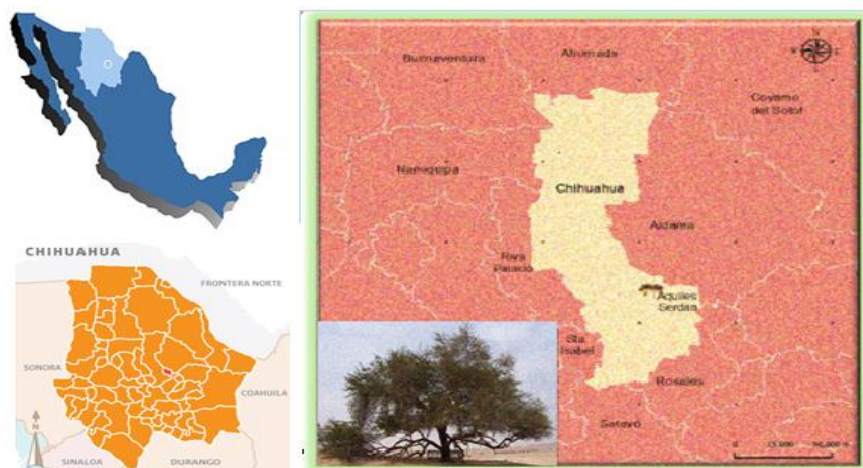


Figura 17. Ubicación del apiario donde se realizó la Colecta del propóleo de Chihuahua.

APÉNDICE 2. Técnica de maceración

(Domínguez, 1973)

El propóleo en greña se limpió y pesó y se colocó en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se le agregó una cantidad de solvente metanólico necesaria en donde el propóleo quedó cubierto por este mismo (565.4 g de muestra en 1.5L de solvente), el recipiente se tapó con papel aluminio para evitar la evaporación del solvente.

El propóleo se dejó reposar con un mínimo de 1 día y máximo de 2 semanas, teniendo en cuenta que la extracción de los compuestos se verá reflejada en la coloración del líquido, entre más oscuro mayor el rendimiento.

Por último se realizó una destilación a presión reducida en un rotavapor, para obtener el extracto libre del solvente.

APÉNDICE 3. Método de difusión en agar Kirby-Baüer

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)

Método para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica (de las levaduras) del extracto.

•**Medio:** Para los ensayos con las cepas fúngicas se utiliza como medio de cultivo el agar PDA y caldo Sabouraud, para las cepas bacterianas agar y caldo Müeller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

•**Aplicación de sustancias:** Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocarán manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril, deben colocarse por lo menos a 22 mm uno del otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

•**Preparación de las muestras:** en todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg para bacterias y 4 mg para las levaduras de los extractos disueltos en 10 µL del solvente correspondiente a cada extracto. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.

- Control positivo:** Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos con 5 μ L de cloranfenicol (25 μ g) y para las levaduras con 25 μ g de nistatina.
- Control negativo:** Sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L del solvente empleado para disolver el extracto a evaluar.
- Incubación:** Las levaduras y bacterias son cultivadas en una caja de Petri con 20 mL de agar, se colocan en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35°C, sin mayor tensión de CO₂.
- Interpretación de resultados:** En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportarán los valores promedio, asociándoles su desviación estándar.

APÉNDICE 4. Microtécnica de dilución en caldo

(Koneman, 1985)

La microtécnica de dilución en caldo se utiliza para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM).

Medio: La susceptibilidad de los microorganismos antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica con 96 concavidades (placa de cultivo con fondo en “u”). La placa se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas (0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL).

•**Inóculo:** Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) (bacterias), posteriormente se incuba a 35°C durante 24 horas (produciendo en el caso de las bacterias una concentración de aproximadamente 1×10^8 UFC/ML y se diluyen en caldo Müller-Hinton, para obtener una concentración aproximada de 1×10^5 UFC/mL. En cada una de las 96 concavidades se colocaron 50 µL de las suspensiones diluidas

•**Control negativo:** Como control negativo se coloca 50 µL de caldo Müller-Hinton (bacterias) con los microlitros del solvente empleado para disolver el extracto

•**Testigo:** El testigo se preparará colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton en las concavidades más 50 µL del cultivo bacteriano.

