



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE PROPÓLEOS MEXICANOS
POR HPLC-UV-ESI-MS**

TESIS
QUE
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. SERGIO ROBLES OBREGÓN

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México, Enero 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE PROPÓLEOS MEXICANOS POR
HPLC-UV-ESI-MS**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. SERGIO ROBLES OBREGÓN



Ciudad de México, Enero 2018

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Secretaria	Dra. Nuria Esturau Escofet

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 111, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

Q. SERGIO ROBLES OBREGÓN

SUSTENTANTE

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

TUTOR

Parte de los resultados del presente trabajo se utilizaron en el artículo "Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis." *Molecules*, 2017, vol. 22, no 7, p. 1184.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que mediante su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas me permitió completar una nueva etapa en mis estudios.

Al CONACyT, por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (número de becario 583664).

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su asesoría, tiempo brindado, apoyo constante y guiarme en la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. Francisco Hernández Luis y Dra. Nuria Esturau Escofet, por su revisión del presente trabajo y por sus comentarios y correcciones que ayudaron a mejorarlo.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz, por su apoyo y orientación para el análisis de HPLC y por permitirme realizar parte de mi trabajo experimental en su laboratorio.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega, por permitirme ocupar su equipo de HPLC y a la maestra Kenneth Rubio Carrasco, por mostrarme cómo utilizarlo.

Al Dr. Roberto Carlos Cañas Alonso y a la M. en C. Margarita Romero Ávila de la USIP, por permitirme ocupar su equipo de HPLC-MS y por la orientación brindada.

A Paola, por ayudarme a mejorar la ortografía y redacción de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios 111 y 113: Montse, Fernanda, Karen, Jorge, Ali, Mariana, Miguel, Roberto, Catalina, Berenice, Violeta, Lidia, Margarita, Jacqueline, Karina, Laura, Valeria, Maritza, Lety, Jessica, Alejandra y Eduardo, por su apoyo, el buen ambiente de trabajo y los buenos momentos compartidos.

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo momento.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares.....	4
4. ANTECEDENTES	5
4.1 Generalidades.....	5
4.2 Características del propóleo según su origen	6
4.2.1 Origen vegetal del propóleo.....	6
4.2.2 Origen geográfico del propóleo.....	7
4.3 Composición general de los propóleos	9
4.4 Propiedades de los propóleos.....	12
4.4.1 Capacidad antioxidante	12
4.4.2 Efectos antimicrobianos.....	14
4.5 Efectos del propóleo en la salud	15
4.5.1 Efectos benéficos.....	15
4.5.2 Efectos adversos	16
4.6 Control de calidad	17
4.7 Análisis químico	19
4.7.1 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	19
4.7.2 Cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC)	20
4.7.3 Espectrometría de masas (MS)	21
4.7.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)	21
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
5.1 Materiales y preparación de las muestras.....	23
5.2 Preparación de estándares para el análisis por HPLC-UV-ESI-MS.....	23
5.3 Determinación del contenido de flavonoides.....	29
5.3.1 Curva de calibración	30
5.3.2 Muestras de propóleo	30

5.4 Determinación del contenido de fenoles totales.....	31
5.4.1 Curva de calibración	31
5.4.2 Muestras de propóleo	31
5.5 Determinación de la actividad antioxidante utilizando la prueba de blanqueamiento de DPPH'	32
5.5.1 Curva de calibración	33
5.5.2 Muestras de propóleo	34
5.6 Análisis mediante HPLC-UV-ESI-MS.....	34
5.6.1 Desarrollo del método de HPLC	34
5.6.2 Ajuste de los parámetros de ionización	36
5.6.3 Inyección de estándares	36
5.6.4 Inyección de las muestras	38
5.6.5 Procesamiento de resultados	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Determinación del contenido de flavonoides.....	40
6.2 Determinación del contenido de fenoles totales.....	42
6.3 Determinación de la capacidad antioxidante.....	44
6.4 Comparación de contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante	46
6.5 Análisis mediante HPLC-UV-ESI-MS.....	49
7. CONCLUSIONES.....	58
8. PERSPECTIVAS.....	60
9. REFERENCIAS.....	61
ANEXO A. ZONAS DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE PROPÓLEO	68
ANEXO B. CROMATOGRAMAS UV, HPLC-ESI-MS (+) Y HPLC-ESI-MS (-)	71
ARTÍCULO	101

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación de los diferentes tipos de propóleo en el mundo.	8
Figura 2. Regiones apícolas de México.....	9
Figura 3. Ejemplos de diferentes tipos de flavonoides: (a) flavona, (b) flavonol, (c) flavanonol, (d) flavanona, (e) flavanol, (f) isoflavona.	11
Figura 4. Abejas productoras de propóleo.....	12
Figura 5. Reacción entre flavonoides y sales de aluminio.	29
Figura 6. Reacción entre DPPH [·] y un antioxidante donador de hidrógeno.....	32
Figura 7. Curva de calibración para la determinación de flavonoides.	40
Figura 8. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.	43
Figura 9. Curva de calibración para la determinación de capacidad antioxidante.....	45
Figura 10. Identificación de compuestos en las muestras de EEP.	49
Figura 11. Compuestos identificados en la muestra F10 de EEP.....	50
Figura 12. Comparación de las corrientes iónicas totales generadas por de HPLC-UV-ESI-MS, modo de ionización positiva.....	55
Figura 13. Comparación de espectros de UV-Vis.....	56

Índice de cuadros

Cuadro 1. Tipos de propóleo en el mundo.....	8
Cuadro 2. Estándares utilizados para el análisis por HPLC-MS.....	24
Cuadro 3. Gradiente de elución cromatográfica.	35
Cuadro 4. Parámetros de ionización para el análisis ESI-MS.	36
Cuadro 5. Valores de tiempo de retención y <i>m/z</i> usados para la identificación de compuestos de referencia en las muestras.....	37
Cuadro 6. Tipos de iones detectados en el modo de ionización positiva.	38
Cuadro 7. Tipos de iones detectados en el modo de ionización negativa.	38
Cuadro 8. Resultados de las determinaciones químicas de las muestras de extracto de propóleo.	47
Cuadro 9. Compuestos identificados en las muestras de propóleo mediante HPLC-ESI-MS (+).	52

Listado de abreviaturas

- EEP: Extracto etanólico de propóleo
- UV-Vis: Ultravioleta - visible
- HPLC: Cromatografía de líquidos de alto desempeño
- ESI: Ionización por electrospray
- MS: Espectrometría de masas
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- DPPH: Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- ACN: Acetonitrilo
- m/z : Relación masa-carga
- TIC: Corriente iónica total
- EIC: Cromatograma iónico extraído

1. RESUMEN

El creciente uso del propóleo como complemento a la medicina moderna ha despertado el interés por conocer más acerca de sus propiedades y composición química. En algunos países se ha avanzado en su estudio y en la elaboración de normas para regular su producción y venta. En México recientemente se emitió la norma NOM-003-SAG/GAN-2017 que regula la calidad de los propóleos producidos y comercializados en nuestro país.

El objetivo general de este proyecto fue determinar la composición química de los extractos etanólicos derivados de propóleos recolectados en diferentes zonas melíferas de México.

En este trabajo se utilizaron 59 muestras de propóleo recolectadas en distintas zonas del país y 22 estándares de compuestos potencialmente presentes en las muestras de análisis de propóleo. Se realizaron pruebas para determinar el contenido de flavonoides totales, fenoles totales y capacidad antioxidante de cada una de las muestras. Para determinar su perfil químico se utilizó cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-UV-ESI-MS).

La mayoría de las muestras analizadas cumplió con los criterios mínimos de calidad establecidos por la norma mexicana. Las muestras que presentaron un alto contenido de flavonoides y fenoles totales tuvieron una buena capacidad antioxidante. En las muestras se detectaron flavonoides como acacetina, apigenina y naringenina, que en su estructura química cuentan con sustituyentes en el anillo B. Se concluyó que el año de recolección, la zona geográfica y el método de recolección representan variables importantes que alteran en contenido de flavonoides y fenoles totales. La información obtenida de las muestras puede ser útil para la mejora de la norma de calidad de los propóleos mexicanos.

2. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países que cuentan con una de las más amplias biodiversidades en el mundo. Se estima que en nuestro país se encuentran entre 10 y 12% de las especies del planeta, entre las que se cuentan alrededor de 25,000 especies de plantas vasculares y, de ellas, 23,791 son angiospermas.¹

La gran variedad de especies vegetales con flor se ve reflejada en la diversidad de productos naturales biosintetizados por ellas, como los que se obtienen de la apicultura. Esta actividad económica primaria es de gran importancia por ser una de las principales actividades pecuarias en la que no solamente se producen miel, polen, jalea real y propóleos, sino que las abejas involucradas en su producción ayudan a la polinización de plantas comestibles de relevancia industrial.^{2,3}

Muchas de las sustancias químicas presentes en árboles y plantas son recolectadas por las abejas y transferidas a la miel y al propóleo. Se ha observado que la actividad biológica de estos productos apícolas se encuentra estrechamente relacionada con su composición y, en especial, con la presencia de ciertos grupos de sustancias, como los compuestos fenólicos. Sin embargo, la composición varía a causa de diversos factores y por ello es necesario desarrollar procedimientos para analizarla y evaluar, así, la calidad del producto. Además, con esta información se podría establecer la denominación de origen de los propóleos nacionales.

En algunos países, como Brasil y Argentina, se ha logrado un gran avance en el estudio de este producto natural y en la elaboración de normas para regular su producción y venta. No existe en el mundo una norma que unifique los criterios para evaluar la calidad de los propóleos y es por ello que cada país tiene sus propios lineamientos, incluyendo la terminología relacionada con los propóleos y sus derivados. Actualmente, los países productores de miel y productos derivados de las abejas canalizan esfuerzos para lograr una estandarización a nivel internacional.⁴

En México existen pocos estudios conducentes a caracterizar la composición química y las propiedades farmacológicas de los propóleos. Sin embargo, en 2016 se publicó por la SAGARPA un anteproyecto de Norma Oficial Mexicana que tiene como objetivo regular la calidad de los propóleos y su manejo⁵ y, recientemente, se aprobó como la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017.⁶ No obstante, aún es necesario obtener información sobre la composición química de un mayor número de muestras de propóleos mexicanos para adecuar los límites establecidos como criterios de calidad en dicha norma.

Con base en los antecedentes descritos, en el presente proyecto se diseñó un procedimiento analítico mediante el empleo de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para obtener información acerca de la composición química de diferentes muestras de propóleo y las variaciones que presenta debido a la temporada de recolección, sitios geográficos de recolecta y los métodos que se utilizaron para su recolección.

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es determinar la composición química de los extractos etanólicos derivados de propóleos recolectados en diferentes zonas melíferas del país.

3.2 Objetivos particulares

Los objetivos particulares de este trabajo son los siguientes:

- Determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos derivados de muestras de propóleo recolectadas en diferentes regiones de México utilizando métodos colorimétricos.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de propóleo utilizando el método del DPPH.
- Establecer las condiciones de cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC) para la separación de los extractos de propóleo.
- Establecer las condiciones óptimas de ionización para detectar los compuestos de interés con el detector de masas.
- Identificar la presencia de compuestos fenólicos en los extractos de propóleo utilizando estándares aislados previamente de muestras de propóleo recolectadas en diferentes zonas geográficas de México.

4. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades

El propóleo es el nombre genérico que se le da a la sustancia resinosa recolectada de diversas fuentes vegetales por las abejas.⁷ Esta palabra proviene del griego *pro-*, al frente o a la entrada de, y *polis-*, ciudad, es decir, en la entrada de la ciudad o el panal, en este caso, como defensa. Las abejas lo utilizan para reparar panales fortaleciendo, sellando e impermeabilizando sus paredes y para facilitar la defensa de la colonia. También, lo usan para cubrir el cadáver de algún invasor que no puedan sacar del panal, como algún insecto o mamífero pequeño.⁸

El propóleo ha sido utilizado desde la antigüedad y se sabe que los egipcios, persas y romanos lo utilizaban para tratar diversas dolencias y para el embalsamamiento de los muertos porque evita la putrefacción.⁹ Este producto natural ha servido, entre otros propósitos, como antiinflamatorio, antiséptico, antioxidante y adhesivo. Además, se ha observado que posee actividades antisépticas, antibacteriales, antimicóticas, astringentes, espasmolíticas, antiinflamatorias, anestésicas, antioxidantes, antifúngicas, contra las úlceras, anticancerígenas e inmunomoduladoras.⁸

Las propiedades y características físicas del propóleo dependen de su composición química y ésta, a su vez, depende de las características fitogeográficas de las zonas en las que las abejas lo producen.¹⁰ A temperaturas altas el propóleo es suave y pegajoso, mientras que a bajas, se vuelve duro y quebradizo. Su punto de fusión puede variar desde los 60 hasta los 100 °C. Posee un aroma característico y su color puede variar entre verde, café y rojizo, según sea su fuente botánica.⁹

En tiempos recientes se ha utilizado el propóleo en las industrias de alimentos y bebidas, cosméticos y en productos de higiene oral, lo que ha incrementado su valor económico.¹¹

Actualmente, el creciente uso del propóleo como complemento a la medicina moderna para el tratamiento de diversos problemas de salud ha despertado el

interés por conocer más acerca de sus propiedades y de su composición química. El propóleo es una mezcla compleja y, hasta la fecha, se han identificado más de 300 compuestos presentes en los propóleos de todo el mundo.⁹

Se han identificado numerosos compuestos activos en el propóleo, pero por la alta variabilidad en su composición, no es posible establecer una estandarización química única. En estos casos, es más conveniente establecer diferentes tipos de propóleo según su origen vegetal y con el correspondiente perfil químico. Esto es posible ya que, aunque la diversidad de nuevas sustancias del propóleo es grande, se mantienen los patrones químicos al tratarse de variaciones de los mismos tipos de compuestos.¹² Actualmente, el propóleo de álamo es el más estudiado desde el punto de vista químico y farmacológico.¹³

4.2 Características del propóleo según su origen

4.2.1 Origen vegetal del propóleo

La composición del propóleo es cualitativa y cuantitativamente variable, pues depende de la vegetación en el área en la que se encuentra la colmena. Para identificar las fuentes vegetales específicas, se observa el comportamiento de recolección de las abejas y, así, se determina de qué especies de árboles y plantas provienen las resinas. Posteriormente, se realizan estudios del perfil químico del propóleo y se comparan con los de los exudados vegetales. De esta forma, se establece el grado de concordancia entre ambas y así se puede afirmar con más certeza su procedencia.¹⁴ Más recientemente, se ha podido relacionar el propóleo con el material vegetal de origen a través de estudios de identificación del DNA de los materiales vegetales que quedan atrapados en las resinas.¹⁰

Los materiales que recolectan las abejas para producir propóleo son secretados por las plantas en condiciones normales y también en sus heridas. Entre ellos se encuentran materiales lipofílicos de las hojas y sus yemas, resinas, mucílagos y gomas, entre otros.⁸

Las diferentes especies de álamo son una de las principales fuentes de propóleo alrededor del mundo y, en especial, en las zonas templadas. El propóleo recolectado en numerosas regiones de Europa, América del Norte, regiones no tropicales de Asia, Nueva Zelanda y África presenta un perfil químico característico del propóleo de tipo álamo, que incluye diversos tipos de flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres.¹⁴ Los flavonoides se encuentran presentes en la mayoría de las plantas y hasta la fecha se han identificado más de 4000, lo que los convierte en el mayor grupo de compuestos químicos vegetales.¹⁵

En zonas donde los álamos no son nativos las abejas buscan otras fuentes vegetales cuyas secreciones produzcan efectos similares a los del propóleo de álamo, aunque su composición sea diferente. Por ello, los componentes mayoritarios de los propóleos tropicales, como los brasileños, son terpenoides y derivados prenilados del ácido *p*-cumárico.¹⁶

4.2.2 Origen geográfico del propóleo

A pesar de las variaciones en la composición de propóleos de una misma región, existen compuestos que son comunes a todas esas muestras locales y que determinan sus características y propiedades. Es por ello que se ha establecido una clasificación de los propóleos en diferentes tipos, que se caracterizan por la zona geográfica en la que se producen y por el tipo de compuestos presentes en cada uno de ellos. En la Figura 1 se ilustra la distribución de los diferentes tipos de propóleo en el mundo y, en el Cuadro 1, se detallan los compuestos característicos de cada una de ellas. Para México, las distintas regiones apícolas se muestran en la Figura 2.



Figura 1. Ubicación de los diferentes tipos de propóleo en el mundo.¹²

Cuadro 1. Tipos de propóleo en el mundo.¹²

Tipo de propóleo	Ubicación geográfica	Compuestos característicos
I: Derivado de álamo	Zonas templadas de todo el mundo	Flavonoides sin sustituyentes en el anillo B, e.g., crisina
II: Verde brasileño	Centro y sureste de Brasil	Fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoil quinolínicos, e.g., artepilina C
III: Derivado de <i>Clusia</i>	Noreste de Brasil, Venezuela, zona de la selva Amazónica, Cuba	Benzofenonas polipreniladas
IV: Derivado de <i>Macaranga</i>	Este de África, Taiwán y Japón	Flavonoides de geranilo
V: De la zona mediterránea	Grecia, Creta y Turquía	Diterpenoides y antraquinonas



Figura 2. Regiones apícolas de México.¹⁷

Dentro de las regiones asociadas a los principales tipos de propóleos pueden existir zonas en las que se producen algunos tipos poco comunes de propóleo, que presentan una composición diferente a la de los que son comunes en el área. Por ejemplo, en la península de Yucatán se ha recolectado propóleo rojo en el que se identificaron flavanonas, pterocarpanos e isoflavanos conocidos, además de tres nuevos productos naturales. Este propóleo fue el primero de México en que se reportó la presencia de isoflavonoides.¹⁸

4.3 Composición general de los propóleos

Los compuestos identificados en el propóleo provienen de tres fuentes: exudados de las plantas recolectados por las abejas, sustancias recolectadas y modificadas por el metabolismo de las abejas y materiales que son introducidos durante la elaboración del propóleo.⁷

Se ha observado que el propóleo está compuesto típicamente por:¹⁴

- 50% resina
- 30% cera
- 10% aceites esenciales

- 5% polen
- 5% otros compuestos orgánicos

Las abejas modifican el propóleo durante su recolección con glucosidasas, que son secretadas por sus glándulas hipofaríngeas. Este proceso enzimático ocasiona la hidrólisis de los glicósidos de flavonoides para producir agliconas de flavonoides libres (como flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles y chalconas) y azúcares. Otros productos fenólicos son los aldehídos fenólicos y derivados polifenólicos de los ácidos cinámico y benzoico, incluyendo ésteres del ácido cafeico, terpenos, esteroides, sesquiterpenos y derivados de naftaleno y estilbencenos.¹⁹

Los constituyentes característicos de propóleos de regiones templadas son flavonoides sin sustituyentes en el anillo B, como la crisina, galangina, pinocembrina y pinobanksina.¹⁴ Los átomos de carbono en las moléculas de flavonoides forman dos anillos aromáticos (A y B) unidos por tres carbonos que conforman un anillo heterocíclico (anillo C). Los flavonoides se dividen en diferentes clasificaciones dependiendo del estado de oxidación del anillo C (Figura 3).¹⁵

El feniletiléster del ácido cafeico es un componente principal de los propóleos templados con muchas actividades biológicas. En regiones tropicales, como aquellas en donde se produce el propóleo verde brasileño, el propóleo contiene principalmente fenilpropanoides prenilados y diterpenos.¹⁴

La fracción volátil de los propóleos templados representa aproximadamente el 10% del total de componentes y contribuyen a su olor resinoso característico y efectos farmacológicos. Los terpenoides son los principales compuestos volátiles y pueden usarse como un criterio para distinguir los propóleos de alta calidad de aquellos que son inferiores o falsos.¹⁴ Algunos propóleos, como los de Grecia contienen principalmente diterpenos y casi ningún compuesto fenólico.²⁰

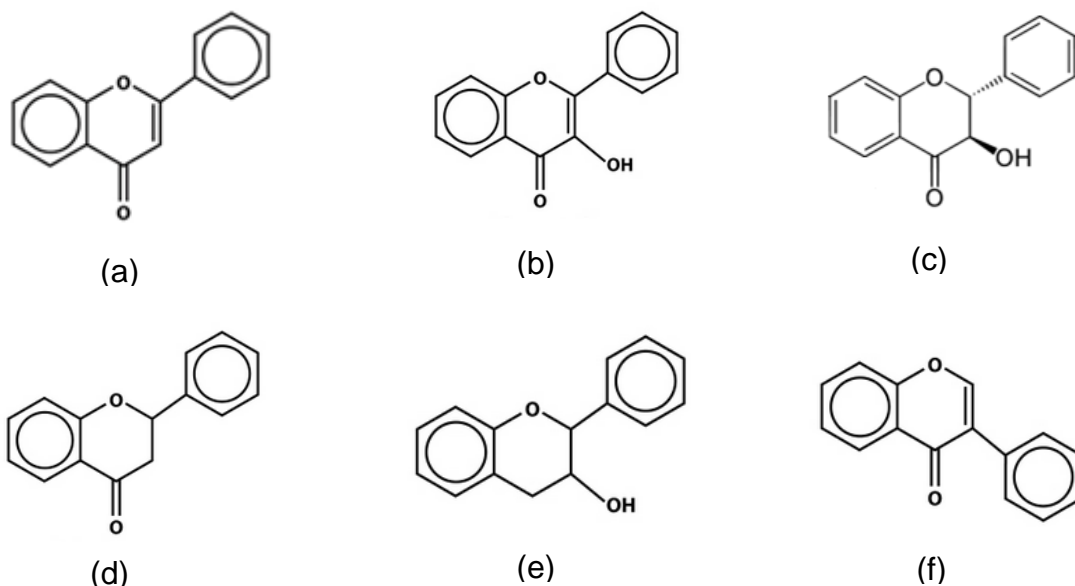


Figura 3. Ejemplos de diferentes tipos de flavonoides: (a) flavona, (b) flavonol, (c) flavanonol, (d) flavanona, (e) flavanol, (f) isoflavona.