•**Incubación:** Una vez cargadas las placas con la suspensión microbiana, se cubrirán con una tapa para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas.

•**Interpretación de resultados:** Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50 µL de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC). La placa se incubará 30 min. En las concavidades donde se desarrollen organismos,

el colorante es reducido a color rojo visible, produciendo un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanecerá clara. La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM). En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado.

APÉNDICE 5. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano

(Muroi et al., 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la inactivación.

•**Medio:** Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. El medio se coloca en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm.

•**Inóculo:** Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 UFC/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación).

Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1 mL de la suspensión bacteriana en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 UFC/mL en cada tubo. Se incubará en una estufa a 35°C sin presión de CO₂.

•**Aplicación de sustancias:** Se prepara en tubos con 10 mL de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de CMI, ½ CMI y CBM. Se muestreo cada hora durante los primeros 4 tiempos: T0-0, T1-1, T2-2, T3-3, T4-4 (tiempo-horas transcurridas), después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 hrs y

finalmente a las 24 hrs. En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo.

•**Testigo:** Se prepara un tubo sin extracto como testigo.

•**Incubación:** Las cajas se incuban durante 24 hrs a 35°C.

•**Interpretación de resultados:** Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

APÉNDICE 6. Inhibición del crecimiento radial

(Wang y Bun, 2002)

Método cualitativo

Para el ensayo contra hongos filamentosos se utilizaron cajas Petri (100 x 15 mm) con 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculó un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Se colocaron discos previamente impregnados con el compuesto activo, estos fueron colocados a una distancia de 30 mm del límite micelial.

Incubación: Las placas fueron incubadas a 23°C durante 72 horas hasta el crecimiento micelial se desarrolló.

Controles negativos: Discos a los que se les agregó 10 µL del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que las experimentales)

Controles positivos: Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7µg/ disco de Ketoconazol.

Interpretación de resultados: En el caso de existir zonas de inhibición se reportó el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se hizo por triplicado.

Método cuantitativo

Este ensayo se realizó en cajas de cultivo de 24 pozos, cada uno de estos contenía 1.5 mL de agar papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 8.0, 6.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, mg/mL, posteriormente se colocó un botón de micelio (5mm) en el centro del pozo.

Incubación: las placas fueron incubadas a 23°C durante 72 horas (o hasta que haya crecido el micelio).

Control positivo: se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo al agar las siguientes concentraciones de ketoconazol: 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Interpretación de resultados: los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición será aquella en la que ya no hubo crecimiento micelial, la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF_{50} . Este cálculo se realizó con un modelo matemático.

APÉNDICE 7. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

(Okusa et al., 2007)

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) es un radical libre, con un electrón desapareado que le da una coloración violeta y que no se dimeriza. Cuando el DPPH está en contacto con una sustancia que le puede donar un átomo de hidrógeno, éste se reduce produciendo un cambio de color de violeta a amarillo, coloración dada por el grupo picril (Molyneux, 2004).

Con base a lo anterior, la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) se evalúa midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de DPPH, por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm). A partir de la medición obtenida por medio de espectrometría UV-VIS, se determina la concentración a la cual el radical es reducido al 50 %.

Solución DPPH

Se prepara en un matraz aforado pesando 0.002 gr y agregando 50 mL de MeOH grado HPLC.

Las concentraciones a evaluar son las siguientes: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, y 1000 ppm, las cuales se preparan siguiendo la tabla, en frascos de 1 mL.

Para la concentración de 1, 2, 3 y 4 ppm hacer:

Del stock (5 mg en 5 mL MeOH) tomar 20 µL que llevarán 0.02 mg = 20 µg y agregar 180 µL de MeOH, el volumen final serán 200 µL. De este nuevo stock tomar:

[] ppm	μL stock	μL MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960

Del stock (5 mg en 5 mL de MeOH) tomar:

[] ppm	μL stock	μL MeOH
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750
300	300	700

400	400	600
500	500	500
600	600	400
700	700	300
800	800	200
900	900	100
1000	1000	0

Aplicación de sustancias

En una placa de ELISA se adicionan 50 μ L de la solución problema a diferentes concentraciones (1-1000 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 μ L de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 μ M; inmediatamente se protege de la luz envolviéndola con papel aluminio y se incuba durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. Es importante señalar que se emplean este tipo de placas debido a que el material no reacciona con los solventes empleados.

Blanco

Se llenan pozos con 200 μ L de metanol grado HPLC.

Control positivo

Se realiza una curva patrón de quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de resultados

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente formula:

% Reducción del DPPH= $(C-E/C)*100$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPH (150 μ L) + Solución problema (50 μ L)).

APÉNDICE 8. Determinación de la concentración de Fenoles Totales (CFT)

(Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica de óxido-reducción, dónde es empleado el reactivo de Folin-Ciocalteu que actúa como agente oxidante. El reactivo de coloración amarilla y pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que tienen la capacidad de reaccionar con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de las moléculas (Gutiérrez et al., 2008).

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que es una pequeña molécula que debido a su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo $-OH$ (Aguilar et al., 2003).

Curva de calibración

Se utiliza una solución estándar ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de ésta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05 y 1 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL, cuadro 18.

Preparación del extracto

Se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), de la cual se tomó una alícuota de 250 μ L y se agregan 750 μ L de agua destilada, para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Cuadro 18: Curva patrón para la determinación de fenoles totales

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón (ácido gálico μL)	Agua destilada (μL)	Agua destilada (mL)	Folin- Ciocalteu (μL)	Na ₂ CO ₃ (mL)
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25(31)	968	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937	7	500	1.5
3	0.025	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
problema	-----	250	750	7	500	1.5

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500 μL de reactivo Folin-Ciocalteu.

Después de cinco minutos se añadirá 1.5 mL de una solución de Na₂CO₃ (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determinara la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determinara por triplicado.

Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpoló la absorbancia de la muestra a evaluar.

Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

APÉNDICE 9. Cuantificación de flavonoides totales

Método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)

Este método se basa en el cambio de la coloración de una solución de AlCl_3 (incolora) a amarilla por la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4 y, o bien el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, así como por la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides (Kalita et al., 2013)

Stock de quercetina

Se pesan 3 mg de quercetina en 3 mL de MeOH grado HPLC.

Curva patrón

Se toman alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm y se les agrega 1 mL de AlCl_3 al 2 %.

Para la concentración de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm hacer:

Del stock de quercetina tomar 20 μL que llevarán 0.02 mg = 20 μg y agregar 180 μL de MeOH, el volumen final serán 200 μL de este nuevo stock tomar:

[] ppm	μL Stock Quercetina	μL MeOH	(AlCl_3) al 2 %
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

Del stock de quercetina (3 mg en 3 mL de MeOH) tomar:

[] ppm	µl Stock Quercetina	µL MeOH	(AlCl ₃) al 2 %
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

Stock de extracto

Se pesa 0.02g de extracto metanólico, se disuelve en 3mL de MeOH grado HPLC.

Blanco

Se toma 1mL del stock del extracto y 1 mL de MeOH grado HPLC.

Problema

Se toma 1 mL del stock del extracto y se le agrega 1 mL de AlCl₃ al 2 %.

Se vacían 200 µL de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA, por triplicado.

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 450 nm.

Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola el promedio de la absorbancia de la muestra a evaluar.

APÉNDICE 10. Método de toxicidad general

(Método modificado de Niño et al., 2006)

El ensayo se realizó con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). Se preparó una solución para un litro en el que se agregaron 5 g de NaCl y 2 g de NaHCO₃, posteriormente se pesaron e incorporaron a la solución 0.5g de quistes de *A salina*.