Otros propóleos, como el propóleo verde brasileño, son ricos en fenilpropanoides, incluyendo a los ácidos cinámico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sus derivados. Entre ellos, los ácidos cinámicos prenilados tienen una contribución importante a la actividad antimicrobiana del propóleo.¹⁴

El origen de los azúcares presentes en el propóleo aún no se ha definido por completo. Las posibles fuentes incluyen al néctar y la miel, los glicósidos de flavonoides que las abejas hidrolizan y los mucílago vegetales.¹⁴

Los hidrocarburos son otros de los componentes básicos del propóleo y, entre ellos, se encuentran diversos alcanos, alquenos, alcadienos, éteres, monoésteres, diésteres, ésteres aromáticos, ácidos grasos y esteroides en propóleos de diversas regiones del mundo.^{21,22} Al comparar la composición de las ceras presentes en el propóleo con aquellas del panal producidos por la misma colonia, se observó que no existían diferencias significativas, lo que sugiere que fueron secretadas por abejas y que su composición sólo depende de los factores genéticos de éstas y no de las fuentes vegetales.²³

Se cree que la especie, subespecie y variedad de abeja pueden tener gran influencia en la composición química y la calidad del propóleo, ya que su preferencia por determinadas especies de plantas puede ser diferente.^{14,24} Las principales especies de abeja de las que se obtiene el propóleo son *Apis mellifera* y algunas abejas sin aguijón de la familia Meliponini, como *Scaptotrigona mexicana* y *Melipona beecheii* (Figura 4).



a) *Apis mellifera*



b) *Scaptotrigona mexicana*

Figura 4. Abejas productoras de propóleo. (Imágenes proporcionadas por el Biól. Jorge Jiménez Díaz (Fotógrafo))

El contenido mineral del propóleo se ha estudiado mediante técnicas espectroscópicas de absorción y emisión atómicas y con análisis de activación por neutrones. Se han encontrado elementos traza y algunos metales pesados, como As, Cd, Hg y Pb, que se correlacionan con la contaminación proveniente de actividades humanas en el área donde se ubican las colmenas, como las de zonas industriales y el tránsito de vehículos por caminos cercanos.²⁵

4.4 Propiedades de los propóleos

4.4.1 Capacidad antioxidante

Actualmente, se utilizan algunos antioxidantes sintéticos en diversos productos alimenticios, pero su uso se ha restringido debido a que no se conocen sus posibles efectos tóxicos y carcinógenos. Para reemplazarlos, se han buscado antioxidantes

naturales y más seguros en plantas y una variedad de productos naturales, como el propóleo.²⁶

Algunos de los compuestos que se encuentran en los propóleos, como los compuestos fenólicos, reaccionan fácilmente con especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y con radicales libres, por lo que presentan actividad antioxidante. La actividad antioxidante se define como la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidante.²⁶

Las ROS y los radicales libres son subproductos del metabolismo celular en ambientes con abundante oxígeno molecular. Estas especies se forman mediante una variedad de procesos: irradiación por luz UV, por rayos X y rayos gamma, son productos de reacciones catalizadas por metales, están presentes como contaminantes en la atmósfera, se producen por neutrófilos y macrófagos en procesos inflamatorios y son subproductos de reacciones de transporte de electrones catalizados por mitocondrias.²⁶

Se ha reportado que las ROS contribuyen al daño oxidante de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en las células. Además, están involucrados en el desarrollo de muchos procesos degenerativos crónicos como el envejecimiento, el cáncer y enfermedades del corazón. Su producción aumenta durante periodos de estrés oxidante y esto altera la función normal de lípidos celulares, proteínas, DNA y RNA. Por ello, se buscan encontrar maneras eficientes de reducir la cantidad de radicales libres presentes en el cuerpo. Los antioxidantes funcionan como un elemento de defensa en contra de los efectos de los radicales libres en el cuerpo y actúan inhibiendo las reacciones de inicio y propagación, con lo que se retarda el proceso oxidante.²⁶

La superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa son las principales enzimas que combaten a las especies oxidantes. Cuando los radicales libres superan la capacidad enzimática del cuerpo, se comienzan a utilizar en mayor proporción las vitaminas C y E, que los inactivan. La capacidad antioxidante de muchos flavonoides es superior a la de estas vitaminas²⁷ y se ha demostrado que

estos y otros compuestos fenólicos pueden capturar radicales libres y así proteger otros compuestos como los lípidos y la vitamina C, que podrían ser oxidados o degradados durante el daño oxidante. Se han realizado estudios que muestran la capacidad antioxidante de flavonoides presentes en muestras de propóleo de diversas regiones del mundo.²⁸

La capacidad de los flavonoides para reaccionar con los ROS depende del número y la configuración de sustituyentes hidroxilo, principalmente en el anillo B.²⁷ Los polifenoles pueden reaccionar con los radicales libres mediante diferentes mecanismos, entre los que se encuentran:⁹

- La inhibición de su formación al quelatar metales involucrados en su generación.
- La captura de las especies reactivas de oxígeno, con lo que se interrumpe la cascada de reacciones que llevan a la peroxidación de los lípidos.
- La cooperación sinérgica con otros antioxidantes. Estos compuestos son responsables de las propiedades antiinflamatorias del propóleo, tanto en casos agudos como crónicos.
- La activación de enzimas antioxidantes.
- La reducción de radicales α -tocoferilo.
- La inhibición de oxidasas.
- La mitigación del estrés oxidante causado por óxido nítrico.
- El incremento en los niveles de ácido úrico.
- El incremento en las propiedades antioxidantes de antioxidantes de bajo peso molecular.

4.4.2 Efectos antimicrobianos

Se ha observado que los extractos etanólicos de propóleos presentan actividad antibacteriana y estudios microbiológicos con algunas cepas bacterianas Gram-positivas han demostrado que dicha actividad se mantiene, a pesar de las diferencias en su composición química. Esto podría indicar que su actividad

biológica contra estos microorganismos no depende de la concentración de determinados flavonoides, sino del efecto sinérgico de todos los compuestos fenólicos presentes.¹⁹

El propóleo y sus derivados tienen la capacidad de inhibir la propagación de virus y se ha demostrado *in vitro* en pruebas contra algunas variedades de herpes, adenovirus y virus de la polio que reduce la multiplicación viral e incluso los inactiva. Algunos flavonoides, como la crisina y el kaempferol, han mostrado actividad importante en la inhibición de la replicación de varios tipos de herpes, adenovirus y rotavirus, mientras que otros flavonoides, como la galangina y la acacetina no presentaron actividad contra estos virus. Se ha observado que el propóleo muestra mayor actividad antiviral que sus componentes individuales, lo que sugiere un efecto sinérgico.²⁹

Además, el propóleo también presenta actividad antifúngica, la cual se potencia mediante un efecto sinérgico cuando se combina con medicamentos antifúngicos.³⁰

4.5 Efectos del propóleo en la salud

4.5.1 Efectos benéficos

El propóleo, al igual que la miel y la jalea real, puede considerarse como un alimento funcional, es decir, un alimento que afecta ciertas funciones del organismo y promueve un efecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional.²⁹ Un ejemplo de ello es su capacidad antihiper glucémica, ya que evita que aumente de manera acelerada la glucosa en la sangre y, por ello, puede ayudar a los diabéticos a reducir algunos problemas ocasionados por su enfermedad. Los propóleos de diversas partes del mundo también muestran un efecto hepatoprotector significativo.⁹

En estudios contra células cancerígenas se ha observado actividad citostática y citotóxica de algunos de los componentes del propóleo, como la quercetina, la ramnetina, la galangina y el éster feniletílico del ácido cafeico.³⁰ Los estudios *in vitro* han demostrado la actividad citotóxica del propóleo y de sus compuestos aislados

en células derivadas de diversos tumores, que también ha podido observarse *in vivo*. Esto puede sugerir que el propóleo es una fuente potencial de nuevos agentes anticancerígenos que sean más baratos y que presenten menos efectos secundarios que muchos de los fármacos actualmente en uso.³¹

La aplicación clínica del propóleo para combatir enfermedades como el cáncer se ha visto limitada por su escasa solubilidad en agua y, en consecuencia, su baja biodisponibilidad. Algunas técnicas, como el uso de nanopartículas, buscan superar este impedimento al incrementar la dispersión de estos compuestos hidrofóbicos en medios acuosos.³¹ Existen también preparaciones dermatológicas que contienen propóleo para tratar acné, herpes y neurodermatitis.¹¹

La ingesta regular de isoflavonoides se ha relacionado con frecuencias menores en la aparición de cánceres relacionados con niveles hormonales y un menor riesgo de osteoporosis y enfermedades cardíacas.¹⁸ El propóleo también se considera como una herramienta potencial para la salud dental, ya que previene la formación de caries al inhibir a las bacterias que las producen.³²

También, se ha observado que el propóleo favorece la proliferación, la activación y la capacidad de crecimiento de las células de la piel, por lo que se considera un excelente remedio para el tratamiento de quemaduras. En roedores diabéticos se ha demostrado que ayuda en la regeneración de tejidos y aumenta la velocidad de curación de las heridas.⁹

4.5.2 Efectos adversos

Actualmente, no existe información sobre estudios que evalúen la toxicidad aguda de extractos de propóleo. Sin embargo, se han descrito datos sobre las dosis letales medias (LD₅₀) en ratones y varían desde 2050 mg/kg hasta más de 7340 mg/kg. Estos niveles de toxicidad son bajos y esto corresponde con la relativa inocuidad de los flavonoides.³³

A pesar de que generalmente no presenta efectos nocivos, el propóleo contiene algunos compuestos que pueden ocasionar alergia por contacto en la piel. La dermatitis del apicultor es una condición bien conocida y, aparentemente, asociada al contacto prolongado con el propóleo y resinas de álamo. Se ha demostrado que el ácido 1,1-dimetilalilcafeico es el principal compuesto alergénico en este producto natural.³⁰

4.6 Control de calidad

Para garantizar que los propóleos cuentan con las características deseadas, se debe llevar a cabo un control de calidad que comienza con su estandarización según el tipo de propóleo. La estandarización de los propóleos es similar a la de las plantas, pues ambas tienen que basarse en la concentración de sus componentes biológicamente activos. Cada tipo de propóleo cuenta con su perfil químico característico, por lo que no es posible establecer una composición general que abarque a todos los propóleos. Es por ello que para cada tipo de propóleo deben establecerse los metabolitos secundarios correspondientes para evaluar correctamente su calidad. En general, los grupos más comunes de propóleo son el de tipo álamo y el propóleo verde brasileño.³⁴

Si los principios activos son conocidos y aceptados, se deben cuantificar mediante el método analítico apropiado. Si no se conocen o aún se debate sobre ellos, se considera al extracto total como el principio activo y, en ese caso, se utilizan compuestos marcadores como control de calidad.¹³ Un marcador es una sustancia producida por la fuente vegetal y que se asume es constante y abundante en un determinado tipo de propóleo. Por ejemplo, la artepilina C se ha establecido como marcador del propóleo verde brasileño¹², mientras que para los propóleos de tipo álamo, la pinocembrina es un compuesto característico.

La estandarización de los propóleos es importante pues permite obtener resultados confiables de las pruebas de actividades biológicas. Además, con materiales estandarizados se puede correlacionar un tipo de propóleo con una determinada

actividad biológica y así se pueden generar recomendaciones para sus usos y aplicaciones.¹³

Los flavonoides son uno de los grupos principales de compuestos fenólicos en los propóleos de regiones templadas y, por ello, son uno de los principales marcadores para estimar su calidad.³⁵ La determinación cualitativa y cuantitativa de estos componentes puede servir, además, para autenticar la región de la cual proviene un propóleo y, así, establecer controles que combatan la adulteración y la falsificación de estos productos naturales.³⁶

Existen algunos parámetros de calidad comunes para todos los propóleos, entre los que se encuentran:³⁴

- Materia soluble en etanol al 70% (bálsamo): mínimo 45%
- Contenido de agua: Máximo 8%
- Contenido de ceras: Variable, alrededor del 30% como máximo
- Impurezas mecánicas: Máximo 6%
- Contenido de cenizas: Máximo 5%

Existen muchos productos comerciales fabricados con miel, propóleo, jalea real y otros derivados de la apicultura. Entre ellos se encuentran jarabes, sprays, tabletas y cápsulas. Sin embargo, el origen de la materia prima no siempre es conocido y su calidad puede ser dudosa, por lo que la actividad biológica que normalmente se les asocia puede ser cuestionable. Además, el método de extracción y el disolvente utilizado pueden cambiar la composición química del extracto de propóleo.⁸

En los productos comerciales creados a partir de los extractos etanólicos de propóleo se han observado variaciones muy altas en el contenido de flavonoides.³⁵ Estas diferencias pueden estar presentes desde las muestras sin procesar de propóleo, pues se han observado diferencias en la concentración de algunos de sus componentes aun cuando han sido recolectados en la misma zona geográfica.^{19,37}

Por ello, se requiere determinar cuantitativamente la presencia de estos compuestos y así asegurar que dichos productos cuenten con la calidad necesaria

para que los consumidores aprovechen los beneficios a la salud de estos productos naturales.

4.7 Análisis químico

Para el estudio químico de los propóleos se ha utilizado una amplia variedad de técnicas analíticas. La separación de sus componentes se ha realizado mediante cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en columna abierta (OCC), cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC) y cromatografía de gases (GC). Para la identificación de los compuestos se han empleado la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN). También, el acoplamiento de algunas de estas técnicas ha agilizado el estudio de las muestras y permiten obtener información más completa sobre cada una de ellas. En este caso, la GC-MS y la HPLC-MS son algunas de las más utilizadas.

Para extraer los compuestos químicos de interés del propóleo se utilizan diferentes disolventes o mezclas de éstos. Dependiendo de la polaridad de la fase líquida variará la composición del extracto obtenido. Los extractos acuosos y los etanólicos son los más comunes y con ellos es que se estudia este producto natural. Estos últimos son comúnmente utilizados como fuente de flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres contenidos en este producto apícola.

Puesto que gran parte de los componentes del propóleo son relativamente polares, se requiere derivatizarlos para aumentar su volatilidad y que puedan ser analizados por GC-MS. Esto hace que el uso de HPLC-MS sea más común para el estudio de dichos compuestos.²⁰

4.7.1 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)¹⁵

Los flavonoides constituyen pigmentos que le otorgan su color a las hojas y pétalos de los vegetales, por lo que absorben de manera importante radiación ultravioleta. Por ello, la espectroscopía UV-Vis es una de las principales herramientas para el

estudio de estos compuestos. Los protocolos colorimétricos son simples, rápidos, de bajo costo y se utilizan ampliamente incluso como métodos oficiales.³⁸

Por lo general, existen dos máximos de absorción en el espectro UV-Vis de los flavonoides. El máximo ubicado entre 240 y 285 nm se conoce como banda II y el ubicado entre 300 y 400 nm se conoce como banda I. La banda II se asocia con transiciones electrónicas que se presentan en el anillo A, mientras que la banda I corresponde a las que ocurren en el anillo B. Las flavonas y flavonoles muy oxigenados tienden a absorber a mayores longitudes de onda que aquellos con un menor número de sustituyentes oxigenados. La metilación o glicosilación de los grupos hidroxilo en el núcleo de los flavonoides produce desplazamientos hipsocrómicos, principalmente de la banda I.

4.7.2 Cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC)³⁴

Muchos de los compuestos que constituyen al propóleo presentan grupos hidroxilo en su estructura, lo que les da una polaridad intermedia y les permite ser analizados mediante cromatografía de líquidos de alto desempeño en fase reversa. Con este método de separación, se pueden acoplar detectores como espectrofotómetros ultravioleta y espectrómetros de masas que permiten realizar análisis cualitativos y cuantitativos de las muestras y que por su versatilidad se han convertido en los métodos más utilizados para el análisis de este producto natural.³⁹

La fase estacionaria más común para el estudio del propóleo es la C-18 con un tamaño de partícula de 5 μm . Por lo general, debido a la cantidad de componentes presentes en estas muestras, los tiempos de análisis suelen ser mayores a los 50 minutos. Se pueden lograr separaciones más rápidas si se emplean columnas empacadas con partículas menores a 2 μm y utilizando presiones mayores en la modalidad de cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño (UHPLC).

Las longitudes de onda más utilizadas para estudiar compuestos fenólicos en UV se encuentran en la región de los 290 nm debido a su alta absorptividad molar a esa longitud de onda.

La fase móvil para el estudio de propóleos se trata de sistemas binarios, siendo uno de ellos agua acidificada y, el otro, un disolvente orgánico como acetonitrilo o metanol, también acidificado. Se suele utilizar ácido fórmico o acético al 0.1% (V/V) por su compatibilidad con los detectores de espectrometría de masas. Por la complejidad de las muestras, es necesario emplear un gradiente de elución y de esta manera se mejora la separación de los diferentes componentes.

4.7.3 Espectrometría de masas (MS)³⁴

El método de ionización más utilizado para esta técnica analítica es el electrospray, ya que es una técnica suave que permite observar las moléculas protonadas $[M + H]^+$, en modalidad de ionización positiva, o desprotonada $[M - H]^-$, en modo negativo, de muchos de los compuestos fenólicos del propóleo. No obstante, la ionización negativa, debido a la presencia de compuestos ácidos y fenólicos, permite obtener una mejor sensibilidad y mayor información estructural que resulta en una diferenciación superior entre los grupos de muestras de propóleo.

La caracterización (*fingerprinting*) de muestras por espectrometría de masas es una técnica analítica cualitativa que se utiliza para diferenciar los diferentes tipos de propóleos para comparar la composición entre las muestras. Con la información que de ahí se obtiene se puede determinar el tipo de compuestos que contiene y esto se puede usar como base para elaborar una guía de usos terapéuticos.^{40,41,42}

4.7.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)³⁴

La resonancia magnética nuclear se utiliza cada vez con mayor frecuencia para el estudio de alimentos y en el control de calidad de los productos naturales. Una ventaja importante de esta técnica por sobre otros métodos de análisis es la

habilidad de obtener información estructural y cuantitativa de un gran número de especies químicas en un sólo experimento de RMN.^{43,44,45}

El uso de campos magnéticos más elevados y las mayores sensibilidades y resoluciones espectrales han incrementado el interés en espectroscopía de RMN en una y dos dimensiones como método rutinario de análisis de mezclas complejas.

Existen dos estrategias para analizar mezclas mediante RMN:

- a) Separar los componentes de la mezcla antes del análisis.
- b) Analizar simultáneamente todos los componentes de la mezcla.

La primera estrategia se utiliza cuando el objetivo es la caracterización de un compuesto aislado. La segunda estrategia permite obtener una idea general de la muestra sin necesidad de darle un pretratamiento más que para solubilizarla en disolventes deuterados adecuados. Los espectros que de ahí se obtienen se pueden considerar como el perfil químico de los compuestos orgánicos principales contenidos en los productos estudiados. Por la cantidad de información obtenida, se requiere del uso de herramientas basadas en técnicas de análisis estadístico multivariable para analizarlos.^{46,47}

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

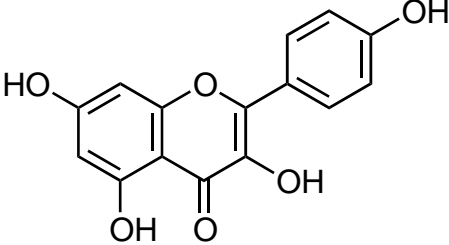
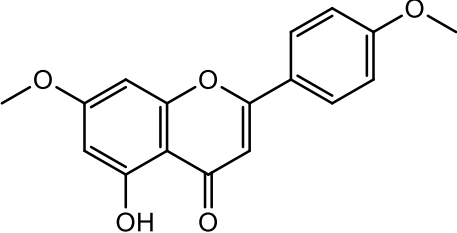
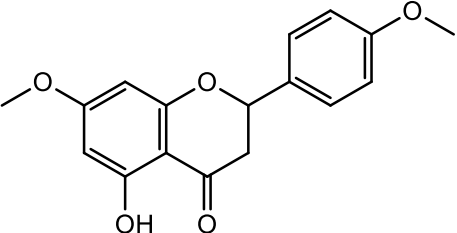
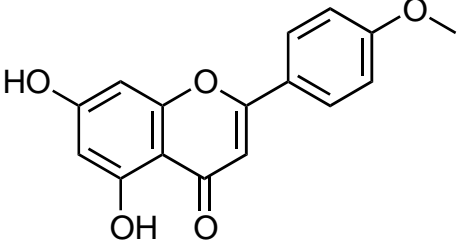
5.1 Materiales y preparación de las muestras

Se utilizaron para su estudio 59 muestras de propóleo provenientes de apiarios ubicados en distintas zonas melíferas del país. Las muestras fueron recolectadas entre los años de 2011 y 2016 por personal del Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las muestras recolectadas se secaron y conservaron en congelación hasta el momento de su extracción. Cada muestra fue sometida a un proceso de extracción por maceración con etanol como disolvente por un periodo de una semana. De cada extracto etanólico de propóleo (EEP) se pesaron alrededor de 8 mg y se disolvieron en 3.0 mL de una mezcla⁴⁸ de etanol (J.T. Baker, grado HPLC, 99.90% de pureza) y acetonitrilo (Honeywell, grado HPLC, 99.99% de pureza) (1:1). Las muestras que no se disolvieron con facilidad se sonicaron durante 10 minutos en un equipo de limpieza por ultrasonido (Branson 2510) con un baño de agua a temperatura ambiente. A partir de estas disoluciones se tomaron diferentes volúmenes para cada uno de los análisis correspondientes.

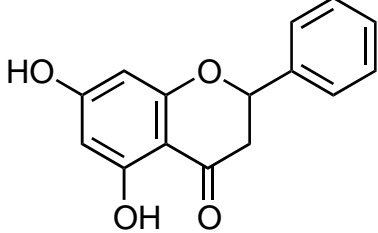
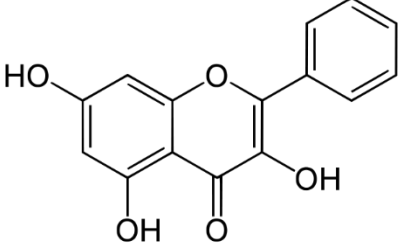
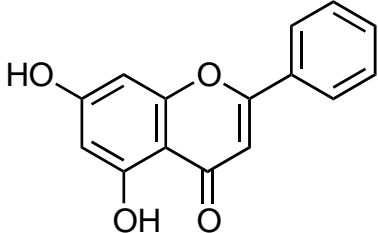
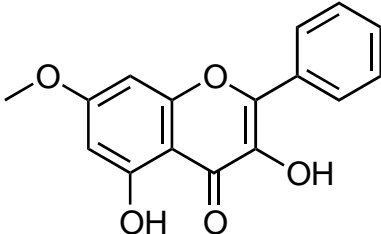
5.2 Preparación de estándares para el análisis por HPLC-UV-ESI-MS

Se utilizaron 22 estándares de compuestos potencialmente presentes en las muestras de análisis de propóleo. Algunos de estos estándares fueron obtenidos por el grupo de investigación del Dr. Fausto Rivero a partir del fraccionamiento y purificación previos de varias muestras de propóleo de diversas zonas del país y otros fueron adquiridos comercialmente. Al igual que las muestras, los estándares se disolvieron en una mezcla de etanol:acetonitrilo (1:1). Después de ello, tanto las muestras como los estándares se filtraron con acrodiscos (Agilent) con membrana de nylon y un tamaño de poro de 0.45 μm y se mantuvieron en refrigeración a -18 °C hasta su inyección en el equipo de HPLC-MS.

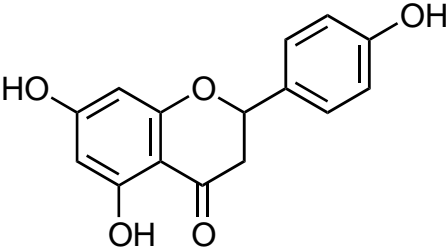
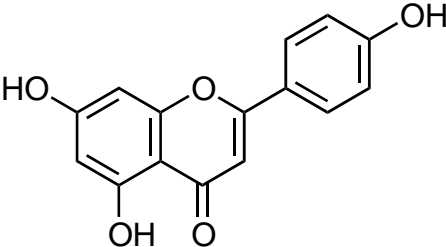
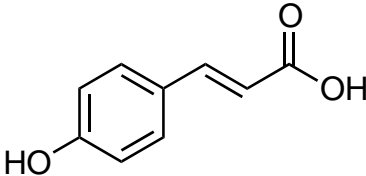
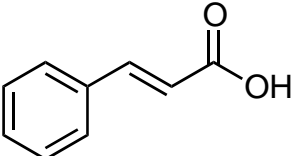
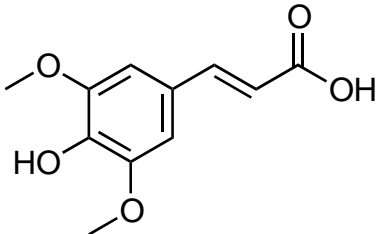
Cuadro 2. Estándares utilizados para el análisis por HPLC-MS.

Clave	Estándar	Masa molecular (g/mol)
E01	Kaempferol 	286.05
E02	4',7-di-O-metilapigenina 	298.08
E03	4',7-di-O-metilnaringenina 	300.1
E04	Acacetina 	284.07

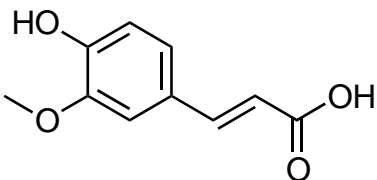
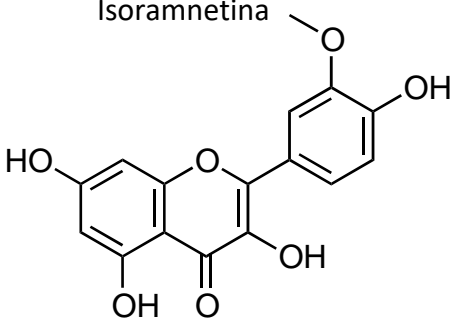
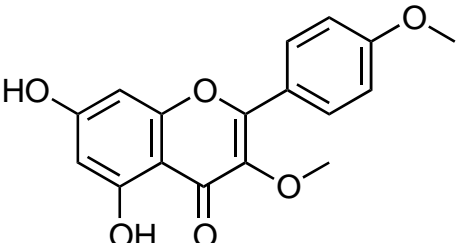
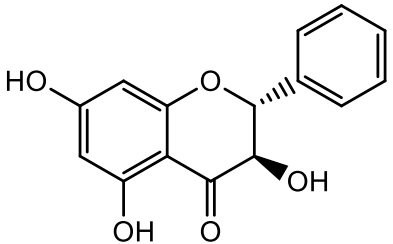
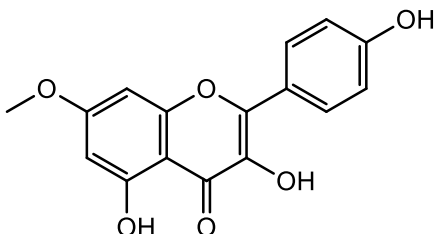
Cuadro 2. Estándares utilizados para el análisis por HPLC-MS (continuación).

Clave	Estándar	Masa molecular (g/mol)
E05	<p style="text-align: center;">Pinocembrina</p> 	256.07
E06	<p style="text-align: center;">Galangina</p> 	270.05
E07	<p style="text-align: center;">Crisina</p> 	254.06
E08	<p style="text-align: center;">Izalpinina</p> 	284.07

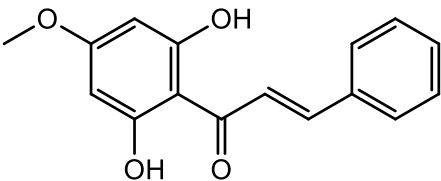
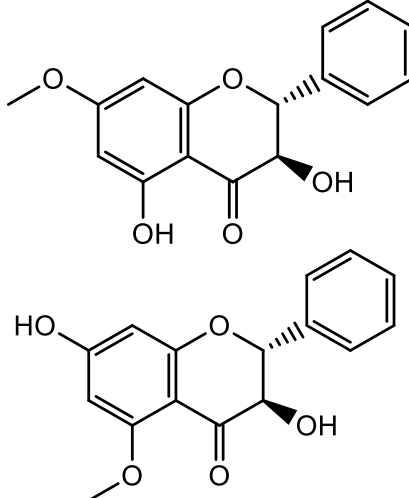
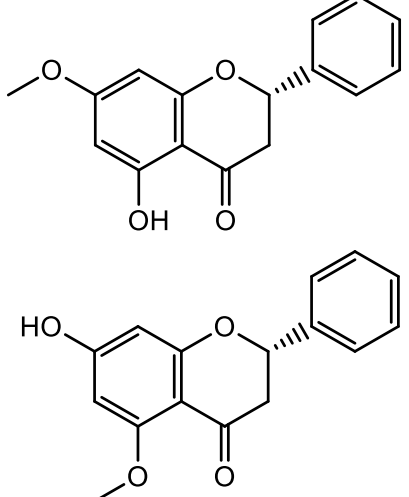
Cuadro 2. Estándares utilizados para el análisis por HPLC-MS (continuación).

Clave	Estándar	Masa molecular (g/mol)
E09	<p>Naringenina</p> 	272.07
E10	<p>Apigenina</p> 	270.05
E11	<p>Ácido p-cumárico</p> 	164.05
E12	<p>Ácido cinámico</p> 	148.05
E13	<p>Ácido sinápico</p> 	224.07

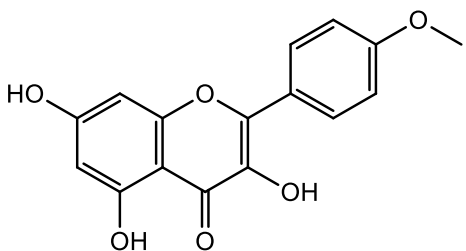
Cuadro 2. Estándares utilizados para el análisis por HPLC-MS (continuación).

Clave	Estándar	Masa molecular (g/mol)
E14	<p>Ácido ferúlico</p> 	194.06
E16	<p>Isoramnetina</p> 	316.06
E17	<p>Ermanina</p> 	314.08
E18	<p>Pinobanksina</p> 	272.10
E19	<p>Ramnocitrina</p> 	300.10

Cuadro 2. Estándares utilizados para el análisis por HPLC-MS (continuación).

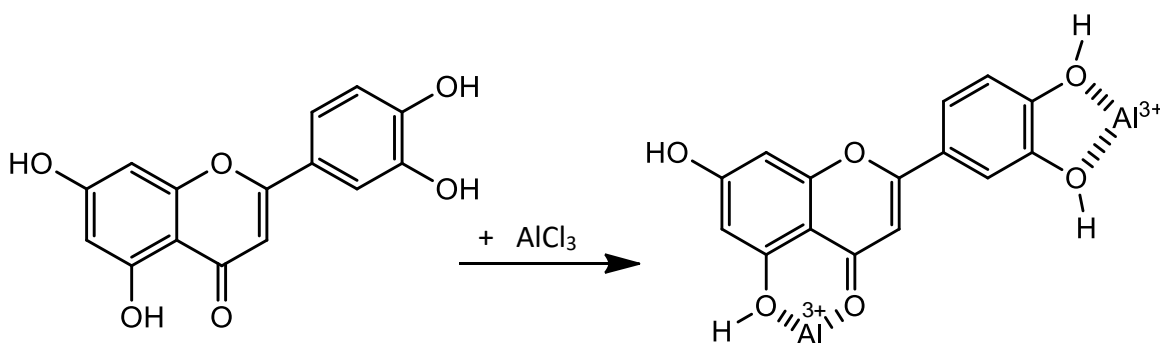
Clave	Estándar	Masa molecular (g/mol)
E20	<p>Chalcona de pinostrobin</p> 	270.13
E23A	<p>Alpinona o 5-metilpinobanksina</p> 	286.12
E23B	<p>Pinostrobin o Alpinetina</p> 	270.13

Cuadro 2. Estándares utilizados para el análisis por HPLC-MS (continuación).

Clave	Estándar	Masa molecular (g/mol)
E24	<p>Kaempferide</p> 	300.10

5.3 Determinación del contenido de flavonoides

Para esta cuantificación se utilizó un procedimiento modificado^{49,50} en el que ocurre la reacción de complejación entre flavonoides y sales de aluminio. Aquí, el catión metálico interactúa con los átomos de oxígeno de los hidroxilos y del grupo carbonilo según la siguiente reacción:

**Figura 5.** Reacción entre flavonoides y sales de aluminio.⁵¹

Las moléculas de flavonoides pueden interactuar con 1, 2 o 3 iones de Al^{3+} para formar complejos 1:1, 1:2 o 1:3, respectivamente. Los flavonoides que pueden actuar como ligandos tienen sustituciones 5- o 3-hidroxi-4-ceto y/o grupos orto-dihidroxi, formando complejos estables con el aluminio los primeros y complejos lábiles los últimos.³⁸ Los quelatos metal-flavonoide, por lo general, presentan color. En presencia de iones metálicos, normalmente se observa un desplazamiento

batocrómico en los máximos para las bandas de absorción I y II en el espectro UV-Vis de los flavonoides. ¹⁵

5.3.1 Curva de calibración

Se preparó para la curva de calibración una disolución de quercetina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 2.02 mg/mL en etanol y una disolución de AlCl_3 (J.T. Baker) al 2% (m/V) en etanol. Se utilizó una placa de 96 pozos para realizar esta prueba. En los pozos de las columnas 2 a la 12 se colocaron 100 μL de etanol y tanto a la columna 1 como a la 2 se agregaron 100 μL de la disolución de quercetina. A partir de la columna 2, se realizaron diluciones seriadas con una pipeta multicanales (Brand Transferpette-8), de tal manera que se obtuvieran 11 concentraciones diferentes de quercetina y una columna se utilizó como blanco. Posteriormente, se agregaron 100 μL de la disolución de AlCl_3 a todos los pozos, quedando 200 μL totales en cada uno de ellos. Después de esperar 15 minutos, se utilizó un lector de placas de 96 pozos Epoch (BioTek) para tomar las lecturas de absorbancia a una $\lambda = 420 \text{ nm}$. Con los resultados se graficó la curva de calibración y se determinó el intervalo lineal.

5.3.2 Muestras de propóleo

Para conocer el volumen apropiado de muestra que debe tomarse se realizaron pruebas preliminares, de manera que los resultados de éstas se encontraran en el intervalo lineal de la curva de calibración. Se probaron tres de las disoluciones de extractos de propóleo preparadas en el apartado 5.1 con volúmenes de 10, 50 y 100 μL , encontrando que los mejores resultados se obtenían utilizando 10 μL . Se colocaron entonces 90 μL de etanol en todos los pozos y, posteriormente, 10 μL de muestra de propóleo (a una concentración de $\sim 8 \text{ mg/mL}$) en cada uno de ellos. En seguida, se agregó la disolución de AlCl_3 y se esperó el tiempo requerido. Se utilizaron cuatro pozos por cada muestra y en total se analizaron 59 muestras.

Después, se interpolaron los resultados en la curva de calibración para obtener la concentración de flavonoides y se correlacionaron con la masa original del extracto.

5.4 Determinación del contenido de fenoles totales

Para esta prueba se utilizó un método basado en la reacción de compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu,^{52,53} que consiste en una mezcla de tungstato de sodio, molibdato de sodio y otros reactivos. Al reaccionar con fenoles, adquiere un color azul cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de fenoles presentes y que se mide espectrofotométricamente en alrededor de 760 nm. La reacción se lleva a cabo a un pH cercano a 10, que se logra con carbonato de sodio. Debido a su complejidad, tanto la naturaleza exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu como la de la reacción química involucrada en la generación del compuesto azul (posiblemente $\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}^{4-}$) son desconocidas.⁵⁴

5.4.1 Curva de calibración

Se preparó una disolución de ácido gálico (Sigma-Aldrich) a una concentración de 790 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se realizaron diluciones seriadas en una placa de 96 pozos de manera similar a como se describe en el punto 5.3.1. A cada pozo que contenía 100 μL de la disolución correspondiente de ácido gálico se agregaron 20 μL de una disolución de Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma-Aldrich) y se dejó que la placa permaneciera durante 5 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 80 μL de una disolución de Na_2CO_3 al 8% (m/V) y se mantuvo la placa en la oscuridad durante una hora, al cabo de la cual se leyó su absorbancia a una $\lambda = 760$ nm.

5.4.2 Muestras de propóleo

Se realizaron pruebas preliminares para determinar el volumen adecuado a utilizar de las muestras, y como el volumen resultó ser muy bajo se decidió diluirlas. Se tomaron 20 μL de cada muestra de propóleo y se diluyeron en 380 μL de agua

desionizada. De estas nuevas disoluciones, se tomaron por triplicado 100 μL y se colocaron en los pozos de las placas. Después, se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu y la disolución de Na_2CO_3 de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 5.4.1. Después de permanecer 1 hora en la oscuridad, se leyó su absorbancia a 760 nm. Se interpolaron los resultados en la curva de calibración y se correlacionó el contenido de fenoles totales con la masa de cada extracto de propóleo.

5.5 Determinación de la actividad antioxidante utilizando la prueba de blanqueamiento de DPPH \cdot

Para esta prueba se siguió un procedimiento adaptado^{24,40,55} en el que se hicieron reaccionar los flavonoides presentes en las muestras de propóleo con el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH \cdot) (Sigma-Aldrich) según la reacción indicada en la Figura 6.

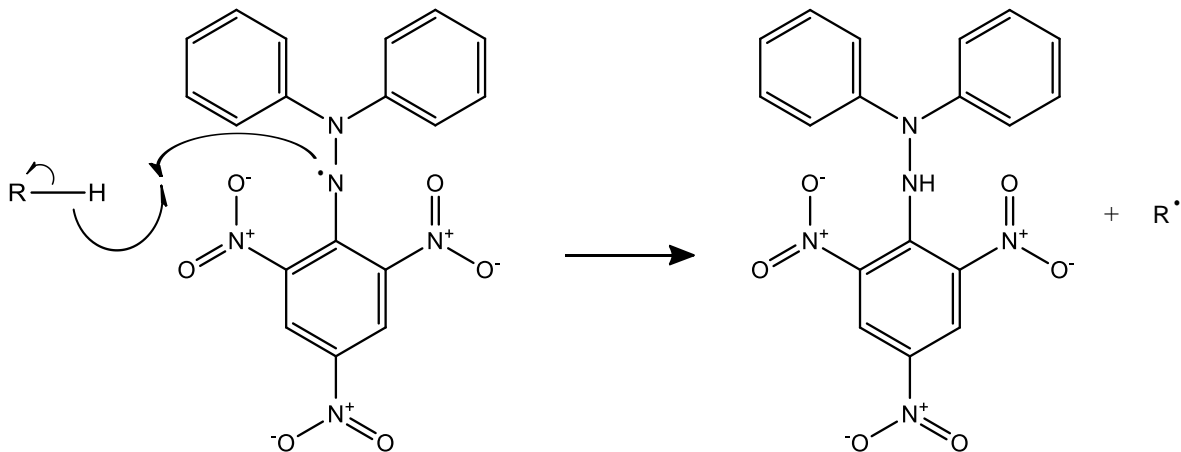


Figura 6. Reacción entre DPPH \cdot y un antioxidante donador de hidrógeno.

(R-H = antioxidante)

La disolución de DPPH[·] es de un color violeta intenso. Al reaccionar con un antioxidante pierde su color y se mide el decremento de la absorbancia a 515 nm, que se correlaciona con el poder de captura de radicales libres que poseen dichos compuestos antioxidantes. Este poder de captura depende de la habilidad del antioxidante para donar electrones o átomos de hidrógeno. En el caso de los flavonoides, éstos reaccionan donando un átomo de hidrógeno al DPPH[·], reduciéndolo al reaccionar con el electrón no apareado que posee y convirtiéndolo a su forma amarillenta no radicalaria (DPPH-H).²⁶

5.5.1 Curva de calibración

Se preparó una disolución de DPPH[·] a una concentración de 0.208 mM y se utilizó una disolución de Trolox (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.36 mg/mL en metanol. Para esta prueba, también, se utilizaron placas de 96 pozos. Como se describe en la sección 5.3.1 se realizaron diluciones seriadas de la disolución de Trolox y se adicionaron 100 μ L de la disolución de DPPH[·]. Se dejaron las últimas dos columnas como blanco de la disolución de Trolox y control de la de DPPH[·]. Luego de agregar el DPPH[·] se guardó la placa en un sitio oscuro y se dejaron transcurrir 15 minutos. Al término de este tiempo, se tomaron las lecturas de absorbancia a una $\lambda = 515$ nm.

Se realizó una segunda curva de calibración de la misma forma que la primera, sólo que utilizando en las columnas 1 y 2, 75 μ L de Trolox y 25 μ L de metanol en lugar de los 100 μ L de Trolox. Esto se hizo para partir de una concentración diferente e incrementar los puntos en la curva de calibración final para generar una mejor distribución.

Finalmente, se analizaron conjuntamente los resultados de ambas curvas de calibración y se determinó el intervalo lineal para calcular la ecuación de la recta de regresión lineal.

5.5.2 Muestras de propóleo

De la misma manera que para la determinación de flavonoides, se tomaron diferentes volúmenes de tres muestras de propóleo para encontrar la concentración apropiada cuyos valores finales de absorbancia cayeran dentro del intervalo lineal de la curva de calibración. Se observó que un volumen de 10 μL era el adecuado y por ello se colocaron en los pozos de las placas 90 μL de metanol y 10 μL de disolución de extracto de propóleo. Después, se agregaron 100 μl de la disolución de DPPH \cdot y se colocaron en la oscuridad durante 15 minutos, al cabo de los cuales se leyó su absorbancia. Cada una de las muestras se colocó por cuadruplicado y cada placa contó con blancos de Trolox y de DPPH \cdot . Finalmente, los resultados se interpolaron en la curva de calibración y se realizaron los cálculos para determinar el contenido de equivalentes de Trolox por gramo de extracto.

5.6 Análisis mediante HPLC-UV-ESI-MS

5.6.1 Desarrollo del método de HPLC

Para desarrollar el método de separación por HPLC, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent de la serie 1100 con un detector de arreglo de diodos y una columna Waters X-Bridge de fase reversa (C-18) de 50 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil consistió en un sistema binario de agua (Milli-Q Reference) con 0.1% de ácido fórmico (Riedel-de Haën), que fue la fase A, y para la fase orgánica (fase B) se probaron metanol (LiChrosolv, grado HPLC, 99.8% de pureza) con 0.1% de ácido fórmico y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico. Para acidificar las fases, se probó también el uso de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich) en lugar del ácido fórmico, pero se observó que esto reducía y, en algunos casos, suprimía los iones observados en el espectro de masas, por lo que se optó por continuar con el uso del ácido fórmico. Se utilizó un programa de elución por gradiente para optimizar la separación y el tiempo de análisis.

Se realizaron varias pruebas con algunas muestras de propóleo, principalmente con aquellas que mostraban un mayor número de señales en su espectro UV a 254 y 290 nm y el gradiente de elución se modificaba para mejorar la separación. Para el mismo fin, se probaron diferentes valores para el flujo de la fase móvil (0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL/min) y diferentes temperaturas de la columna (25 y 30 °C).

Después, se utilizó un cromatógrafo Agilent 1290 Infinity con detector UV acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y analizador de masas de cuadrupolo y tiempo de vuelo, modelo 6530 Accurate-Mass Q-TOF. En este nuevo equipo se empleó una columna Thermo ODS Hypersil de 125 mm de largo por 4.6 mm de diámetro interno y con fase estacionaria C-18 de tamaño de partícula de 3 µm. Se realizaron algunos ajustes al método para compensar los cambios producidos por el uso de una columna distinta.

Después de probar las distintas combinaciones de los parámetros cromatográficos, se llegaron a los siguientes valores que optimizaron la separación de los componentes y el tiempo de análisis:

- Fase móvil A: agua con 0.1% de ácido fórmico
- Fase móvil B: metanol con 0.1% de ácido fórmico
- Flujo de la fase móvil: 0.8 mL/min
- Temperatura de la columna: 25 °C
- Gradiente de elución: el descrito en el Cuadro 3

Cuadro 3. Gradiente de elución cromatográfica.

Tiempo (min)	% Fase B
0	40
25	60
40	80
50	100
52	100
55	40
60	40

5.6.2 Ajuste de los parámetros de ionización

Para determinar las condiciones óptimas de ionización, se preparó una disolución de crisina (Sigma-Aldrich) con una concentración de 10.8 $\mu\text{g/mL}$. Con esta disolución, se realizaron infusiones directas al espectrómetro de masas y se variaron algunas condiciones del equipo para maximizar la señal de respuesta. Las variables que se modificaron fueron: temperatura del gas de secado, voltaje del capilar, voltaje de la boquilla y el voltaje del fragmentor.

Para los parámetros de ionización se probaron diferentes valores de cada uno de ellos y se llegó al resultado del Cuadro 4.

Cuadro 4. Parámetros de ionización para el análisis ESI-MS.

Parámetro	Valor
Temperatura del gas de secado	350 °C
Voltaje del capilar	2500 V
Voltaje de la boquilla	100 V
Voltaje del fragmentor	175 V

Una vez optimizadas las condiciones de ionización, se inyectó una muestra por triplicado y se evaluó la repetibilidad de los resultados mediante la inspección visual de los cromatogramas superpuestos. Se observó que la repetibilidad era adecuada para los análisis.

5.6.3 Inyección de estándares

Se prepararon disoluciones de 22 estándares de la manera descrita en la sección 5.1 y se inyectaron 20 μL de cada uno de ellos en el equipo de HPLC-MS. Cada estándar se inyectó dos veces para así obtener los espectros de los iones positivos y negativos de todos ellos.

Estas inyecciones se realizaron con las condiciones descritas en los Cuadros 3 y 4 y así se determinó el tiempo de retención que cada uno de ellos presentaba en el sistema. Con esta información y con la masa de los compuestos, se creó el Cuadro 5, que se usó como base de datos en el programa MZMine 2 para identificarlos en las muestras.

Cuadro 5. Valores de tiempo de retención y m/z usados para la identificación de compuestos de referencia en las muestras.

Clave	Nombre del estándar	Tiempo de retención (min)	Masa (g/mol)	m/z (+)	m/z (-)
E01	Kaempferol	19.70	286.05	287.0905	285.0765
E02	4',7-di-O-metilapigenina	39.50	298.08	299.1364	297.1224
E03	4',7-di-O-metilnaringenina	34.58	300.1	301.1496	299.1356
E04	Acacetina	30.94	284.07	285.1106	283.0966
E05	Pinocembrina	24.79	256.07	257.1123	255.0983
E06	Galangina	30.50	270.05	271.098	269.084
E07	Crisina	29.15	254.06	255.1039	253.0899
E08	Izalpinina	40.29	284.07	285.1086	283.0946
E09	Naringenina	13.58	272.07	273.1079	271.0939
E10	Apigenina	20.26	270.05	271.0924	269.0784
E11	Ácido <i>p</i> -cumárico	5.09	164.05	165.0801	163.0661
E12	Ácido cinámico	12.79	148.05	149.0776	147.0636
E13	Ácido sinápico	5.54	224.07	225.1054	223.0914
E14	Ácido ferúlico	5.25	194.06	195.0931	193.0791
E16	Isoramnetina	22.50	316.06	317.1008	315.0868
E17	Ermanina	32.60	314.08	315.129	313.115
E18	Pinobanksina	13.79	272.10	273.1099	271.0959
E19	Ramnocitrina	32.00	300.10	301.1057	299.0917
E20	Chalcona de pinostrobina	33.08	270.13	271.1330	269.1190
E23A	Alpinona	12.30	286.12	287.1283	285.1143
E23B	Pinostrobina	18.67	270.13	271.1372	269.1232
E24	Kaempferide	34.40	300.10	301.1051	299.0911

Además de la búsqueda de iones moleculares $[M]^+$, se consideraron también los posibles aductos⁵⁶ para cada uno de los compuestos de referencia y éstos se enlistan en los Cuadros 6 y 7.

Cuadro 6. Tipos de iones detectados en el modo de ionización positiva.

Aductos	Diferencia en uma del [M] ⁺
[M+H] ⁺	+1.007
[M+Na] ⁺	+22.9892
[M+CH ₃ OH + H] ⁺	+33.0335
[M+K] ⁺	+38.9632
[M+H+ACN] ⁺	+42.0338
[M+2Na-H] ⁺	+44.9711
[M+ACN+Na] ⁺	+64.0158
[M+2K+H] ⁺	+76.9190
[M+H+2ACN] ⁺	+83.0604
[M+H-H ₂ O] ⁺	-17.0044

Cuadro 7. Tipos de iones detectados en el modo de ionización negativa.

Aductos	Diferencia en uma del [M] ⁺
[M-H] ⁻	-1.007
[M-H ₂ O-H] ⁻	-19.0184
[M+Na-2H] ⁻	+20.9747
[M+Cl] ⁻	+34.9694
[M+K-2H] ⁻	+36.9486
[M+HCOOH-H] ⁻	+44.9982
[M+Br] ⁻	+78.9189
[M-H-CO ₂] ⁻	-45.0058

5.6.4 Inyección de las muestras

Para lograr un mejor equilibrio entre la cantidad de datos generados y la información potencialmente útil, se buscó reducir el número de muestras a analizar. Para ello, se consideraron los resultados de la prueba de cuantificación de flavonoides, pues estos son los compuestos de principal interés. Se descartaron las muestras con la menor cantidad de flavonoides y aquellas en las que no se detectó su presencia, quedando 40 de las 59 muestras originales. Se inyectaron 20 µL de estas 40 muestras en el equipo de HPLC-MS. Cada inyección se realizó por duplicado para obtener el espectro de ionización por electrospray en sus modalidades positiva y

negativa de cada una de las muestras. Para cada muestra, también, se consideraron los aductos mencionados en los Cuadros 6 y 7.

5.6.5 Procesamiento de resultados

Los cromatogramas de UV y los espectros de masas obtenidos como resultado de las pruebas se exportaron utilizando el software MassHunter que controla al equipo de HPLC-MS. Los espectros de masas se trabajaron con el software MZMine 2. Para utilizar este software, primero se elaboró una base de datos con la información del tiempo de retención y el ion característico de cada uno de los estándares. Después, se utilizó esta base de datos para encontrar correspondencias en los espectros de masas de las muestras de propóleo y poder así identificar la presencia de dichos compuestos. Este procedimiento se realizó para los espectros de ionización positiva y para los de ionización negativa.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación del contenido de flavonoides

La primera determinación química que se realizó a los EEP fue la de su contenido de flavonoides totales, ya que a estos productos naturales se les atribuyen las propiedades medicinales descritas para los propóleos. Por otra parte, el contenido de flavonoides se utiliza como parámetro de calidad en las normas internacionales.⁵⁷ Como primer paso, se realizó una curva de calibración con quercetina en un intervalo de concentraciones desde 0.001 mg/mL hasta 1 mg/mL. Los resultados se graficaron y se encontró que el intervalo lineal de esta curva se localizaba entre 0.001 y 0.125 mg/mL. En la Figura 7 se ilustra la curva de calibración para los flavonoides y la ecuación de la recta correspondiente.