Para hacer eclosionar los quistes deben cultivarse 24 a 48 horas con buena oxigenación, a una temperatura de 25°C aproximadamente e iluminación artificial (luz blanca).

Posteriormente se colocaron 10 larvas en frascos con 10 mL de solución salina al 0.5%, las concentraciones de los problemas a ensayar fueron 125 mg/mL, 12.5 mg/mL y 1.25 mg/mL, 1000, 100 y 10 ppm respectivamente.

Control negativo: Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual será el solvente para disolver la muestra (extracto) se emplea el mismo volumen en que se disuelve la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar (500 µL)

Control positivo: Se utilizó ácido gálico

Incubación: Los cultivos se mantuvieron iluminados (luz blanca) a una temperatura de 23-25°C durante 24 horas.

Interpretación de resultados: se contó el número de larvas sobrevivientes, las cuales debieron desplazarse de la misma manera que el grupo testigo.

La concentración letal media (CL₅₀) se determinó para cada extracto interpolándolo en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración de mg/mL a través del análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la CL₅₀ está entre los 1000 y 500 ppm (0.5 y 1 mg/mL), moderada cuando la CL₅₀ está entre 100 y 500 ppm (0.1

y 0.5 mg/mL) y señalado como fuerte cuando la CL_{50} se extiende a partir de la 0 a 100 ppm (0 a 1 mg/mL) según el criterio de McLaughlin et al 1998.

APÉNDICE 11. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

En cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Cromatógrafo de Gases Modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C, Marca Agilent Technologies.

Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película.

Condiciones de corrida para las fracciones (Método hexánico):

- Temperatura del inyector: 250 °C
- Modo de inyección: Split
- Radio: 33.5:1
- Purga de flujo del Split: 29.9 mL/min
- Flujo de corrida: 35 cm/seg

Horno:

- Temperatura inicial: 70°C

- Rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta 290 °C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 21.67 minutos
- Línea de transferencia: 290°C

Detector del espectrómetro de Masas:

- Método de adquisición de datos. Full Scan
- Rango de masas: 35-600 m/z
- Temperatura de cuádrupolo: 150°C
- Temperatura de la fuente de ionización: 230°C
- Impacto electrónico: energía de 70 eV

APÉNDICE 12. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Este método es ampliamente usado para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes de productos naturales (Gurib-Fakim, 2006). Es un tipo de cromatografía en columna, se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Los elementos que participan en la interacción en un HPLC son: fase móvil, fase estacionaria y la muestra.

En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presenta pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasa mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

El extracto metanólico y las fracciones activas se analizarán por HPLC, con las siguientes condiciones:

Columna Allsphere ODS-1 de 250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm .

Extracto metanólico: se corrió con una mezcla de MeOH-acetonitrilo- $\text{H}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (25:25:0.1:50)

Flujo de 1 mL/min

Detector de arreglo de diodos (DAD)

Longitud de onda de 280 nm, realizando un barrido completo de 200-400 nm.

APÉNDICE 13. Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM)

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es la técnica de separación de sustancias más ampliamente utilizada. Los sistemas HPLC-EM facilitan el análisis de muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar por CG-EM es decir, analitos poco volátiles. Como resultado, la técnica es ampliamente utilizada en el análisis de fármacos, proteínas, entre otros.

Los sistemas de ionización que han hecho posibles este desarrollo son los sistemas API-El y APCI. De esta forma se pueden analizar compuestos de peso molecular de hasta 100kDa, con un rango de polaridades que va desde analitos no polares hasta los muy polares.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM (por sus siglas en inglés) combina el poder de separación de los materiales de gran peso molecular de la HPLC y la capacidad de detección selectiva y confirmación de identidad molecular del espectrómetro de masas.

Los espectros de masas obtenidos por HPLC-MS suelen ser más sencillos que los obtenidos en CG-EM debido a que el nivel de fragmentación de las moléculas es menor. El inconveniente es que los espectros dependen parcialmente de los parámetros de ionización, es decir, que no pueden ser considerados como “huella dactilar” del compuesto y, por tanto, la comparación con colecciones de espectros

estándares no es posible. Por esta razón, la comparación del espectro de masas de analitos con patrones debe realizarse en las mismas condiciones de trabajo.