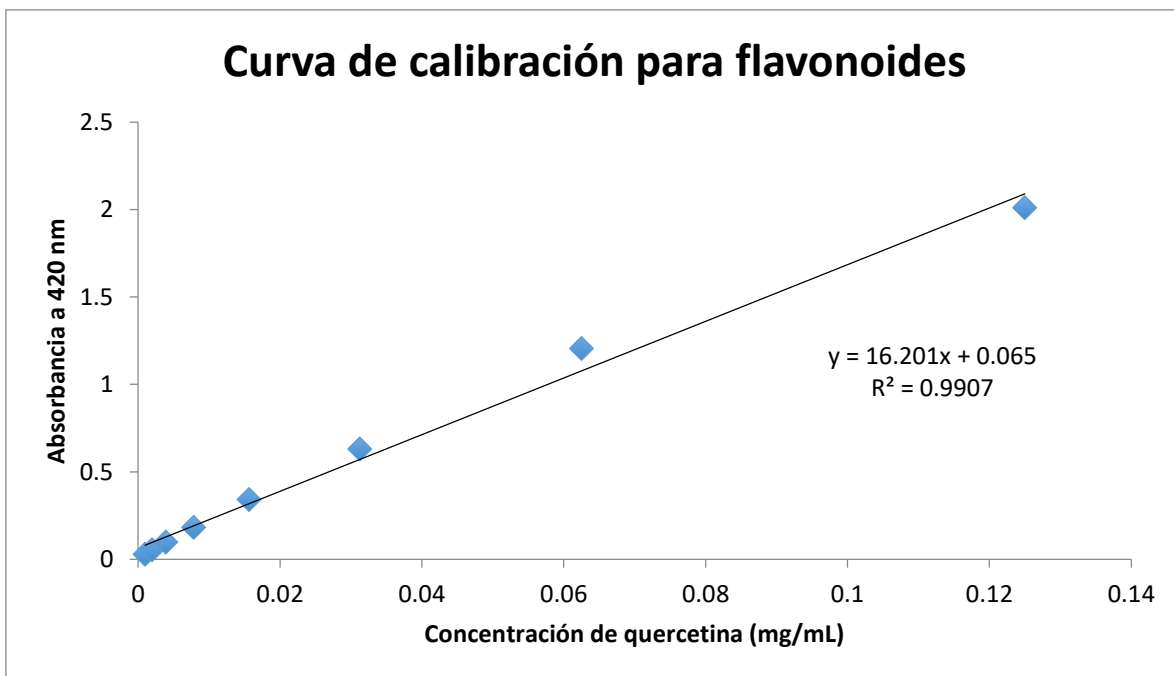


Figura 7. Curva de calibración para la determinación de flavonoides.

Las muestras se analizaron utilizando las condiciones descritas para la curva patrón, se interpolaron sus absorbancias en la curva de calibración y se observó que todas

ellas se encontraban dentro del intervalo lineal. Posteriormente, se correlacionó la concentración de la disolución de cada uno de los extractos de propóleo con la masa de propóleo utilizada para prepararla y se calculó la concentración de flavonoides presente en cada gramo de extracto. Estos resultados se muestran en el Cuadro 8.

En los resultados obtenidos, se observa que existen marcadas diferencias en la cantidad de flavonoides encontrados, incluso entre muestras del mismo lugar de recolección, pero de diferentes años. Los resultados sugieren que en estas zonas la variabilidad de las condiciones climáticas que se presentan en los diferentes años juega un papel importante en la disponibilidad de fuentes vegetales que las abejas pueden utilizar para la recolección de resinas y otros elementos que emplean para la elaboración del propóleo.

Por otra parte, es importante mencionar que solamente una muestra del apiario Valentín (F54) es la única de entre las que se detectaron flavonoides que no cumple con el contenido mínimo establecido por las normas mexicana y brasileña, que es de 5 mg equivalentes de quercetina por gramo de EEP ($\text{mg}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{EEP}}$).⁵⁷ Esto quiere decir que de las 59 muestras analizadas, 45 de ellas cumplen con este criterio de calidad. El intervalo de concentraciones de flavonoides observado en las muestras va desde cantidades no detectables hasta 193.4 $\text{mg}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{EEP}}$.

Es relevante destacar que de las muestras mexicanas, las del apiario de Álamo Blanco (F10, F24 y F56) –ubicado en Valsequillo, Puebla– muestran contenidos consistentemente elevados de flavonoides. Esto contrasta con los datos obtenidos para la muestra de Cuetzalan, Puebla (F26), ya que no se detectaron flavonoides en esa muestra. Esto podría explicarse por el hecho de que esta muestra de propóleo fue la única de geopropóleo producido por abejas meliponas, cuyos productos apícolas presentan una composición diferente a los de las abejas *Apis mellifera*.^{14,24,58}

Por otra parte, las muestras provenientes del apiario Don Nico (F05, F08, F16, F21, F40, F45, F47, F48, F55) ubicado en Topilejo, Delegación Tlalpan, CDMX, presentaron también una gran cantidad de flavonoides aunque la variabilidad de los

resultados de este apiario fue alta, como se resume en el Cuadro 8. De las muestras obtenidas provenientes de otras regiones del país, la de la Comarca Lagunera (F59) y la de Chihuahua (F57) presentaron resultados elevados en esta prueba, a comparación de los valores intermedios que dieron los de Zacatecas (F14 y F58) y Guanajuato (F36 y F46), éstos últimos con menor variabilidad.

De las muestras de otros países, los propóleos chinos (F07 y F15) son los que más flavonoides contienen, superando incluso a todas las muestras mexicanas. Los propóleos chinos, al igual que los mexicanos, son considerados propóleos de climas templados (tipo I)¹² y, por ello, es que la comparación entre ellos puede ser más directa. Con estas consideraciones, se puede decir que los propóleos provenientes de ese país son potencialmente de buena calidad. Por otro lado, en el propóleo de Ecuador no se detectaron flavonoides, lo que sugiere que es de baja calidad o que proviene de una zona en la que las distintas variedades de álamo no son la principal fuente vegetal utilizada por las abejas.

6.2 Determinación del contenido de fenoles totales

Para esta prueba se realizó una curva de calibración con disoluciones de ácido gálico que iban desde 0.19 $\mu\text{g/mL}$ hasta 49.4 $\mu\text{g/mL}$. Se encontró que el intervalo lineal se ubicaba entre 0.19 y 24.7 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8).

Utilizando la Norma Oficial Mexicana como referencia, en la que se establece que el contenido mínimo de fenoles totales en muestras de EEP es de 50 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de EEP ($\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{EEP}}$),⁶ se observa que de las 59 muestras analizadas solamente 35 cumplen con esta especificación. Los fenoles totales se encontraron en un intervalo de entre 8.8 y 270.8 $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{EEP}}$.

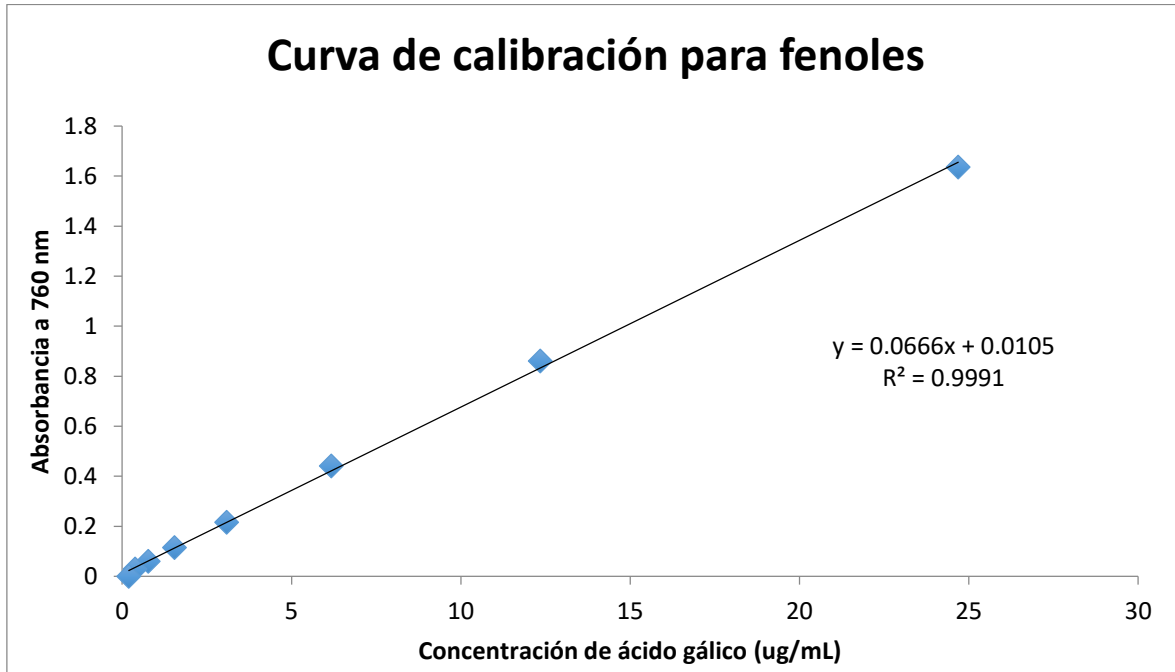


Figura 8. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.

En concordancia con los resultados obtenidos en la prueba de flavonoides totales, las muestras que presentaron el mayor contenido fenoles totales de manera consistente fueron las del apiario Álamo Blanco (F56, F24 y F10) y constituyen tres de las cinco más altas. La muestra de Cuetzalan (F26) que proviene del mismo estado fue de las que tuvo una de las menores concentraciones. Esta diferencia en la composición puede atribuirse principalmente a la vegetación de la zona geográfica y a la especie de abeja que elaboró el propóleo.

Para las muestras del resto del país, la de la Comarca Lagunera (F59) y la de Chihuahua (F57) presentan valores elevados de fenoles totales, mientras que las de Guanajuato (F36 y F46) y Zacatecas (F14 y F58) dieron valores intermedios. De manera similar a los resultados de flavonoides, las muestras de Zacatecas tuvieron una variabilidad mucho más elevada que las de Guanajuato.

Para apiarios ubicados en la CDMX, los que dieron muestras con mejores resultados fueron Don Nico (muestras F21, F47, F05 y F48), Búho (muestras F22, F09, F44 y F03) y Panteón Colmena (muestras F41, F42 y F33). Sin embargo, la

variabilidad en cada uno de ellos es alta, pues todos presentan muestras con contenidos de compuestos fenólicos bajos e insuficientes para cumplir con las normas de México y de Brasil. Al igual que para la determinación anterior, estas diferencias pueden explicarse por las diferencias climáticas anuales y a que las colmenas se encuentran cerca de zonas urbanas, lo que es una fuente adicional de variabilidad por la contaminación generada y otras actividades humanas.

Otro elemento que puede contribuir a la variabilidad de los resultados es el método que fue utilizado para recolectar el propóleo, pues se ha visto que éste es un factor que afecta la concentración de compuestos fenólicos en sus extractos.⁵⁹ Se ha observado que el método que produce el mejor propóleo es el de cuñas de madera y que los métodos de raspado y mallas de plástico dan resultados similares. Sin embargo, a diferencia de lo descrito en la literatura, algunas muestras no siguen esta tendencia, pues algunos de los propóleos (F12, F21, F47) con elevados contenidos de fenoles y flavonoides fueron recolectados con mallas, mientras que otras muestras (F13, F26, F27) con contenidos bajos de estos compuestos se recolectaron con el método de raspado.

6.3 Determinación de la capacidad antioxidante

En esta prueba se probaron concentraciones desde 0.00026 mg/mL hasta 0.18 mg/mL de Trolox y se encontró que el intervalo lineal se ubica entre 0.0003 y 0.0084 mg/mL. En este caso, la recta de la regresión lineal cuenta con una pendiente negativa, que refleja el hecho de que a mayor concentración de antioxidantes, menor concentración de la forma radicalaria de DPPH[·] y, por tanto, menor absorbancia a esa longitud de onda. Este comportamiento se ilustra en la Figura 9.

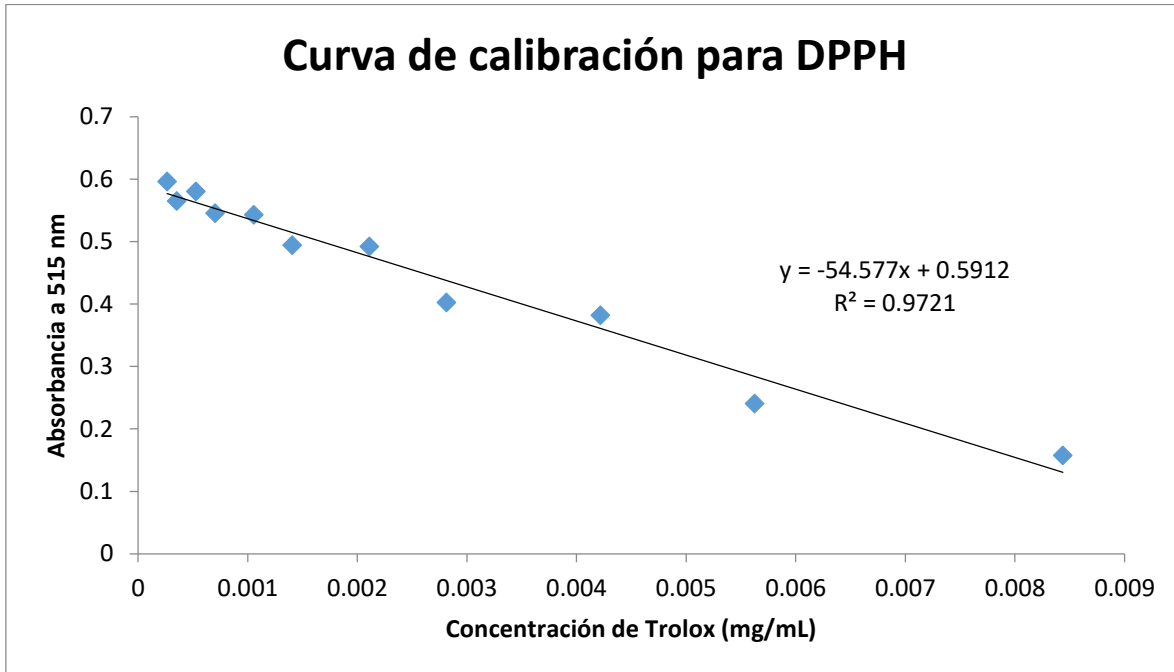


Figura 9. Curva de calibración para la determinación de capacidad antioxidante.

El intervalo para la capacidad antioxidante se encontró entre 5.5 y 77.5 miligramos equivalentes de Trolox por gramo de EEP ($\text{mg}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{EEP}}$). Los mejores propóleos mexicanos en esta prueba fueron los provenientes de los apiarios Nico (F47, F05, F45, F21 F48 y F40) y Álamo Blanco (F24, F56 y F10). En general, los EEP de la Ciudad de México presentaron una mayor concentración de $\text{mg}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{EEP}}$ que los del interior de la República, con la excepción de los ya mencionados de Álamo Blanco (Puebla), Comarca Lagunera (F59) y uno de Zacatecas (F14), que se encuentran intercalados. Los propóleos de Guanajuato presentan contenidos relativamente bajos y muy similares de $\text{mg}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{EEP}}$. El que presentó el menor contenido fue uno de Tlaxcala (F04), aunque en esta muestra se utilizó diclorometano para su extracción, lo que explica que haya presentado resultados bajos en ésta y en el resto de las pruebas. Aparte de este último, dos muestras de EEP del apiario Búho (F17 y F49) son las que presentan los resultados más bajos.

De los propóleos de otros países, los chinos (F15 y F07) dieron resultados altos, por encima de 50 $\text{mg}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{EEP}}$, ubicándose dentro de los diez mejores. Esto contrasta con el propóleo de Ecuador (F18) que dio solamente 14 $\text{mg}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{EEP}}$.

6.4 Comparación de contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante

En general, los EEP presentaron resultados consistentes en las diferentes pruebas, mostrando buena capacidad antioxidante cuando su contenido de fenoles totales y flavonoides fue alto y lo contrario para cuando estos valores fueron bajos. No obstante, algunas muestras presentaron marcadas diferencias respecto a esta tendencia. Una de ellas es la muestra de Chihuahua (F57), que mostró contenidos elevados de fenoles y flavonoides pero su actividad antioxidante fue baja, tanto en $\text{mg}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{EEP}}$ como en porcentaje de DPPH^{\cdot} capturado. Una posible causa de esto es que los compuestos fenólicos que contiene no donan con tanta facilidad un radical H^{\cdot} como el ácido gálico, por lo que aunque están presentes no son capaces de neutralizar en la misma proporción al DPPH^{\cdot} .²⁷

El caso contrario ocurre con muestras del apiario Trojes (F32) y Nico (F45), en las que el contenido de flavonoides es bajo, el de fenoles totales es intermedio pero su contenido de $\text{mg}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{EEP}}$ y porcentaje de DPPH^{\cdot} capturado son de los más elevados. En estos casos, es posible que en su composición existan otros compuestos antioxidantes como la vitamina E y terpenoides (carotenoides)¹⁶ y que la estructura de los compuestos fenólicos permita una donación más eficiente de radicales H^{\cdot} .

Algunas muestras dieron resultados mixtos, como una del apiario Valentín (F54). En este caso, el contenido de flavonoides es de los más bajos, el de fenoles totales es intermedio y su capacidad antioxidante guarda una relación similar a la de la mayoría de las demás muestras con respecto a la cantidad de fenoles que contiene.

Las muestras de otros países dieron resultados consistentes en las tres pruebas, con las de China presentando algunos de los resultados más elevados en todas ellas, mientras que la de Ecuador generó unos muy pobres. Si se trata de muestras típicas de esos países, los propóleos chinos cumplen fácilmente con los parámetros de calidad de las normas mexicana y brasileña, mientras que los de Ecuador no lo hacen.

Cuadro 8. Resultados de las determinaciones químicas de las muestras de extracto de propóleo.

Muestras		Flavonoides	Fenoles	DPPH
Clave	Nombre de la muestra	mg_{EQ} / g_{EEP}	mg_{EAG} / g_{EEP}	mg_{ET} / g_{EEP}
F01	Pinotepa	N/D*	25.6	13.2
F02	Israel	9.6	24.5	38.0
F03	Búho	135.7	78.6	41.3
F04	Tlaxcala CH ₂ Cl ₂	N/D	N/D	5.6
F05	Don Nico	52.1	77.1	70.7
F06	Shantal	N/D	8.8	15.1
F07	Chino 2	193.4	140.0	54.1
F08	Granizera Nico 2a colecta	25.1	63.1	47.3
F09	Búho 2011	115.4	113.0	36.7
F10	Álamo Blanco	167.9	148.0	63.8
F11	Panteón Colmena V	40.5	50.1	36.7
F12	Ahira	125.4	72.0	46.7
F13	Pinotepa 1	N/D	32.3	28.0
F14	Zacatecas	103.0	117.6	30.6
F15	Chino 1	171.5	135.1	66.3
F16	Don Gran Nico 3a recolección	37.1	49.5	42.9
F17	Búho 70% EtOH	N/D	N/D	7.9
F18	Ecuador	N/D	14.6	14.1
F19	Búho IV	61.5	69.9	29.9
F20	Trojes Ali	19.1	38.3	23.6
F21	Nico Sombra 1a colecta WRG	167.5	184.9	59.6
F22	Búho 2012	89.4	127.3	36.3
F23	Acuexcomatl	5.2	26.5	15.8
F24	Álamo Blanco	121.7	239.1	76.7
F25	Panteón IX 2a colecta	21.4	48.1	28.1
F26	Cuetzalan	N/D	15.1	16.0
F27	Acuex R2 E. EtOH	N/D	32.9	30.2
F28	Bonilla Sombra VII 3a colecta	N/D	17.5	10.7
F29	Choy partición	N/D	27.8	18.3
F30	Acuexcomatl C 1a colecta	7.6	29.5	18.0
F31	Acuexcomatl 3a muestra Aa	12.9	32.2	38.3
F32	Trojes 4a colecta	10.3	69.4	56.6
F33	Panteón Colmena III	50.0	74.8	47.8

Cuadro 8. Resultados de las determinaciones químicas de las muestras de extracto de propóleo (continuación).

Muestras		Flavonoides	Fenoles	DPPH
Clave	Nombre de la muestra	mg_{EQ} / g_{EPP}	mg_{EAG} / g_{EPP}	mg_{ET} / g_{EPP}
F34	Acuexcomatl 2	8.4	42.8	19.1
F35	Panteón Colmena I 3a muestra	38.9	56.3	31.2
F36	Propóleo Guanajuato	54.4	65.0	25.7
F37	Acuexcomatl 1a colecta AA	17.2	44.9	22.5
F38	Acuexcomatl 2a muestra X	21.7	40.0	29.3
F39	Tlaxcala MeOH	13.4	54.2	21.5
F40	Don Nico 1era colecta	N/D	74.6	49.1
F41	Panteón Colmena I 1a col.	70.4	93.3	38.9
F42	Panteón Colmena I 3a muestra	45.2	82.0	28.4
F43	Acuexcomatl X 3a colecta	42.6	63.4	33.5
F44	Búho	83.7	90.4	33.7
F45	3a Nico Sombra	17.2	61.1	70.5
F46	Guanajuato	65.3	60.7	25.2
F47	Don Nico Sombra	125.5	114.3	77.5
F48	Sombra Nico 2da recolección	112.1	75.7	50.2
F49	Búho 50% EtOH	N/D	36.7	6.5
F50	Valentín 2012	21.2	52.3	46.1
F51	Trojes 2011	16.5	61.4	44.0
F52	Acuex 1	49.7	81.9	37.8
F53	Valentín 2012 B	N/D	29.8	20.1
F54	Valentín EtOH 2011	1.2	64.9	42.4
F55	Don Nico 28-III-2011	8.5	39.1	28.8
F56	Álamo Blanco 1	163.4	270.8	71.0
F57	Chihuahua	142.6	125.3	28.2
F58	Zacatecas 2	21.8	44.7	22.3
F59	Comarca Lagunera	160.5	172.8	41.5

* N/D = No detectado

6.5 Análisis mediante HPLC-UV-ESI-MS

Con las condiciones experimentales optimizadas (Cuadros 3 y 4) se inyectaron los estándares enlistados en el Cuadro 2 y se analizaron las 40 muestras que se seleccionaron por su mayor contenido de flavonoides. Para determinar la presencia de los compuestos de referencia en las muestras, primero se graficó el espectro UV y el cromatograma iónico extraído (EIC) de cada uno de los estándares. Después, para cada muestra se generó el EIC correspondiente al usado para cada uno de los estándares y se observó si existía algún eluato común en las tres gráficas, lo que permitiría identificar al estándar en cuestión (Figuras 10 y 11).

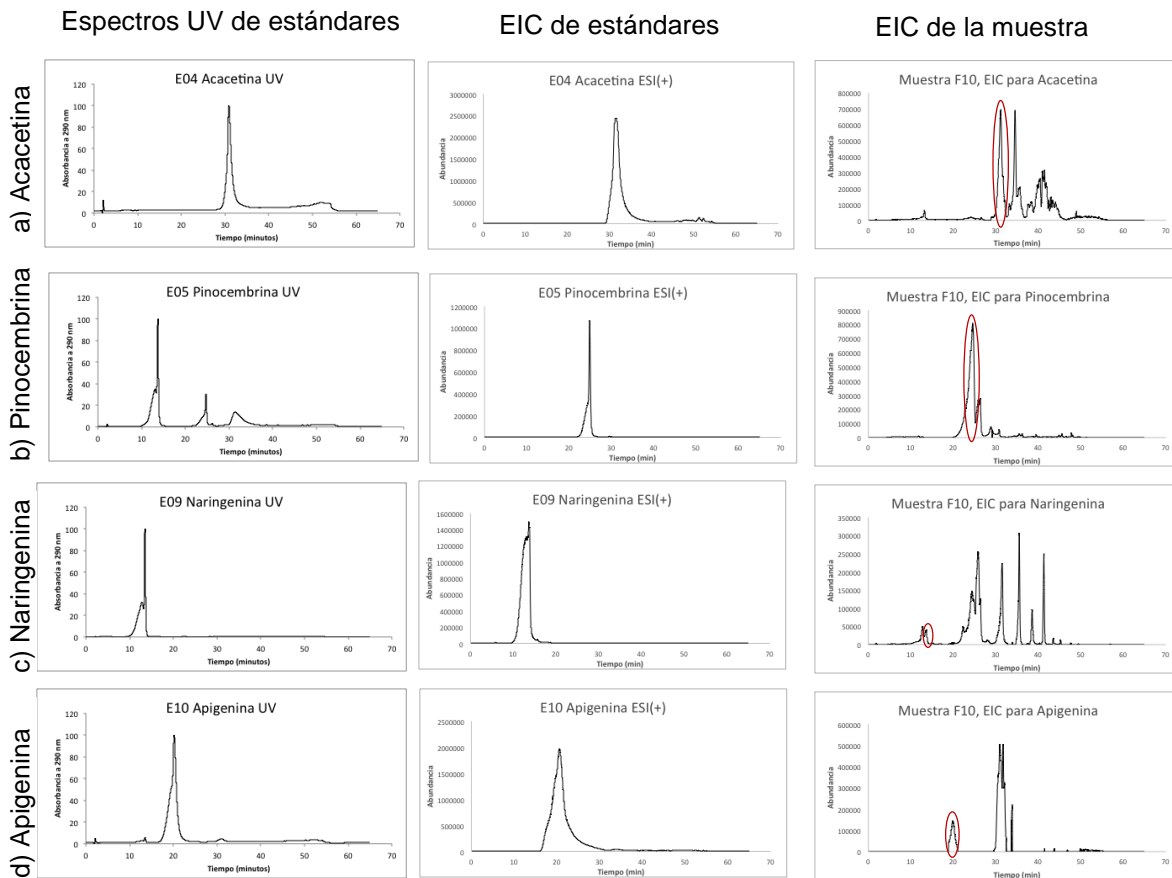


Figura 10. Identificación de compuestos en las muestras de EEP.

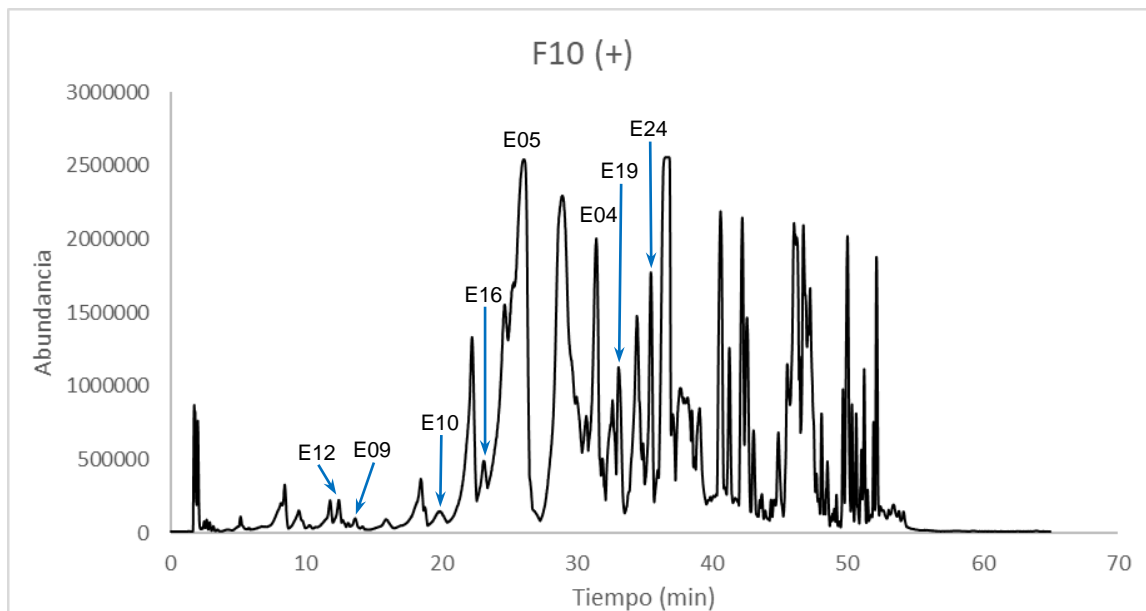


Figura 11. Compuestos identificados en la muestra F10 de EEP.

Este procesamiento de información para el análisis de los resultados de todas las muestras se automatizó utilizando el software MZMine 2 de la manera en que se describe en la sección 5.6.5. Existen diversos estudios en los que se estudian los componentes del propóleo utilizando el modo de ionización negativa para el electrospray.^{16,60,61} Sin embargo, los resultados indicaron que la mejor ionización para los estándares se produjo en modo positivo, por lo cual se seleccionó este modo de ionización para el análisis de cada muestra y los resultados se resumen en el Cuadro 9.

El flavonoide que se encontró con mayor frecuencia en las muestras fue la acacetina, que se detectó todas las muestras. El segundo flavonoide que se detectó con mayor frecuencia fue la apigenina en 34 muestras y el tercer compuesto más frecuente fue la pinocembrina en 28 propóleos. De los 22 estándares, nueve de ellos no fueron detectados en ninguna muestra (kaempferol, 4',7-di-O-metilapigenina, 4',7-di-O-metilnaringenina, galangina, crisina, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, ermanina y pinostrobina).

Entre los flavonoides detectados, se encontraron varios que cuentan con sustituciones en el anillo B, como acacetina, apigenina y naringenina. Este hallazgo

contrasta con reportes previos que aseveran que una característica de los propóleos de regiones templadas es que están constituidos por flavonoides sin dichas sustituciones.¹²

El apiario que generó las muestras con el mayor número de compuestos identificados fue el de Álamo Blanco, con 11 (F56) y 8 (F10) compuestos. Es importante destacar que ambas muestras fueron recolectadas en diferentes épocas durante el mismo año. Otras muestras que permitieron la identificación de un buen número de compuestos fueron del apiario Nico (F21 y F48), ambas con siete muestras. Estas últimas muestras fueron recolectadas en el mismo sitio con sólo un mes de diferencia y aun así se observan diferencias en su composición. La muestra F21 contiene pinobanksina y ramnocitrina, mientras que la muestra F48 contiene ácido ferúlico y alpinona.

Cuadro 9. Compuestos identificados en las muestras de propóleo mediante HPLC-ESI-MS (+).

Muestra / Estándar	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	E13	E14	E16	E17	E18	E19	E20	E23A	E23B	E24		
F03 Búho				X					X	X													X	
F05 Don Nico				X	X				X	X		X												
F07 Chino 2				X	X					X		X		X										
F08 Granizera Nico 2a col				X	X					X														
F09 Búho 2011				X					X	X								X						
F10 Álamo Blanco				X	X				X	X		X			X			X						X
F11 Panteón Colmena V				X						X														X
F12 Ahira				X	X				X	X							X	X						
F14 Zacatecas				X	X				X	X								X						X
F15 Chino 1				X	X				X	X		X		X										
F16 Don Gran Nico 3a recol				X	X					X														
F19 Búho IV				X						X														X
F20 Trojes Ali				X	X					X														
F21 Nico Sombra 1a colecta WRG				X	X				X	X		X					X	X						
F22 Búho 2012				X					X	X														
F24 Álamo Blanco				X	X					X								X						X

Cuadro 9. Compuestos identificados en las muestras de propóleo mediante HPLC-ESI-MS (+) (continuación).

Muestra / Estándar	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	E13	E14	E16	E17	E18	E19	E20	E23A	E23B	E24	
F25 Panteón IX 2a colecta				X						X													
F31 Acuexcomatl 3a muestra Aa				X	X																		
F32 Trojes 4a colecta				X																			
F33 Panteón Colmena III				X						X													X
F35 Panteón Colmena I 3a muestra				X						X													X
F36 Propóleo Guanajuato				X	X				X									X		X			X
F37 Acuexcomatl 1a colecta AA				X	X			X	X	X													
F38 Acuexcomatl 2a muestra X				X	X					X													
F39 Tlaxcala MeOH				X	X																		
F41 Panteón Colmena I 1a col				X					X	X													X
F42 Panteón Colmena I 3a muestra				X					X	X													X

Cuadro 9. Compuestos identificados en las muestras de propóleo mediante HPLC-ESI-MS (+) (continuación).

Muestra / Estándar	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	E13	E14	E16	E17	E18	E19	E20	E23A	E23B	E24	
F43 Acuexcomatl X 3a colecta				X	X					X										X			
F44 Búho				X					X	X													X
F45 3a Nico Sombra				X	X							X											
F46 Guanajuato				X	X				X	X								X					
F47 Don Nico Sombra				X	X					X		X											
F48 Sombra Nico 2da recolección				X	X				X	X		X		X							X		
F50 Valentín 2012				X	X																		
F51 Trojes 2011				X	X					X													
F52 Acuex 1				X	X				X	X								X		X			X
F56 Álamo Blanco 1				X	X				X	X		X			X		X	X	X	X			X
F57 Chihuahua				X	X				X	X							X				X		
F58 Zacatecas 2				X	X					X								X			X		
F59 Comarca Lagunera				X	X					X											X		X

El apiario que generó la muestra con menos compuestos identificados fue Trojes (muestra F32), con sólo acetina. Además, esta muestra presentó una baja concentración de flavonoides totales, intermedia en fenoles totales y una capacidad antioxidante intermedia también.

A manera de comparación, en la Figura 12 se muestran las corrientes iónicas totales (TIC) de HPLC-UV-ESI-MS de la muestra con mayor cantidad de compuestos detectados (F56, de Valsequillo, Puebla) y de la que menor cantidad de compuestos se observaron (F32, Milpa Alta, CDMX).

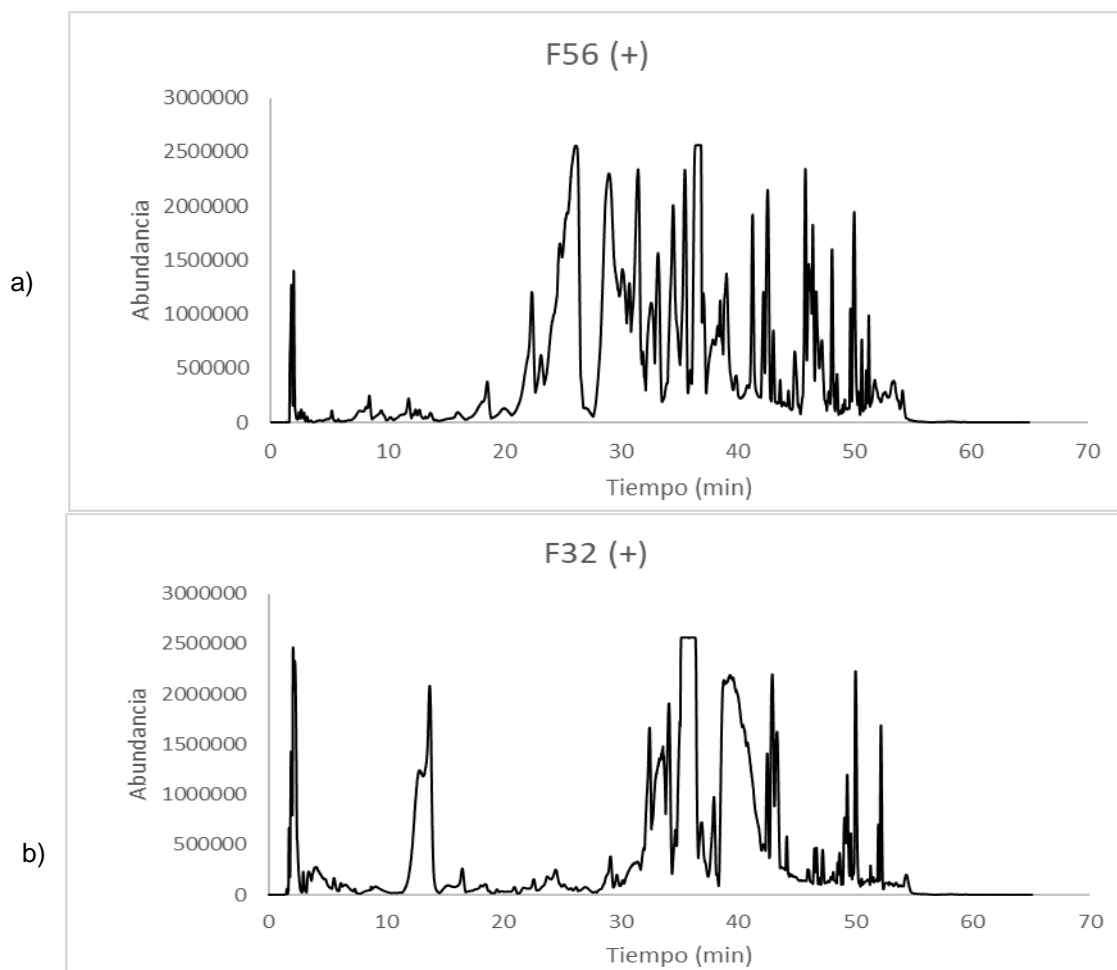


Figura 12. Comparación de las corrientes iónicas totales generadas por de HPLC-UV-ESI-MS, modo de ionización positiva. Corresponden a (a), la muestra en la que se detectó la mayor cantidad de compuestos y (b), en la que se detectó la menor cantidad de compuestos.

Estos resultados son congruentes con los reportados para el análisis de estas muestras por RMN,⁴⁷ en los que aquellas con bajo contenido de flavonoides y compuestos fenólicos presentan menos señales (en la región de los protones aromáticos) que aquellas con altos contenidos de éstos. En particular, entre los 20 y 30 minutos de la corrida se observan señales en la muestra F56 que no aparecen en la muestra F32, y a partir de los 30 minutos hay un mayor número de eluatos y mejor definidos que en el cromatograma de esta última.

Las diferencias entre ambas muestras se pueden observar con mayor claridad al comparar sus espectros UV-Vis, mostrados en la Figura 13.

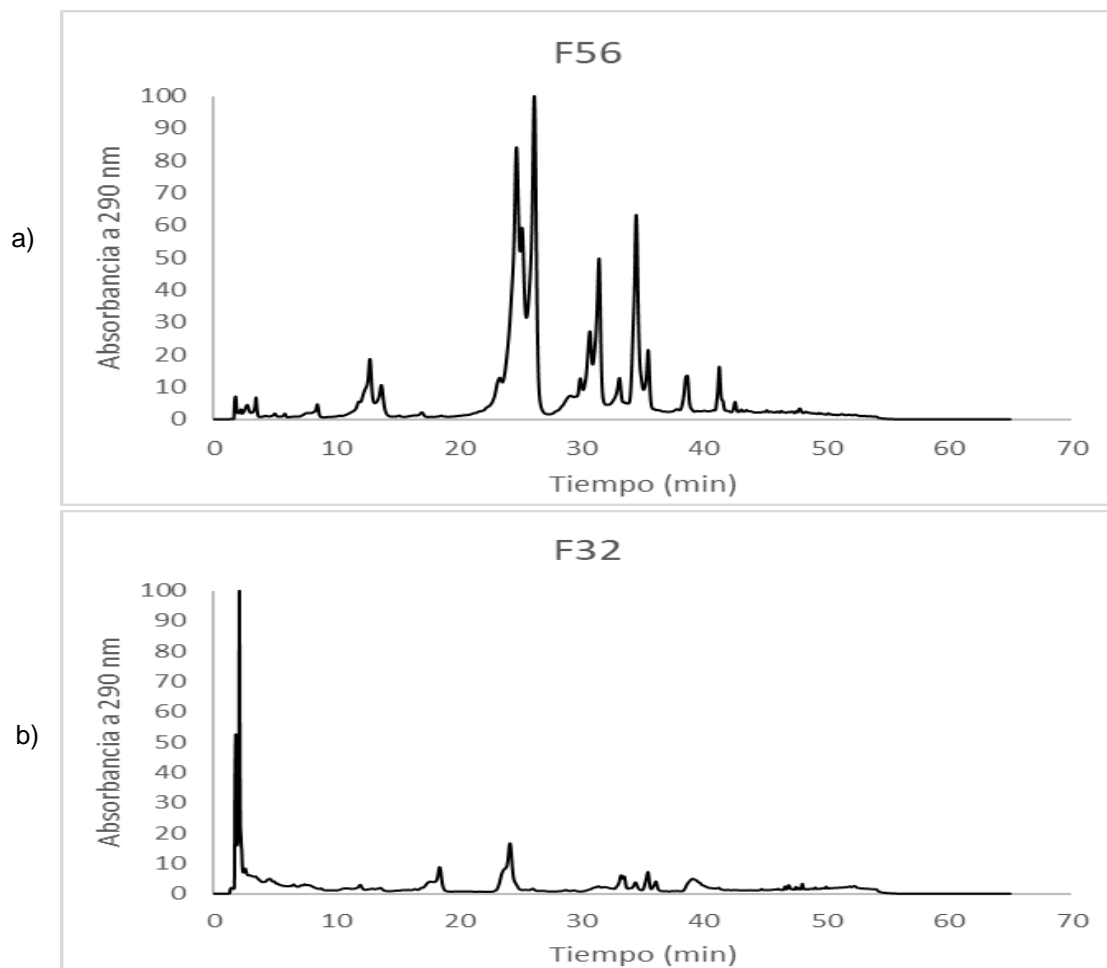


Figura 13. Comparación de espectros de UV-Vis. Corresponde a (a), la muestra en la que se detectó la mayor cantidad de compuestos y (b), en la que se detectó la menor cantidad de compuestos.

Estos cromatogramas muestran la absorbancia de los diferentes componentes de los propóleos a una $\lambda = 290$ nm, que se encuentra en la zona de máxima absorción de los flavonoides. En estos gráficos, la muestra F56 tiene un mayor número de señales y la absorbancia de éstas es más intensa que las observadas en la muestra F32.

7. CONCLUSIONES

- La mayoría de las muestras analizadas cumplió con los criterios mínimos de calidad establecidos por las normas mexicana y brasileña de propóleos.
- Las muestras que presentaron un alto contenido de flavonoides y fenoles totales tuvieron una buena capacidad antioxidante.
- Los resultados de las distintas pruebas son consistentes, por lo que se pueden correlacionar la cantidad de flavonoides y fenoles totales con la actividad antioxidante de las muestras analizadas.
- Las muestras cuyo contenido de flavonoides fue bajo pero que presentaron una actividad antioxidante moderada (como la F54) pueden contener especies químicas (como vitamina E y carotenoides) responsables de dicha actividad.
- Los resultados obtenidos indican que el año de recolección, la zona geográfica y el método de recolección representan variables importantes que alteran el contenido de flavonoides y fenoles totales. Existen muchos factores que contribuyen a la variabilidad de la composición de los propóleos y esto se refleja incluso entre las muestras provenientes del mismo apiario. Por ello, se requieren de varias muestras para poder establecer la calidad del propóleo de un lugar determinado.
- De las muestras mexicanas estudiadas, las de Valsequillo, Puebla dieron resultados consistentes con altos contenidos de fenoles y flavonoides, así como de antioxidantes y fue en donde se identificó el mayor número de compuestos de referencia.
- Los propóleos chinos dieron buenos resultados en las pruebas de cuantificación química, aunque no se identificó mediante HPLC-UV-ESI-MS una gran diversidad de compuestos fenólicos, lo que sugiere que su composición no es muy compleja o que contienen compuestos distintos a los que se usaron como estándares de propóleos mexicanos.
- En las muestras se detectaron flavonoides como acacetina, apigenina y naringenina, que en su estructura química cuentan con sustituyentes en el

anillo B. Esto contrasta con investigaciones previas en las que este tipo de compuestos no fueron detectados en propóleos de climas templados.

- Los datos obtenidos permitieron identificar diversas variables que afectan a la calidad de los propóleos. Con esta información se pueden hacer esfuerzos para optimizar aquellas que se pueden controlar (como la especie de abeja cultivada, la temporada y el método de recolección de propóleo) para generar las condiciones apropiadas que resulten en un propóleo de la mejor calidad posible.
- Los resultados del análisis de HPLC-UV-ESI-MS son congruentes con los de RMN previamente descritos en la literatura para estas muestras en cuanto a que el número e intensidad de las señales o picos cromatográficos es proporcional al contenido de compuestos fenólicos que contienen.
- La información obtenida de las muestras de propóleo de diversas partes del país puede ser útil para la mejora de la norma de calidad de los propóleos mexicanos.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas adicionales para determinar antioxidantes (como FRAP, ABTS y blanqueamiento de caroteno), fenoles (prueba con NaOH) y flavonoides (prueba de dihidroflavonoides) y que de esta manera se complemente la información obtenida hasta el momento.
- Analizar un mayor número de muestras de los apiarios mencionados y de nuevos apiarios de otras regiones del país, para así generar una base de datos con la información de propóleos de las diferentes zonas apícolas del país.
- Utilizar un mayor número de estándares para poder identificar más compuestos mediante HPLC-UV-ESI-MS.
- Realizar estudios de masas en tándem MSⁿ para confirmar la información obtenida e identificar compuestos derivados de los flavonoides, como sus glicósidos.
- Establecer los intervalos de concentración de los diferentes grupos de compuestos para muestras de propóleo según su región de procedencia.
- Realizar el análisis estadístico multivariable de los datos generados en HPLC-ESI-MS para obtener información que permita identificar la similitud y las diferencias entre los diferentes grupos de propóleo.

9. REFERENCIAS

1. Semarnat. *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México*. (2012).
2. Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J. & Vaissière, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* **68**, 810–821 (2009).
3. Murcia, C. in *Ecología y conservación de bosques neotropicales* 493–530 (2002).
4. Lee, S. W. & Jo, S. K. WPSF Actividades y Propuestas para la estandarización Internacional de los Propóleos. in *Apimondia Resúmenes*, 28 (2011).
5. SAGARPA. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-003-SAG/GAN-2016, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. *Diario Oficial de la Federación* (2016). Available at: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5452716&fecha=15/09/2016.
6. SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. (2017).
7. Ghisalberti, E. Propolis: a review. *Bee World* **60**, 59–84 (1979).
8. Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M. & Park, Y. K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
9. Martinotti, S. & Ranzato, E. Propolis : a new frontier for wound healing? *Burn. Trauma* 1–7 (2015). doi:10.1186/s41038-015-0010-z
10. Freires, I. A., De Alencar, S. M. & Rosalen, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **110**, 267–279 (2016).

11. Wagh, V. D. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2013**, (2013).
12. Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A. & Salatino, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 925–936 (2011).
13. Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 114–117 (2005).
14. Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. & Hu, F.-L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* **19**, 19610–19632 (2014).
15. Malešev, D. & Kuntić, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serbian Chem. Soc.* **72**, 921–939 (2007).
16. Kumazawa, S., Hamasaka, T. & Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* **84**, 329–339 (2004).
17. SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. *Claridades agropecuarias* 14 (2010).
18. Lotti, C. *et al.* Chemical constituents of red Mexican propolis. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2209–2213 (2010).
19. Kosalec, I., Bakmaz, M. & Pepeljnjak, S. Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharm.* **53**, 275–85 (2003).
20. Popova, M. P., Graikou, K., Chinou, I. & Bankova, V. S. GC-MS profiling of diterpene compounds in mediterranean propolis from Greece. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3167–3176 (2010).
21. Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I. & Karathanos, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem.* **116**,

- 452–461 (2009).
22. Kumazawa, S. *et al.* Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7722–7725 (2007).
 23. Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A. & Salatino, M. L. F. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie* **29**, 305–314 (1998).
 24. Pazin, W. M. *et al.* Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. *J. Apic. Res.* **56**, 40–49 (2017).
 25. Cvek, J. *et al.* The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *J. Apic. Res.* **47**, 35–45 (2008).
 26. Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M. & Gören, A. C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2227–2238 (2010).
 27. Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513–523 (2011).
 28. Mohammadzadeh, S. *et al.* Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem.* **103**, 729–733 (2007).
 29. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.* **73**, 117–124 (2008).
 30. Marcucci, M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83–99 (1995).
 31. Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J. & Sforcin, J. M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: A review. *J. Pharm. Pharmacol.* **63**, 1378–1386 (2011).
 32. Libério, S. A. *et al.* The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J. Ethnopharmacol.* **125**, 1–9 (2009).

33. Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* **36**, 347–363 (1998).
34. Bankova, V. *et al.* Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J. Apic. Res.* **8839**, 1–49 (2016).
35. Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M. & Vladimir-Knezević, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm.* **55**, 423–430 (2005).
36. Cui-ping, Z. *et al.* Development of High-Performance Liquid Chromatographic for Quality and Authenticity Control of Chinese Propolis. *J. Food Sci.* **79**, 1315–1322 (2014).
37. Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. & Vladimir-Knezević, S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* **54**, 65–72 (2004).
38. Papoti, V. T., Xystouris, S., Papagianni, G. & Tsimidou, M. Z. 'Total flavonoid' content assessment via aluminum [Al(III)] complexation reactions. What we really measure? *Ital. J. Food Sci.* **23**, 252–259 (2011).
39. Funari, C. S. *et al.* On Track for a Truly Green Propolis - Fingerprinting Propolis Samples from Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 7110–7117 (2016).
40. Corrêa, W. R. *et al.* ESI-MS fingerprinting of residues of green propolis, and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. *J. Apic. Res.* **8839**, 1–7 (2016).
41. Pietta, P. G., Gardana, C. & Pietta, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* **73**, S7–S20 (2002).
42. Ristivojević, P. *et al.* Ultrahigh-performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap/MS/MS) study of phenolic profile of Serbian poplar type propolis. *Phytochem. Anal.* **26**, 127–136 (2015).