En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presentara pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasara el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra que se analizara será introducida y sus componentes se retrasaran diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que se adelantarán por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra dependerá de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tardará un compuesto a ser eluido de la columna se denominara tiempo de retención y se considerará una propiedad característica que identificará a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementará la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reducirá así su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

Se efectuó el análisis de las muestras, mediante perfiles cromatográficos, en HPLC acoplado a un espectrómetro de masas, para ello se empleó un equipo Infinity de los cuales la columna e inyector eran del modelo 1269 y la columna 1290, el espectrómetro de masas Agilent Technologies 6230TOF, para este fin, se empleó una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150x2.1mm)(Phenomenex) y una fase móvil en gradiente de dos líneas (A y B), A=agua grado HPLC-Acetonitrilo (90:10), B=Metanol grado HPLC-Acetonitrilo (90:10) y a ambas se les agrega 0.1% de ácido fórmico. El cromatograma fue comparado con los estándares.

REFERENCIAS

- Adelman, J., 2005. Propóleo: variabilidad de correlación y composición con la flora y actividad antimicrobiana/antioxidante. Tesis de Maestría en Ciencias de Graduados Farmacéutica Programa de Ciencias Farmacéuticas, Sección de Ciencias de la Salud, Universidad Federal de Paraná.
- Aguilar-Ortigoza, C., Sosa, V., Aguilar-Ortigoza, M., 2003. Toxic Phenols in Various Anacardiaceae Species. *Economic Botany*, 57, 354-364.
- Agüero, M., Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M., 2011. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food And Chemical Toxicology*, 49, 1970-1978.
- Ahn, M., R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K., S., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7286-7292.
- Amoroso, A., Di Conza, J., Massa, R., Power, P., Radice, M., Gutkind, G., 2006. Mecanismos de acción y resistencia a drogas antibacterianas. En: Basualdo J., Coto C. y de Torres R. *Microbiología biomédica*, 2, 163-82.
- Armutcu, F., Akyol, S., Ustunsoy, S., Turan, F., F., 2015. Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9, 1582-1588.

- Ataç-Uzel, K., S., Özant-Önçağ, D., Ç., Ömür, G., Berkir, S., 2007. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160, 189-195.
- Bankova, V., S., De Castro, S., L., Marcucci, M., C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, 31, 3–15.
- Baquero, F., Coque, T., M., De la Cruz, F., 2001. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3649-3660.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., Rodríguez, E., 2004. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino. *Acta Farm. Bonaerense*, 23, 369-72.
- Brehm-Stecher, B., F., Johnson E., A., 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apritone. *Antimicrobial. Agents and Chemother*, 47, 3357-3360.
- Burdock, G., A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347–363.
- Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M., A., Losacco, V., Puccini, V., 1999. Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parasitologia*, 41, 587-90.

- Carrillo-Muñoz, A., J., Tur, C., Estivill, D., Montsant, L., Carceller, A., Hernández-Molina, J., M., 1997. Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* sp y *Cryptococcus neoformans*. Revista Iberoamericana de Micología, 14, 50-54.
- Carson, C., F., Mee, B., J., Riley, T., V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by timekill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46, 1914-1920.
- Cartaya, O., Reynaldo, I., 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales, 22, pp. 5-14.
- Castro, G., M., I., 2002. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. Interciencia. 27, 128 – 136.
- Chaillou, L., L., Herrera, H., A., Maidana, J., F., 2004. Estudios de propóleos de Santiago del Estero, Argentina. Ciencia y Tecnología de Alimentos, 24, 11-15.
- Chambers, H., 2007. Quimioterapéuticos. Farmacología básica y clínica. 10, 751-806.
- Chapman, S., W, Cleary, J., D., Rogers, P., D., 2003. Amphotericin B. En:Dismukes W. E., Pappas P. G. & Sobel J.D, Clinical mycology. Philadelphia, EUA: Oxford University Press, 33-48.

- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers de Bruney, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213-220.
- Clardy, J., Fischbach, M., A., Walsh, C., T., 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, 24, 1541-1550.
- Copping, L., G., Duke, S., O., 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, 63, 524-554.
- Cottica, S., M., Sabbik, H., Antoine, Céline. Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J., V., 2015. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT-Food Science and Technology*, 60, 609-614.
- Cowan, M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 12, 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T., M., Lewis, N., G., 2000. Natural Products (Secondary metabolites). En: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. Eds. 2002. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plants Physiologists. Maryland, USA, 1250-1318.
- Cruz, S., J., S., 2007. Más de 100 Plantas Medicinales (1ª edición). *Medicina Popular Canaria*, 17-38.

- Cué, B., Morejón, M., G., 1998. Antibacterianos de acción sistemática. Parte I. Antibióticos betalectamámicos. Revista Cubana de Medicina General Integral, 14, 40-48.
- Cuenca-Estrella, M., 2010. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. Revista Española de Quimioterapia, 23, 169-176.
- Cushnie, T., P., T., Lamb, A., J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. The international Journal of Antimicrobial Agents, 26, 343-356.
- Daza-Pérez, R., M., 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, 22, 57 – 67.
- Domingo, D., López-Brea, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia, 16, 385- 393.
- Domínguez, X., A., 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica (1ª edición). Limusa. 3-17.
- Drago, S., M., López, L., M., Sainz, E., T., 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 37, 58-68.

- Eloff, J., N., 1998. It is posible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 1-8.
- Errecalde, J., 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. Tomado en Agosto 2016. Disponible en:

<http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s04.htm#TopOfPage>
- Escobar, C., Zuluaga, A., 2004. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 32, 231-240.
- Evans, E., G., 1998. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38, 32-36.
- Fabricant, D., S., Farnsworth, N., R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug Discovery. *Environmental Health Perspective*, 109, 69-75.
- Farré, R., Frasquet, I., Sanchez, A., 2004. El propolis y la salud. *Ars. Pharmaceutica*, 45, 21-43.
- Ghisalberti, E., L., 1979. Propolis: a review, *Bee World*, 60, 59–84.
- Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21, 263-277.

- Gobiernos municipales 2014. Tomado el 20 de octubre 2016. Disponible en: http://www.aquilesserdan.gob.mx/Contenido/plantilla5.asp?cve_canal=14681&Portal=aquilesserdan.
- Gold, H., S., Moellering, R., C., Jr., 1996. Antimicrobial-drug resistance. The New England journal of Medicine, 335, 1445-1453.
- Gómez, M., I., 2011. Optimización del uso de los antimicrobianos: impacto en la evolución de la resistencia bacteriana y los costos hospitalarios. Tesis Doctoral en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Médicas, Argentina, 104.
- González, G., A., R., 2007. Avances y Perspectivas del Propóleos en la Salud Humana. Ensayo. Memorias del XXI Seminario Americano de Apicultura.
- Griffin, S., G., Wyllie, S., G., Markham, J., L., Leach, D., N., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour and Fragrance Journal, 14, 322-332.
- Gros, G., E., Pomilio, A., Burton, G., 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, 147.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine, 27, 1-93.

- Gutiérrez, A., D., Ortiz, G., C., Mendoza, C., A., 2008. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro, 1-5.
- Hudson, M., M., 2001. Antifungal resistance and over-the-counter availability in the UK: a current perspective. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 345-350.
- Ingraham, J., L., Ingraham, C., A., 1998. Introducción a la Microbiología. Reverté. España, 751.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V., 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food Chemistry, 116, 452-461.
- Kalita, P., Barman, T., K., Pal, T., K., Kalita, R., 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 3, 33-37.
- Kartal M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., Topçu, G., 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. Journal Ethnopharmacol, 86, 69-73.
- Katircioğlu, Hikmet., Mercan, Nazime., 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. African Journal of Biotechnology, 5, 1151-1153.

- Khan Z., Mirza, M., Kumar, A., Verma, V., Qazi., G., N., 2006. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother, 50, 810-812.
- Koneman, W., E., 1985. Diagnóstico Microbiológico (1ª edición). Médica Panamericana, México. 439.
- Koneman, W., E., 1996. Diagnóstico Microbiológico (1 1ª edición). Médica Panamericana, México. 339.
- Koru, O., 2007. In vitro antimicrobial activity of propolis samples of different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe, 13,140-145.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popova, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology, 64, 235-240.
- Kumazawa, S., Hmasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry, 84, 329-339.
- Laupland, K., B., Church, D., L., Mucenski, M., 2003. Population-based study of the f the Epidemiology of and the Risk Factors for Invasive *Staphylococcus aureus* Infections. The Journal of Infectious Diseases, 187 ,1452-1459.

- Lin, Y., T., Kwon, Y., I., Labbe, R., G., Shetty, K., 2005. Inhibition of *Helicobacter pylori* and Associated Urease by Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8558-8564.
- Lotti, C., Campo, F., M., Piccinelli, A., L., Cuesta, R., O., Marquez, H., I., Rastrelli, L., 2010. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2209-2213.
- Manrique, A., J., 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical*, 24,1-6.
- Marcucci, M., C., Ferreres, F., García, V., C., Bankova, V., S., De Castro, S., L., Dantas, A., P., Valente, P., H., M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74,105-112.
- Marr, K., A., Carter, R., A., Crippa, F., Wald, A., Corey, L., 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 34,909-917.
- Martínez, M., 1967. Las plantas medicinales de México (1ª edición). México, 299-300.
- Martínez, F., S., González, G., J., Culebras, J., M., Tuñón, M., J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17, 271 – 278.

- Martins, R., Pereira, E., Lima, Jr., S., Senna, M., Mesquita, R., Santos, V., 2002. Effect of comercial etanol propolis extra with the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. Journal of Oral Science, 44, 41-48.
- Mason, T., L., Wasserman, B., P., 1987. Inactivation of red beet bataglucans synthase by native diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, 58, 85-88.
- McLaughlin, J., L., 1991. Crow Gall Tumours on Potato disc and Brine Shrimp Lethality: Two simple Bioassays for Higher Plant Screening an Fractionation. En: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. (Ed), Methods in plants Biochemistry assays for Bioactivity, Academic Press, 6, 1-32.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J., L., 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 20, 523-30.
- Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A., 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). Journal Ethnopharmacol, 58, 85-88.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylcrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin, Journal Science Technology, 26,211-219.

- Moreno, H., Zulma, M., A., P, Figueroa, Judith., 2007. Efecto antimicrobiano in vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Redalyc. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal, 5, 70-75.
- Muroi, H., Kubo, A., Kubo, I., 1993. Antimicrobial activity of cashew Apple flavor compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 1106-1109.
- Niño, J., Correa, Y., M., Mosquera, O., M., 2006. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of 11 Solanaceae Plants from Colombia Biodiversity. Pharmaceutical Biology, 44, 14-18.
- Okusa, P., N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). Journal of Ethnopharmacology, 112, 476-481.
- Organización Mundial de la Salud, 2010. Tomado el 20 Septiembre 2016. Disponible en: <http://www.who.int/es>.
- Palomino, G., Lady, R., García, P., M., Gil, G., Juárez, H., Rojano, B., A., Durango, R., L., 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Revista de la facultad de química farmacéutica, 16, 388-395.