43. Kasote, D. M. *et al.* HPLC, NMR based chemical profiling and biological characterisation of Indian propolis. *Fitoterapia* **122**, 52–60 (2017).
44. Maraschin, M. *et al.* Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. *J. Nat. Prod.* **79**, 13–23 (2016).
45. Anđelković, B. *et al.* Metabolomics study of Populus type propolis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **135**, 217–226 (2017).
46. Guzelmeric, E. *et al.* Authentication of Turkish propolis through HPTLC fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **87**, 23–32 (2018).
47. Rivero Cruz, J., Rodríguez de San Miguel E., Robles Obregón S., Hernández Espino C., Rivero Cruz B., Pedraza Chaverri J., Esturau Escofet N. Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by 1H-NMR Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis. *Molecules* **22**, 1184 (2017).
48. Martínez Chávez, D. A. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en propóleos mexicanos. (UNAM, 2012).
49. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M. & Chern, J.-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* **10**, 178–182 (2002).
50. Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L. & Narain, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res. Int.* **101**, 129–138 (2017).
51. Rocha, J. C. da, Gomes, J. A. da C. P. & D'Elia, E. Aqueous extracts of mango

- and orange peel as green inhibitors for carbon steel in hydrochloric acid solution. *Mater. Res.* **17**, 1581–1587 (2010).
52. Ainsworth, E. A. & Gillespie, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2**, 875–877 (2007).
 53. Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., Özçelik, B. & Salah, R. Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis : Influence of solvent. *Pak. J. Pharm. Sci.* **30**, 1417 (2015).
 54. Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L. & Jacobo-Velázquez, D. a. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **5**, 5990 (2013).
 55. Prieto, J. M. Procedure : Preparation of DPPH Radical, and antioxidant scavenging assay. 1–3 (2012).
 56. Metabolomics Fiehn Lab & UC Davis. Mass Spectrometry Adduct Calculator. Available at: <http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator>.
 57. Ministerio da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N.º 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis. Anexo VI. (2001). Available at: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>. (Accessed: 29th September 2017)
 58. Vit, P., Soler, C. & Tomás-Barberán, F. a. Profiles of phenolic compounds of *Apis mellifera* and *Melipona* spp. honeys from Venezuela. *Zeitschrift fur Leb.-Untersuchung und -forsch.* **204**, 43–47 (1997).
 59. Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L. & Plessi, M. Chemical and functional

- characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 2852–2862 (2012).
60. Medana, C., Carbone, F., Aigotti, R., Appendino, G. & Baiocchi, C. Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. *Phytochem. Anal.* **19**, 32–39 (2008).
61. Volpi, N. & Bergonzini, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**, 354–361 (2006).

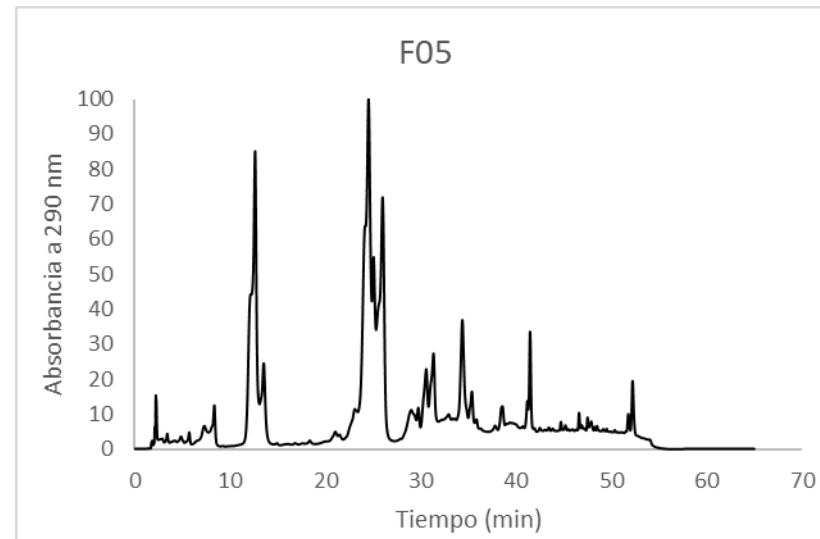
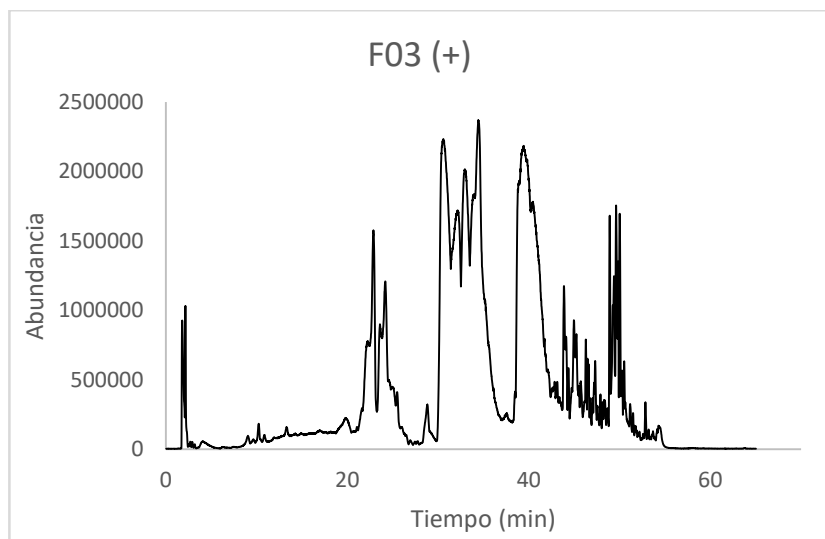
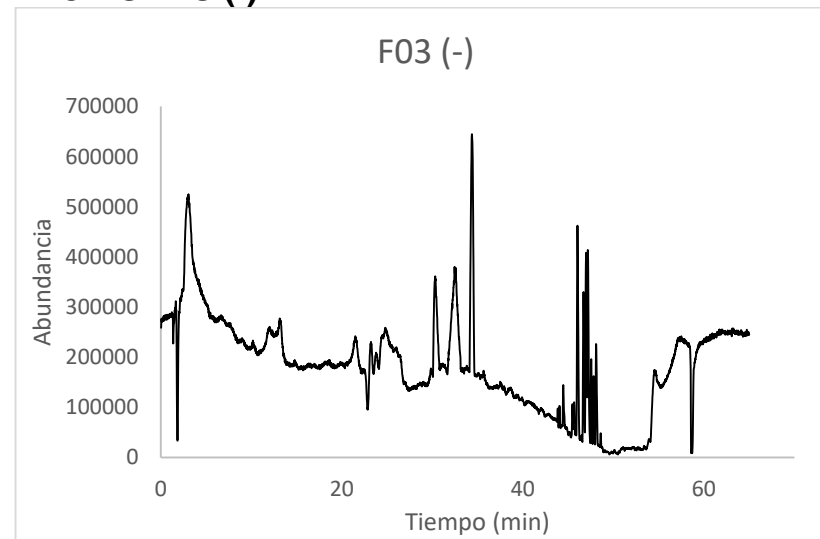
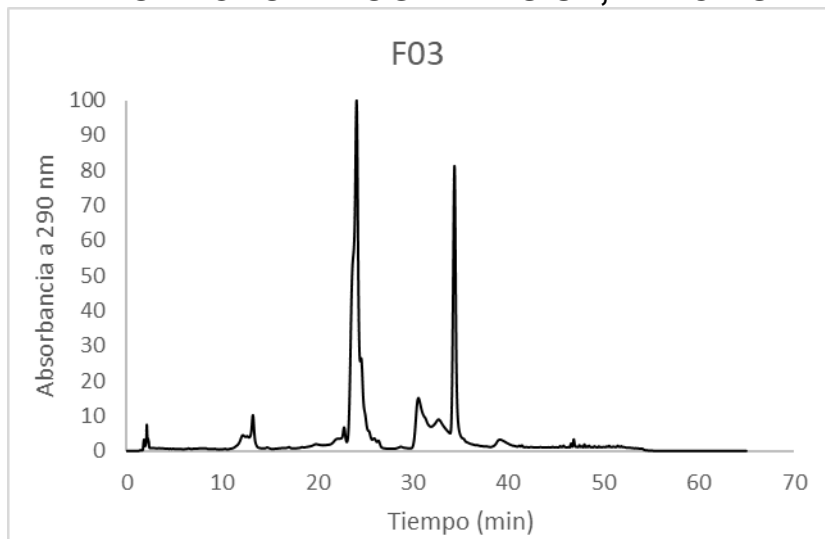
ANEXO A. ZONAS DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE PROPÓLEO

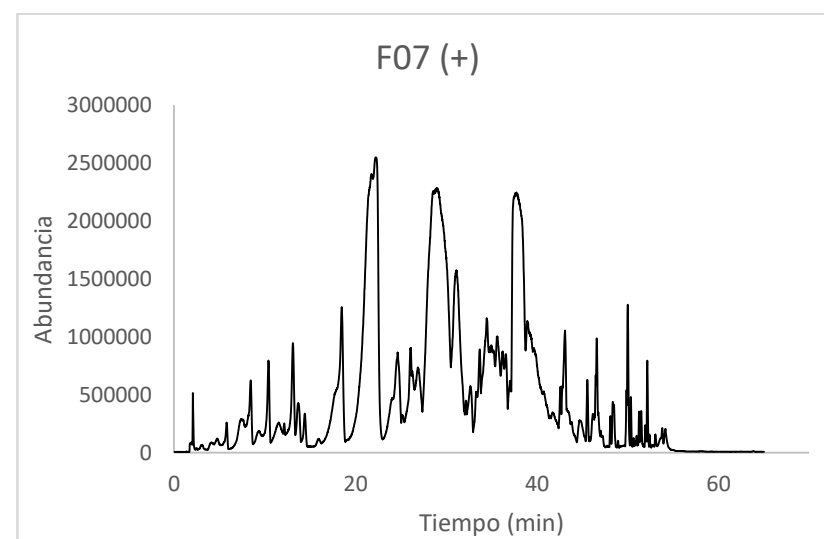
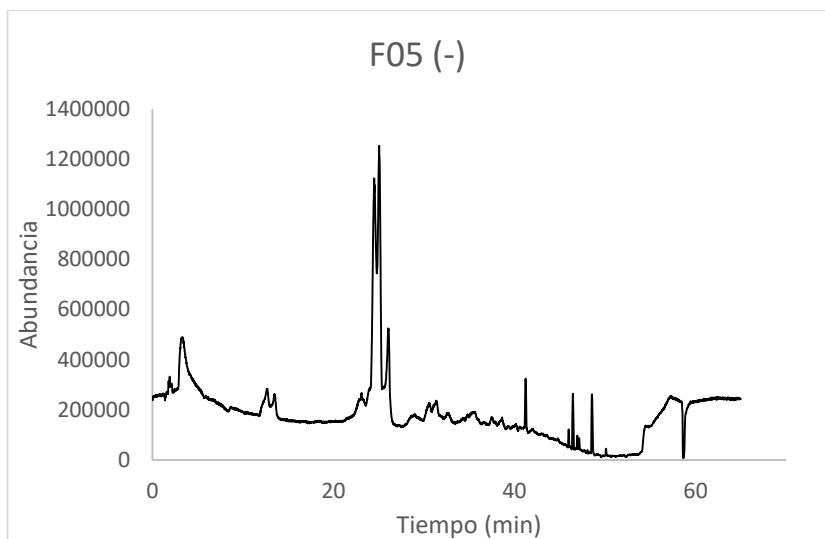
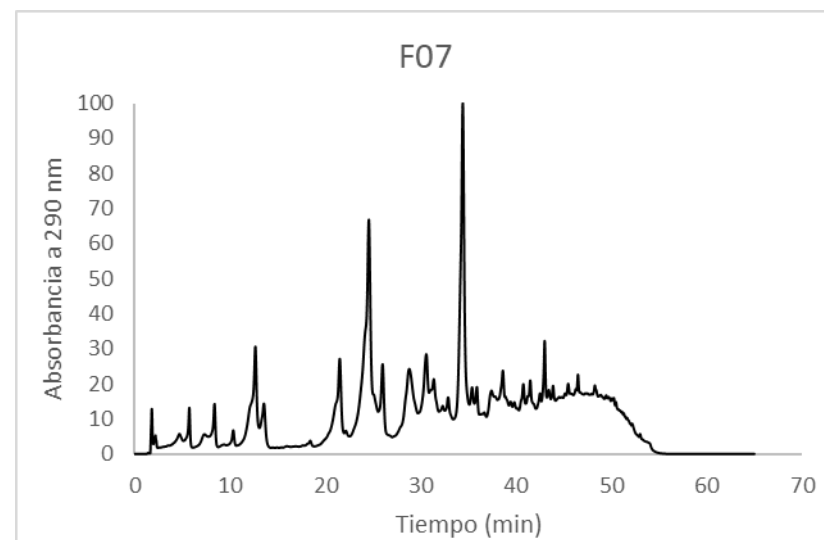
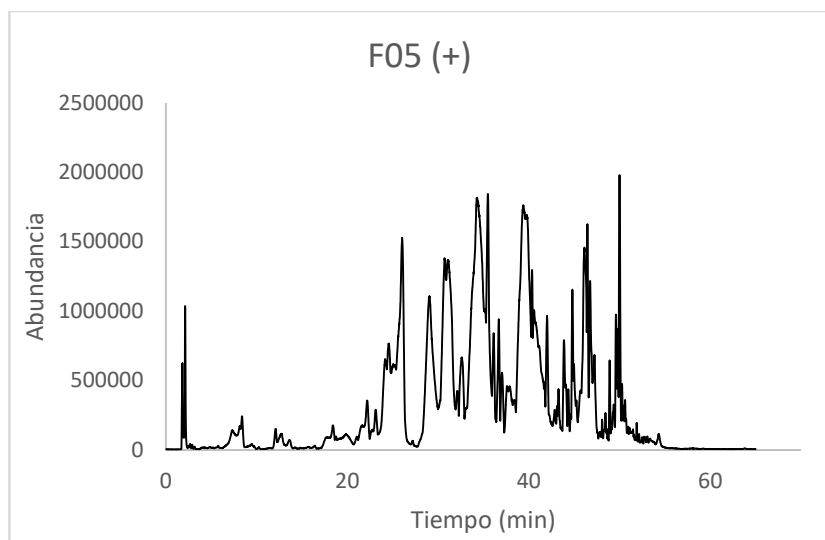
Clave	Origen de la muestra	Apiario	Mes, Año	Método de recolección
Ciudad de México				
Tlalpan				
F05	Topilejo	Nico	Septiembre, 2011	Malla de plástico
F08	Topilejo	Nico	Octubre, 2011	Malla de plástico
F16	Topilejo	Nico	Octubre, 2011	Malla de plástico
F21	Topilejo	Nico	Octubre, 2011	Malla de plástico
F40	Topilejo	Nico	Octubre, 2011	Malla de plástico
F45	Topilejo	Nico	Noviembre, 2011	Malla de plástico
F47	Topilejo	Nico	Octubre, 2012	Malla de plástico
F48	Topilejo	Nico	Octubre, 2014	Malla de plástico
F55	Topilejo	Nico	Octubre, 2013	Malla de plástico
Xochimilco				
F23	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Octubre, 2011	Raspado
F27	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Noviembre, 2011	Raspado
F30	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Octubre, 2011	Raspado
F31	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Octubre, 2012	Raspado
F34	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Octubre, 2011	Raspado
F37	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Noviembre, 2013	Malla de plástico
F38	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Octubre, 2013	Malla de plástico
F43	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Octubre, 2013	Raspado
F52	San Luis Tlaxialtemalco	Acuexcomatl	Octubre, 2011	Raspado
Milpa Alta				
F02	San Pablo Oztotepec	Valentin	Octubre, 2011	Raspado
F06	San Pablo Oztotepec	Valentin	Octubre, 2011	Raspado
F50	San Pablo Oztotepec	Valentin	Noviembre, 2012	Malla de plástico
F53	San Pablo Oztotepec	Valentin	Octubre, 2011	Raspado
F54	San Pablo Oztotepec	Valentin	Octubre, 2011	Malla de plástico

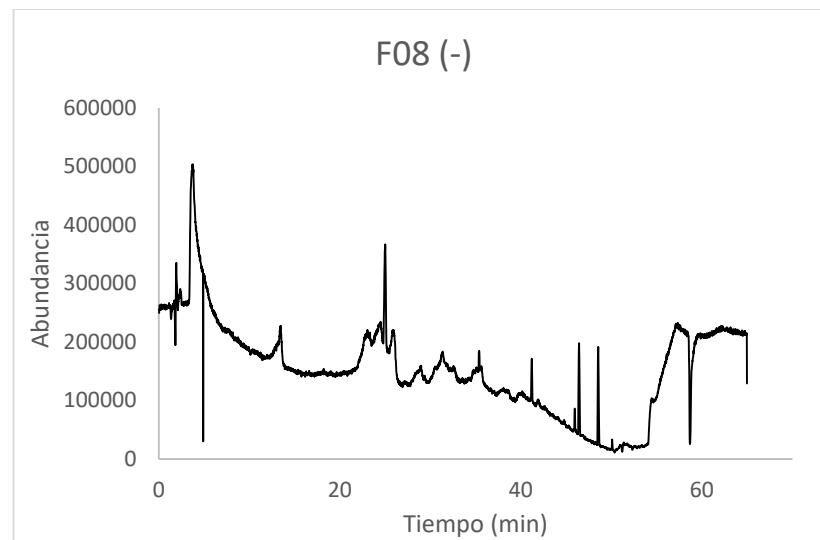
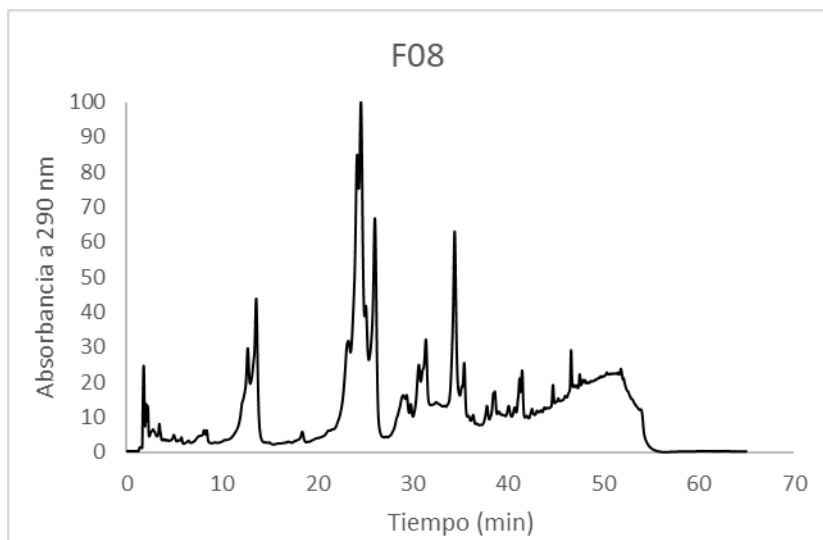
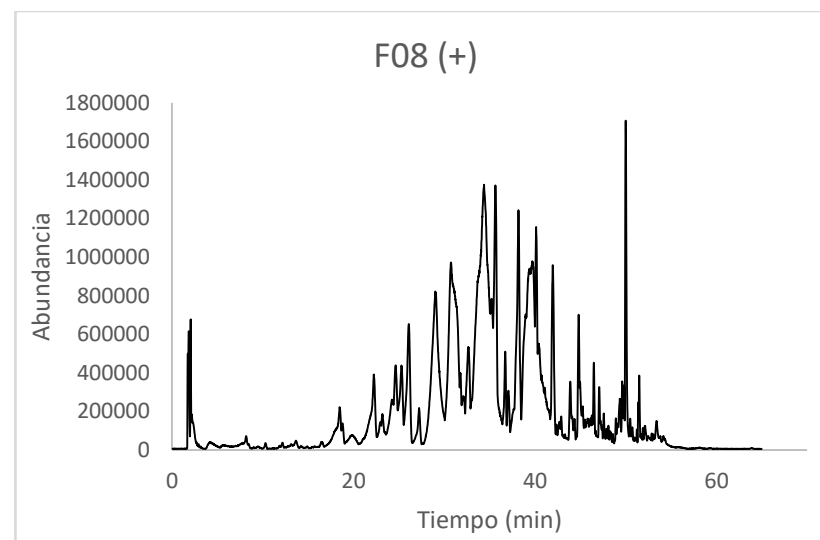
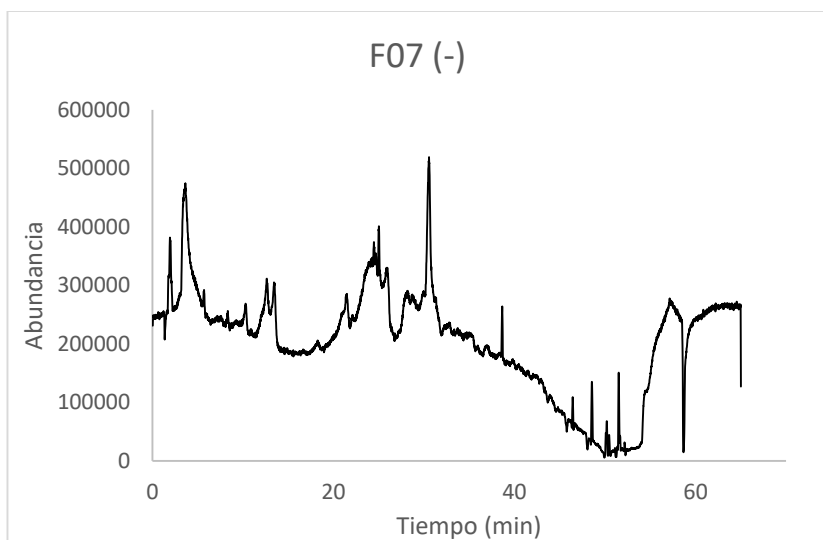
Clave	Origen de la muestra	Apiario	Mes, Año	Método de recolección
F03	San Pablo Oztotepec	Búho	Octubre, 2011	Raspado
F09	San Pablo Oztotepec	Búho	Octubre, 2011	Raspado
F17	San Pablo Oztotepec	Búho	Octubre, 2011	Malla de plástico
F19	San Pablo Oztotepec	Búho	Octubre, 2012	Raspado
F44	San Pablo Oztotepec	Búho	Noviembre, 2012	Raspado
F49	San Pablo Oztotepec	Búho	Octubre, 2011	Raspado
F11	San Pablo Oztotepec	Panteon Colmena	Octubre, 2012	Raspado
F25	San Pablo Oztotepec	Panteon Colmena	Octubre, 2011	Raspado
F33	San Pablo Oztotepec	Panteon Colmena	Noviembre, 2012	Raspado
F35	San Pablo Oztotepec	Panteon Colmena	Octubre, 2011	Raspado
F41	San Antonio Tecomitl	Panteon Colmena	Noviembre, 2013	Raspado
F42	San Pablo Oztotepec	Panteon Colmena	Octubre, 2013	Raspado
F12	San Antonio Tecomitl	Ahira	Octubre, 2012	Malla de plástico
F20	San Antonio Tecomitl	Trojes	Octubre, 2011	Raspado
F22	San Antonio Tecomitl	Trojes	Octubre, 2011	Malla de plástico
F32	San Antonio Tecomitl	Trojes	Octubre, 2013	Malla de plástico
F51	San Antonio Tecomitl	Trojes	Octubre, 2011	Raspado
F28	San Pablo Oztotepec,	Bonilla	Octubre, 2013	Malla de plástico
Interior de la República				
Puebla				
F10	Valsequillo	Álamo Blanco	Octubre, 2011	Raspado
F24	Valsequillo	Álamo blanco	Octubre, 2012	Raspado
F26	Cuetzalan,	Cuetzalan	Octubre, 2011	Raspado
F56	Valsequillo	Álamo Blanco	Octubre, 2011	Cuñas de madera
Chihuahua				
F57	Parral	Chihuahua	Octubre, 2016	Raspado
Coahuila				
F59	Torreón	Comarca Lagunera	Octubre, 2016	Raspado