- Palomino, G., L., R., 2009. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Universidad nacional de Comlombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias-Escuela de Química Medellín.
- Passerini de Rossi, B., 2007. Transferencia de genes. En: Basualdo J, Coto C, de Torres R, editors. Microbiología biomédica. 2ª ed. Buenos Aires: Atlante. 163-82
- Pelczar, Jr., M., J., Chan, E., C., S., 1984. Elementos de microbiología. Mc Graw-Hill. México, 334- 336.
- Peña, I., 1976. Elementos de Observación en la medicina Nahuatl. En: Estudios sobre etnobotánica y antropología médica. Editorial Libro de México. México, 11.
- Pérez, T., G., 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana de Investigación Biomédica, 22, 48 – 57.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., Jerala, R., 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochem. Biophys. Res. Commun, 306, 530-536.
- Polunin, M., Robbins, C., 1992. The Natural Pharmacy. An Illustrated Guide to Natural Medicine. Editorial Dorling Kinderley. Alemania, 70-75.

- Popova, M., Bankova, V., Spassov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Silva, M., V., Tsartsarova, M., 2001. New bioactive chalcones in propolis from El Salvador. Zeitschrift Für Naturforschung, 56, 593-596.
- Praveen, K., R., Awang, B., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. Journal of Engineering Science and Technology, 2, 70-80.
- Quintero-Mora, M., L., Londoño, O., Amparo., Hernández, H., F., Manzano, G., P., López, M., R., Soto, Z., C., I., Carrillo, M., L., Penieres, C., G., García, T., C., G., Cruz, S., T., A., 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología, 25, 22-26.
- Ramamoorthy, P., K., Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. Journal of Engineering Science and Technology, 2, 70-80.
- Reynaldo, I., Cartaya, O., 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba, 22, 5-14.
- Rivera, Y., N., 2013. Comparación de las Propiedades Biológicas del Propóleo de Diferentes Estados de la República Mexicana. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias de la Salud. Escuela Superior de Medicina, 145.

- Salatino, A., Weinstein, T., E., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and Chemical Variations of Brazilian Propolis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2,33-38.
- Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M., 2004. La participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 355-363.
- Sevilla, E., Escobar, I., Martínez, C., Pedrazal, L., Herrero, A., Gutiérrez, R., 1998. Estudio muticéntrico de utilización de antifúngicos en el paciente oncohematológico. Farmacia Hospitalaria, 22,188-96.
- Sheehan, D., J., Hitchcock, C., A., Sibley, C., M., 1999. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. Clinical Microbiology Reviews, 12, 40–79.
- Silva, C., R., Baltazar, F., Almeida, A., C., 2015. Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development, 29.
- Simões, M., Bennett, R., Rosa, E., 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistance bacteria and biofilms. Natural Product Report, 1-12.
- Singleton, V., L., Orthofer, R., Lamuela, R., R., M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol, 299,152-178.

- Siqueira, A., B., S., Gomes, B., S., Cambuim, I., Maria, R., Abreu, S., Souza-Motta, M., De Queiroz, L., A., Porto, A., L., F., 2008. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. Journal compilation. The authors the Society for applied Microbiology, 48, 90–96.
- Soledad, A., J., 2007. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Tesis Doctorado. Universidad de Granada, 123.
- Soto, H., M., 2007. “Actividad antioxidante”. Fitotecnica Mexicana, 30, 43-49.
- Stavri, M., Piddock, L., J., V., Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 1247-1260.
- Tolosa, L., Cañizares, E., 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica, 43, 187-204.
- Torres, C., M., 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza. España, 15-36.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M., Laguna, C., Da Rocha, P., Pasi,n F., Tsvetkova, I., 2006. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. Advance Acces Published, 1-6.

- Vanden, B., D. A., Vlietinck, A., J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Methods in plant biochemistry. "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA, 6, 47-71.
- Vargas-Sanchez, R., Torrescano, U., Sanchez, E., 2013. El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38, 705-711.
- Wang, H., Bun, T., N., 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*, 61, 1-6.
- Wang, B., J., Lien, Y., H., Yu, Z., R., 2004. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chemistry*, 86, 237-243.
- Yang, S., J., Wu, J., J., Wang, Y., C., Huang, C., F., Wu, T., M., Shieh, C., 2015. Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. *J. Supercrit. Fluids*, 94, 138-146.