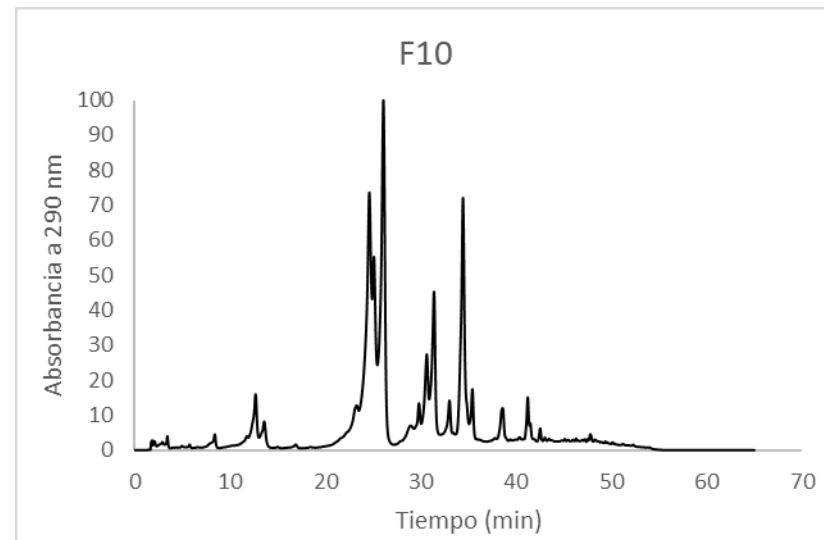
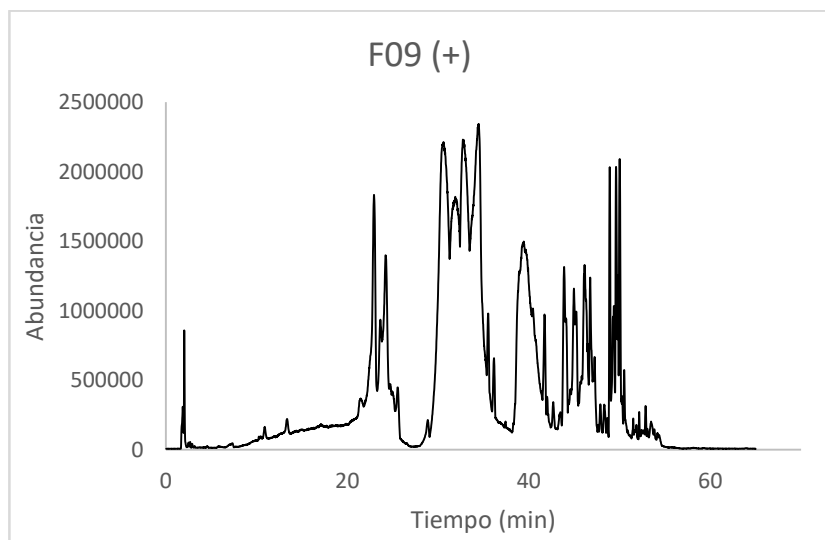
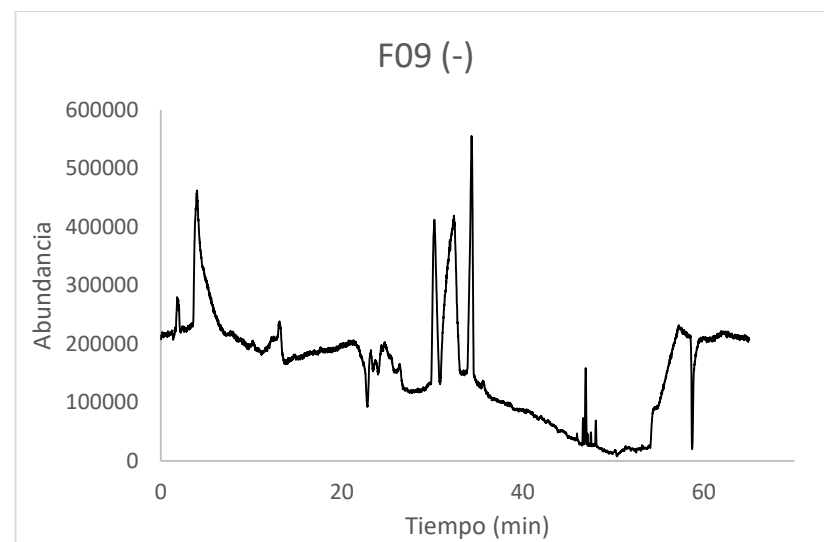
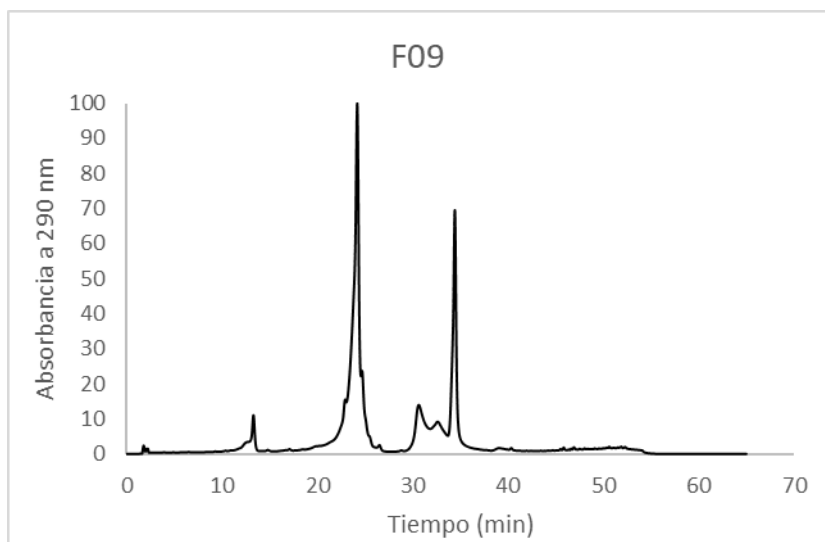
Clave	Origen de la muestra	Apiario	Mes, Año	Método de recolección
Chiapas				
F29	Chiapas	ECOSUR	Octubre, 2015	Raspado
Oaxaca				
F01	Pinotepa Nacional	Pinotepa	Octubre, 2012	Raspado
F13	Pinotepa Nacional	Pinotepa 1	Octubre, 2011	Raspado
Guanajuato				
F36	Silao	Guanajuato	Octubre, 2016	Malla de plástico
F46	Silao	Guanajuato	Octubre, 2012	Malla de plástico
Tlaxcala				
F04	Tlaxcala	Tlaxcala	Octubre, 2011	Raspado
F39	Tlaxcala	Tlaxcala	Octubre, 2011	Raspado
Zacatecas				
F14	Zacatecas	Zacatecas	Octubre, 2015	Raspado
F58	Zacatecas	Zacatecas	Octubre, 2016	Raspado
Muestras de otros países				
Sudamérica				
F18	Quito, Ecuador	Ecuador	2011	
China				
F07	China	Chino 2	2013	Comprado en Gómez Palacio, Durango
F07	China	Chino 1	2013	Comprado en Gómez Palacio, Durango

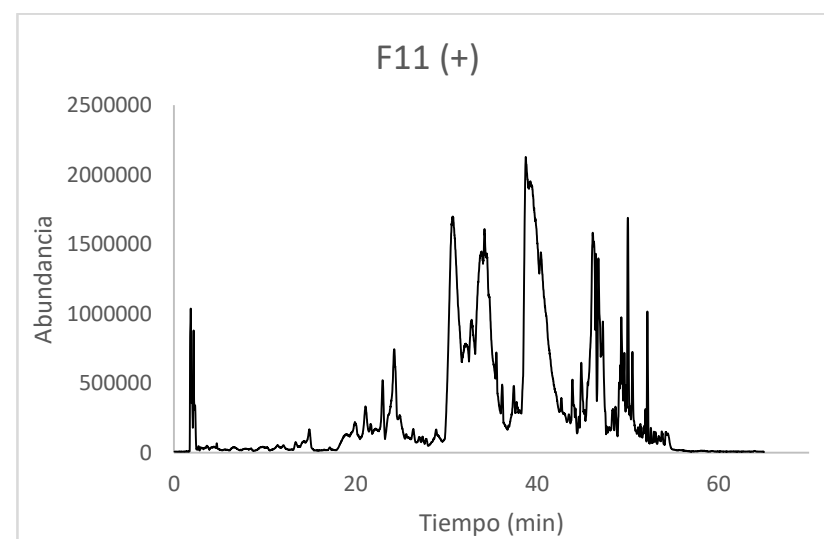
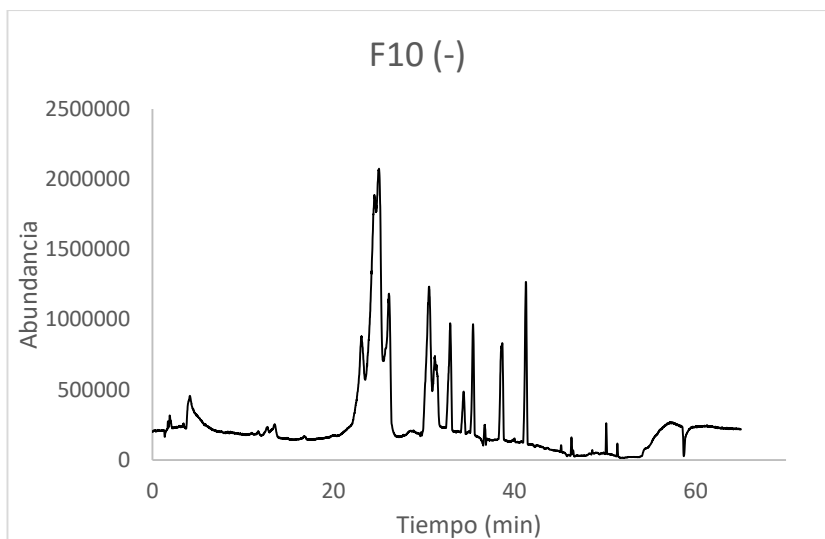
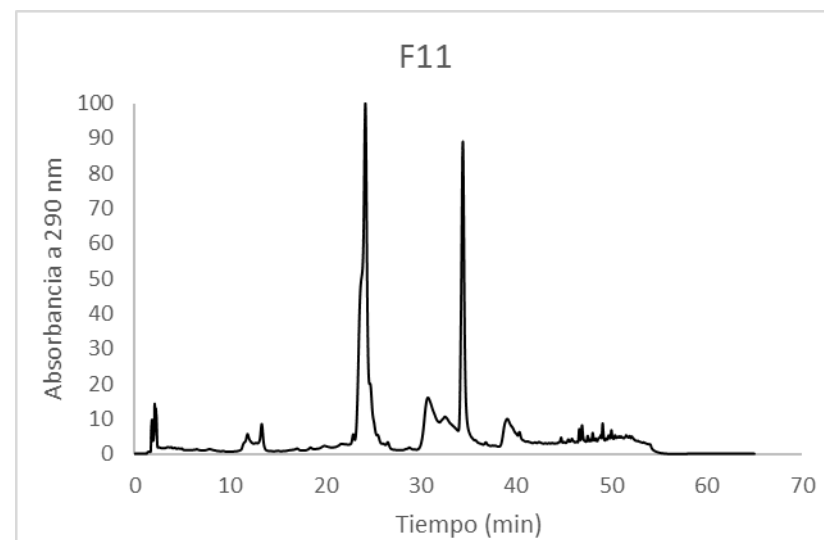
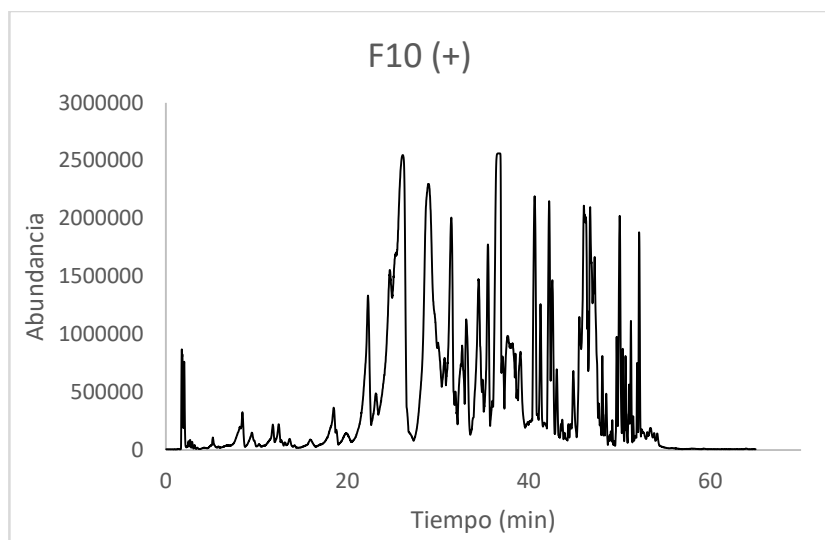
ANEXO B. CROMATOGRAMAS UV, HPLC-ESI-MS (+) Y HPLC-ESI-MS (-)

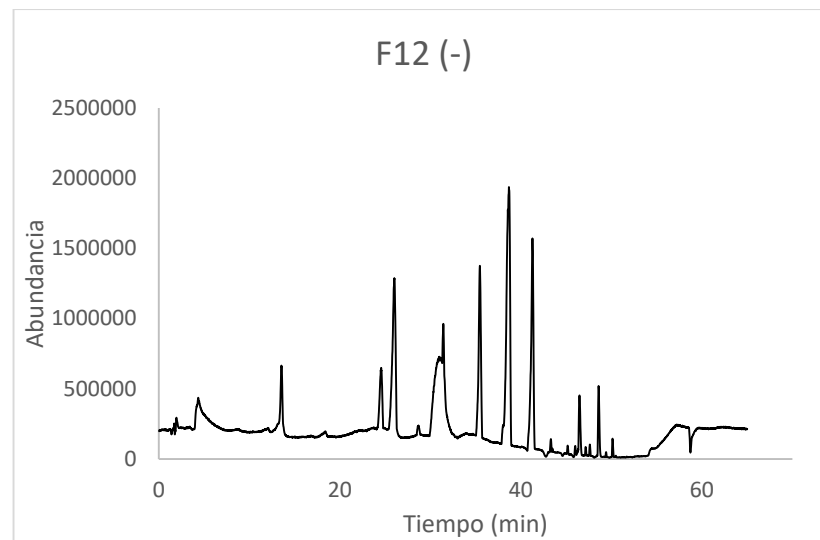
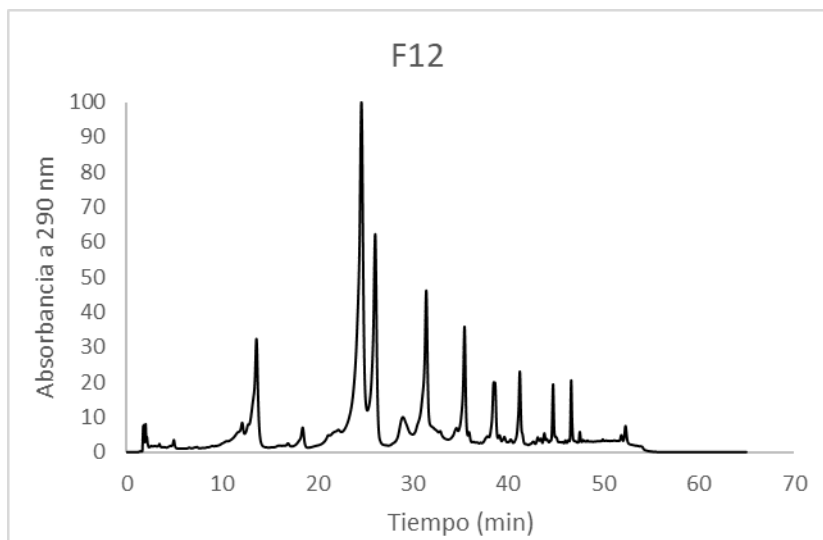
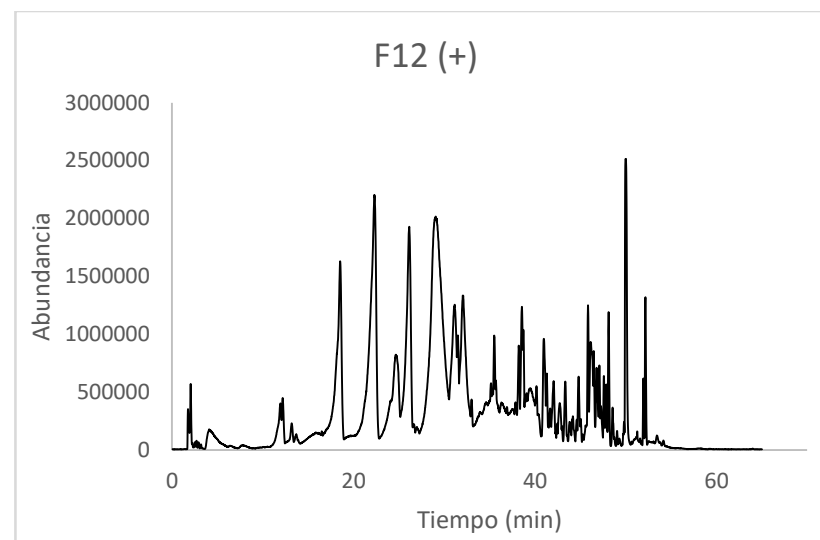
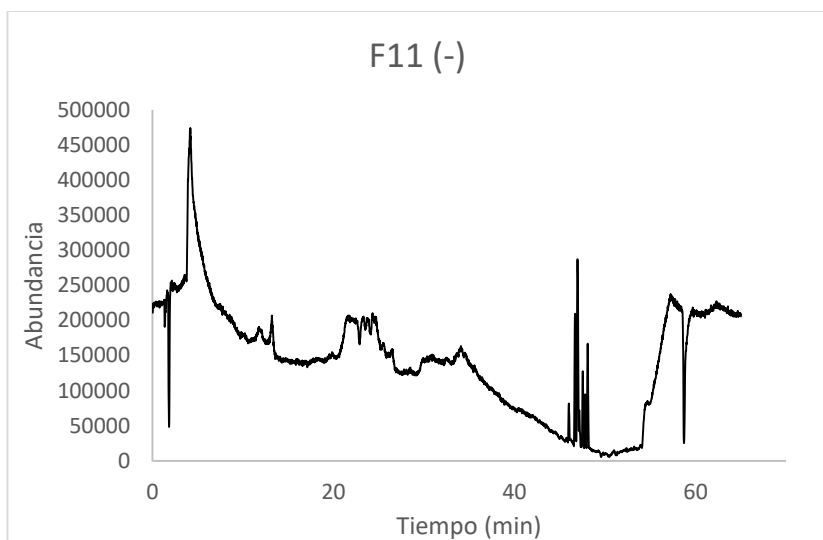


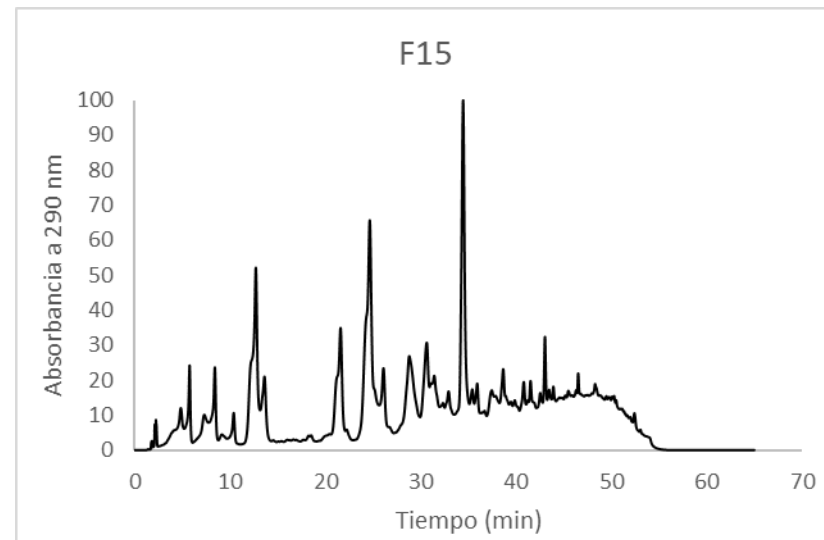
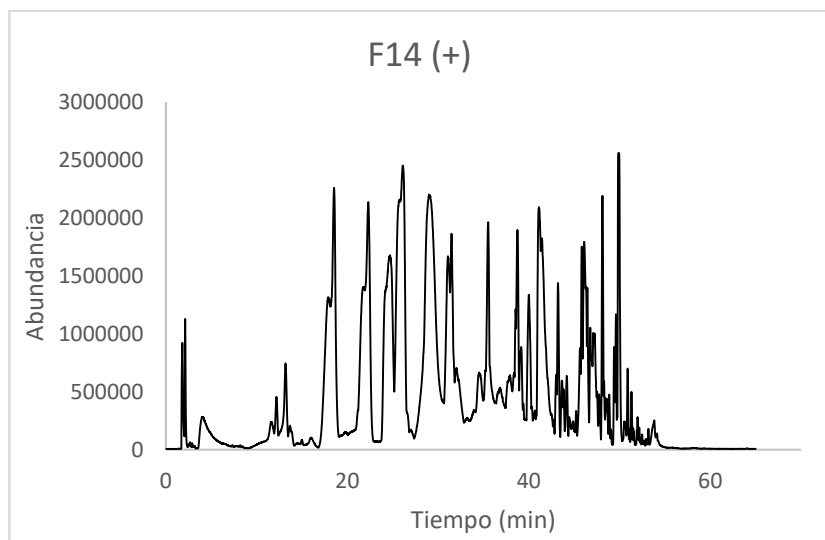
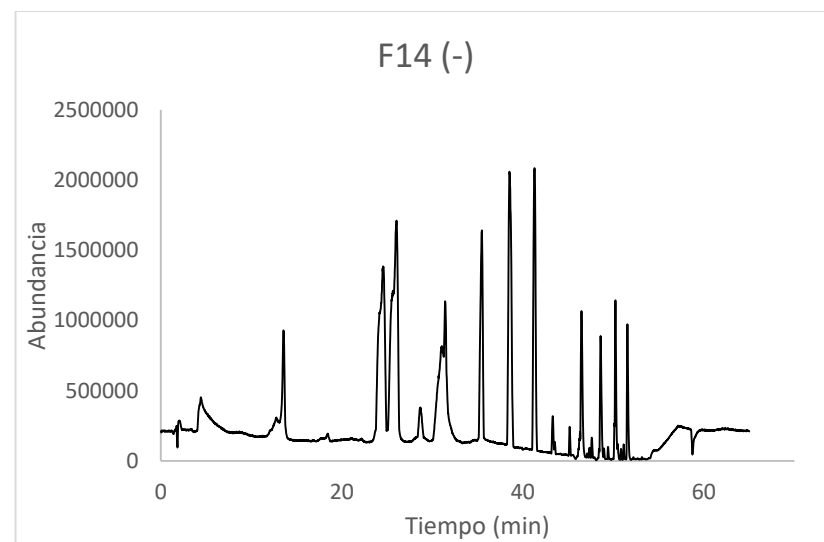
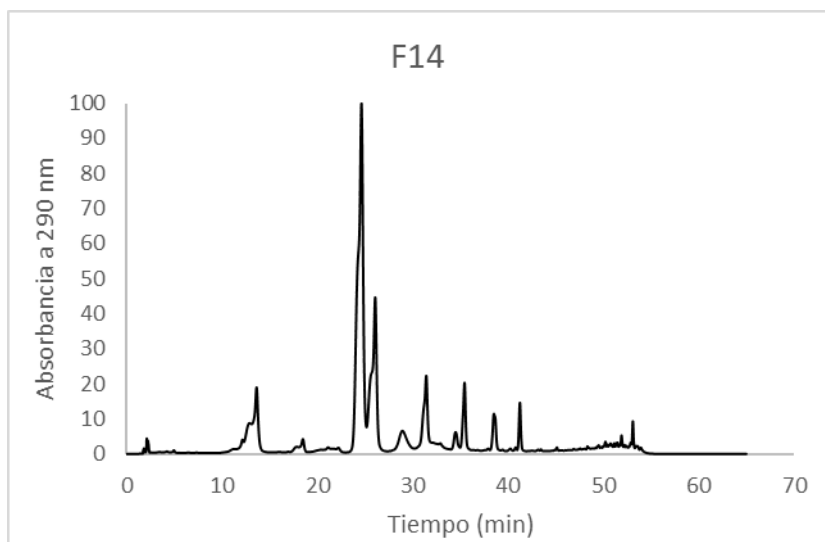


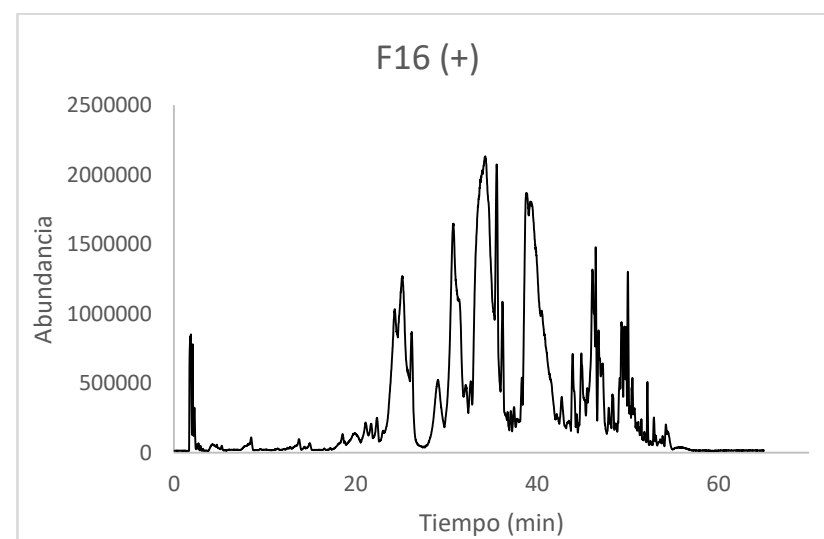
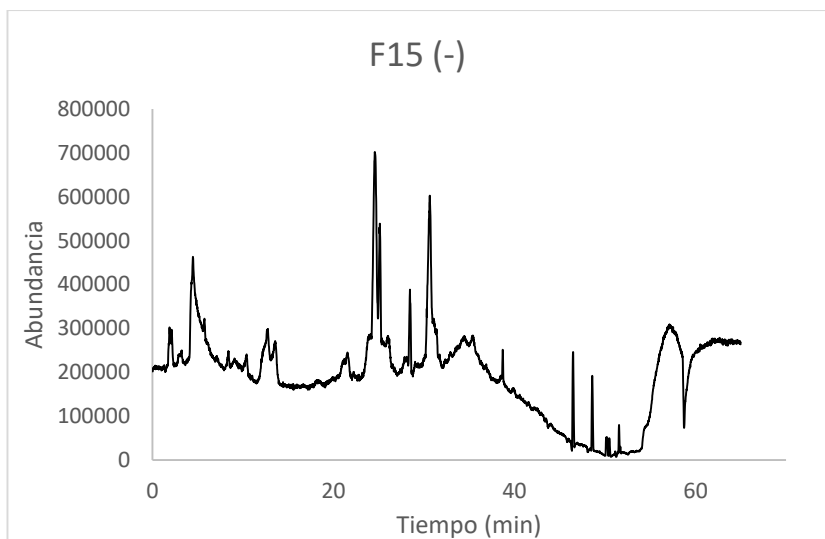
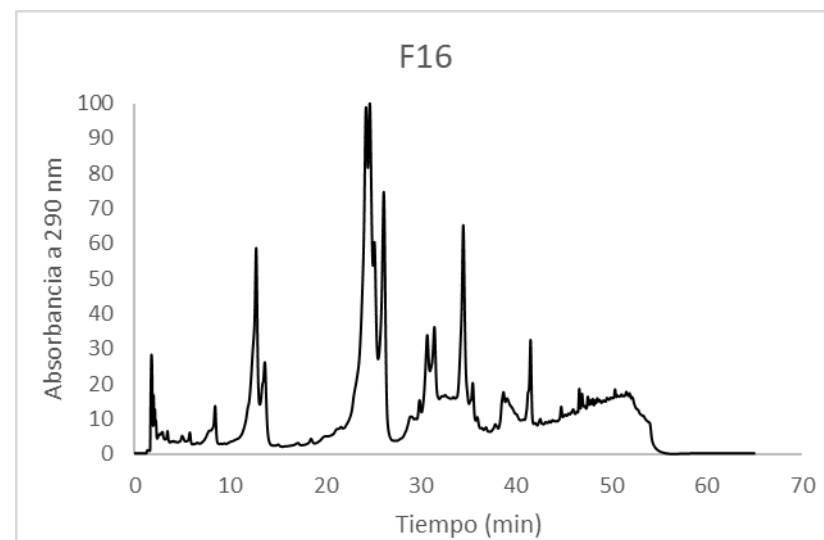
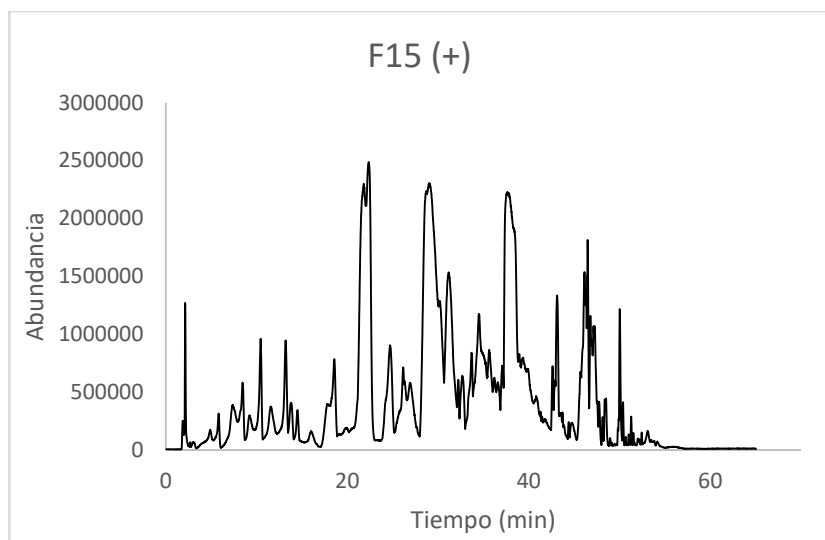


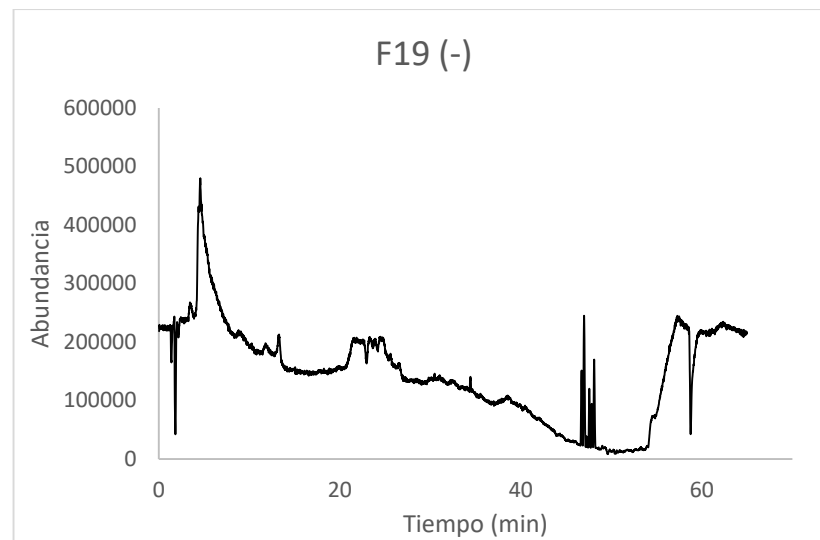
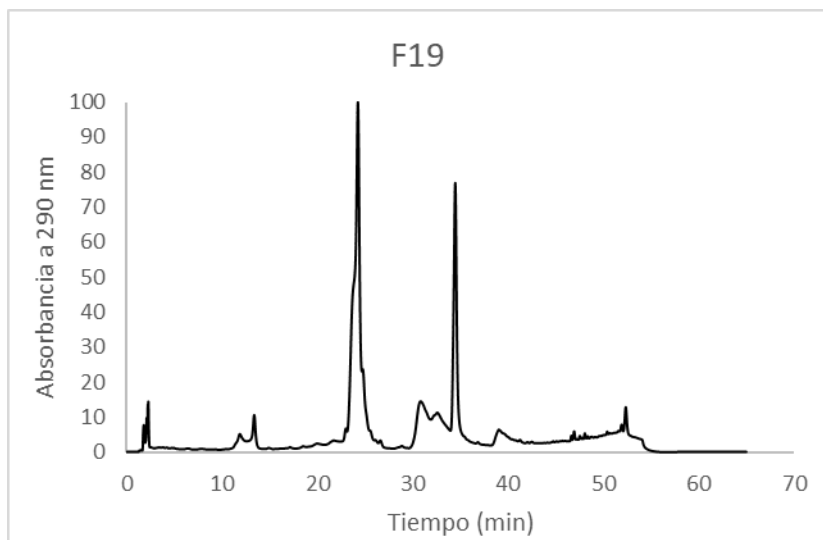
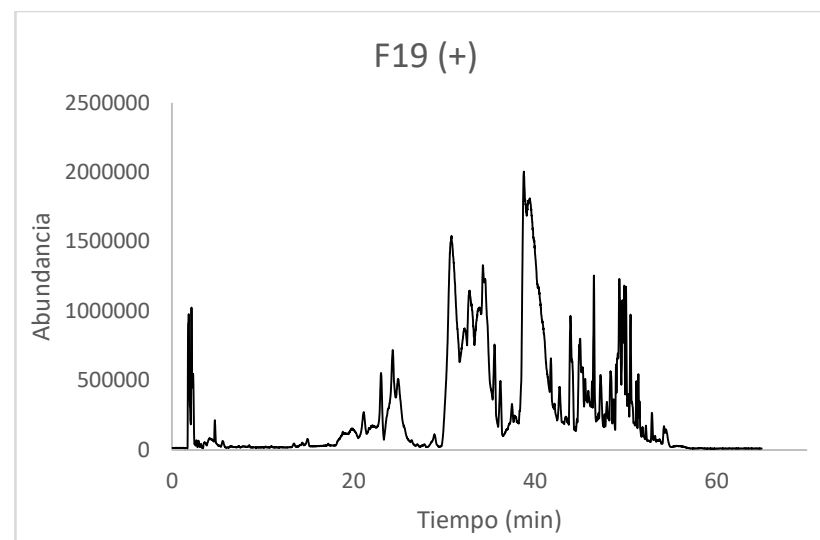
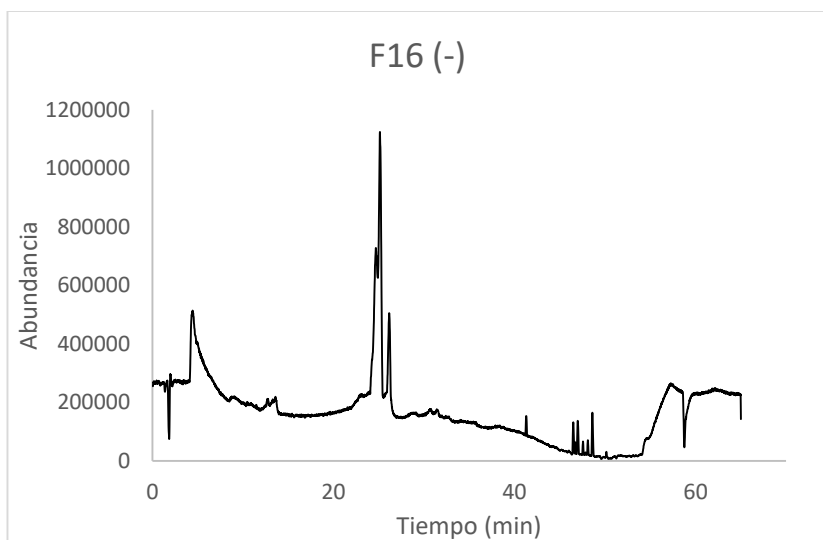


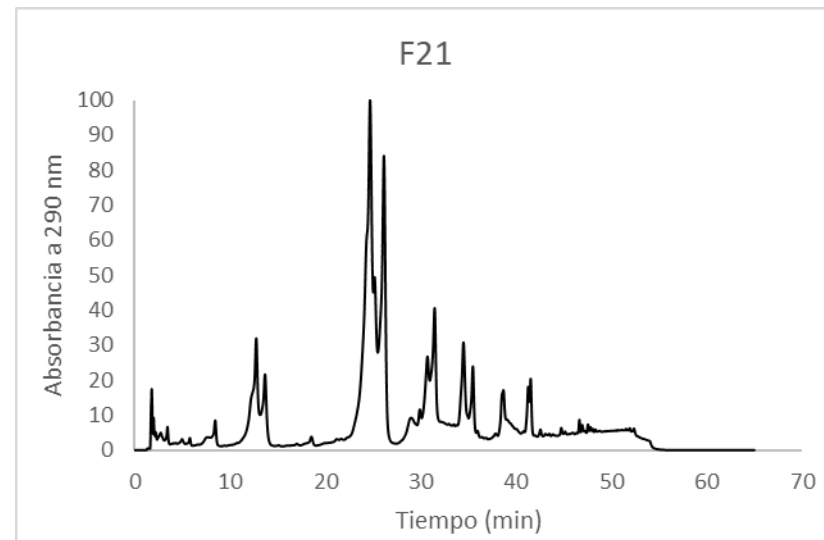
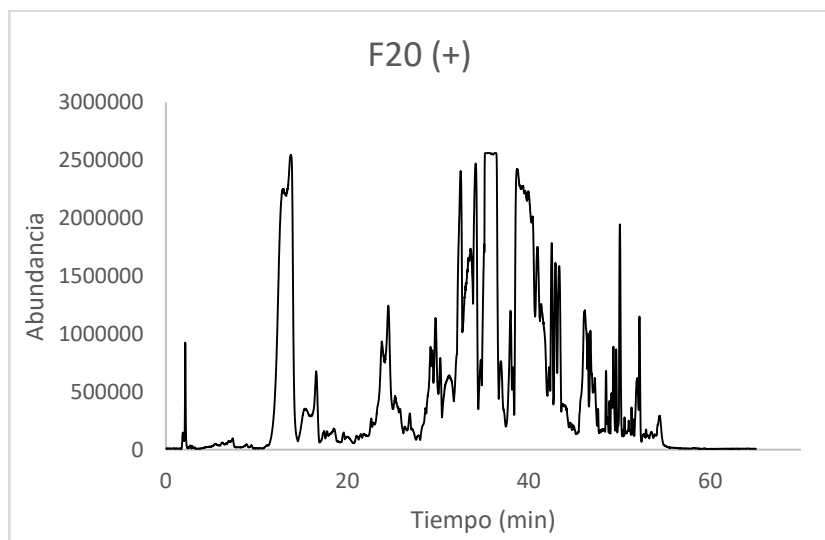
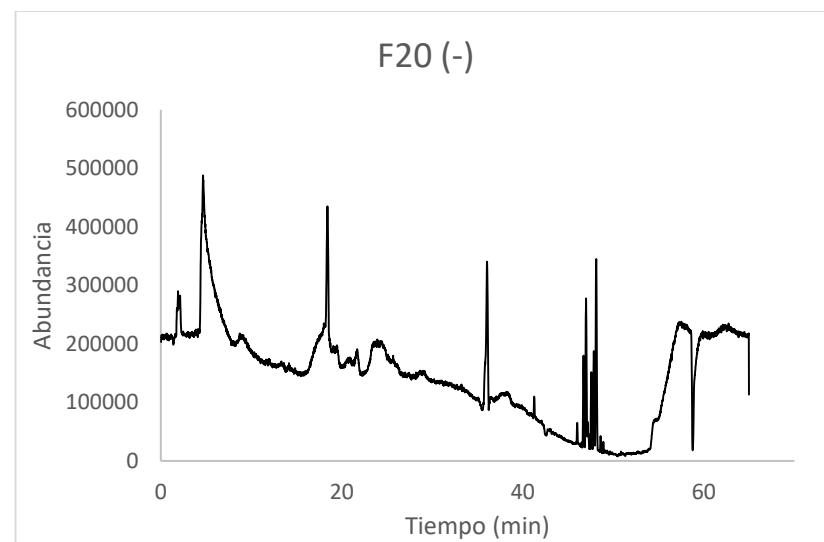
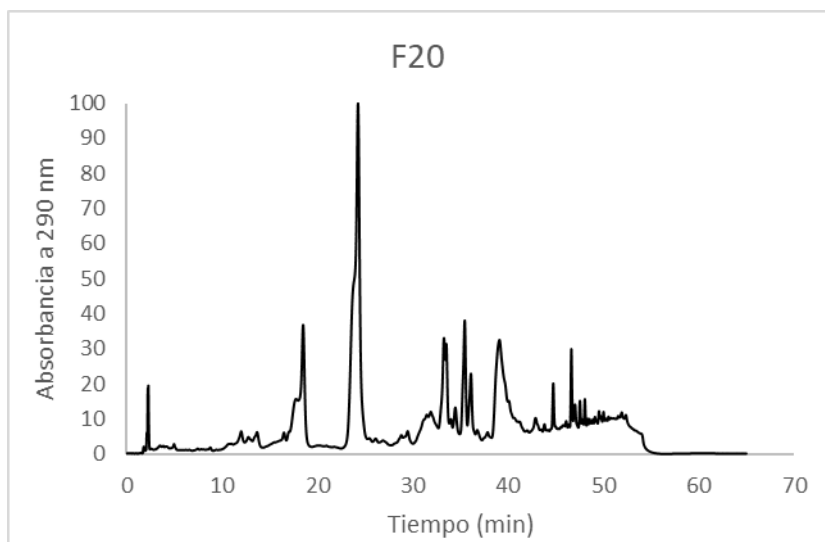


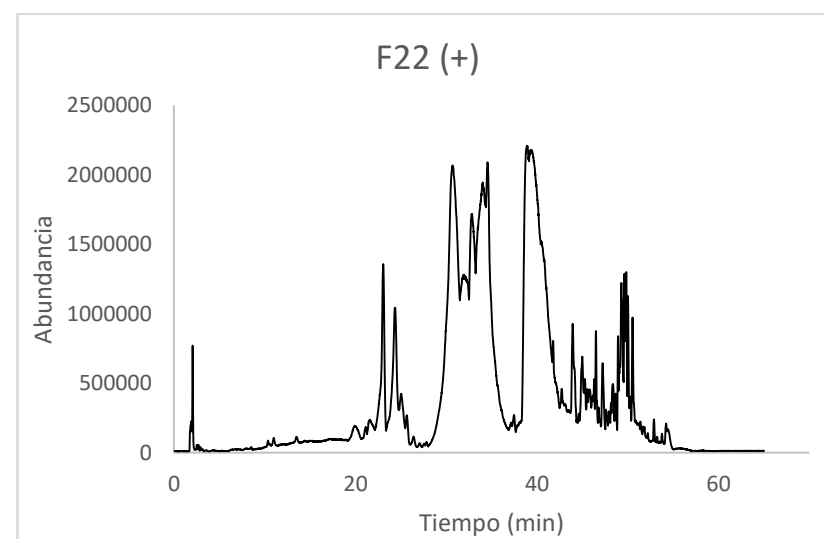
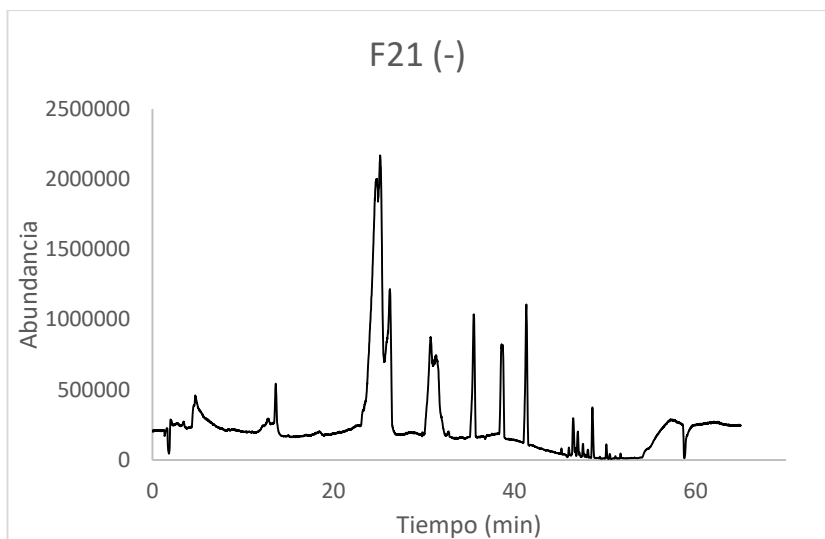
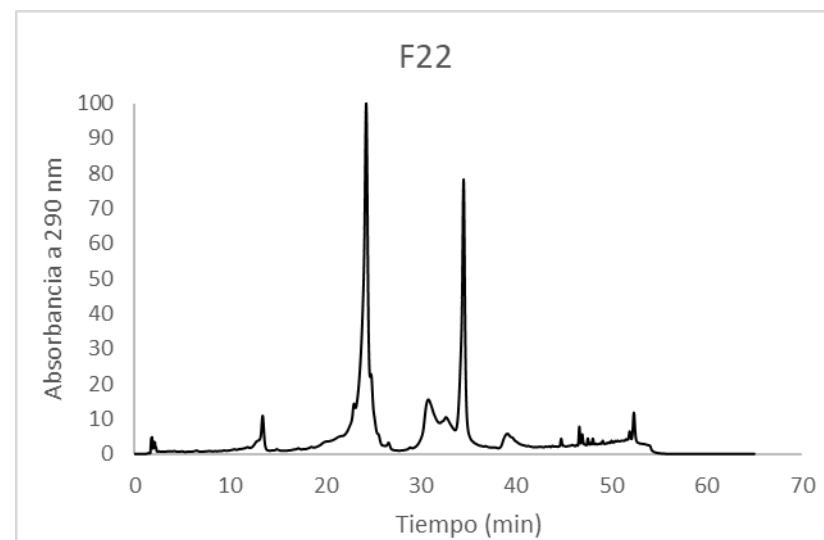
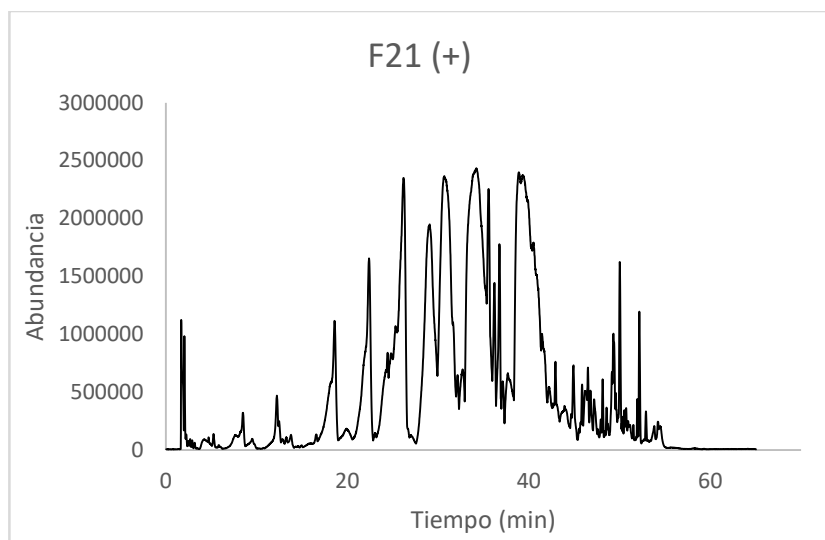


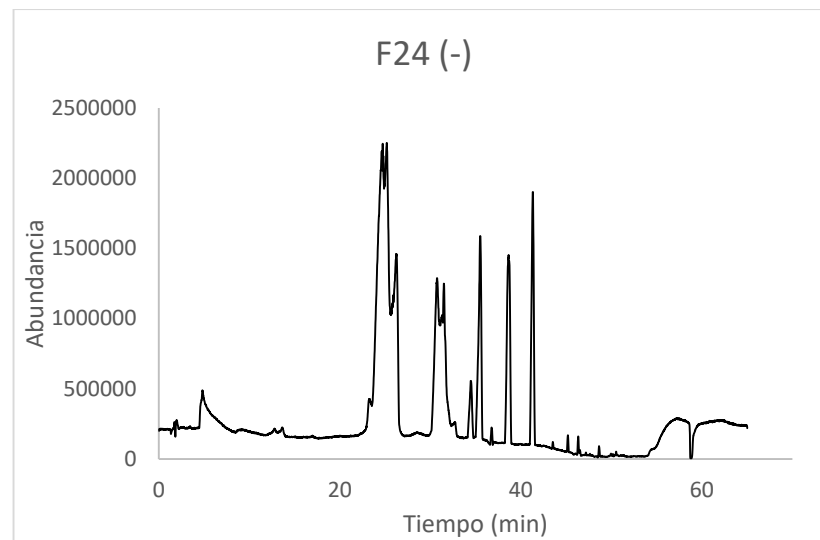
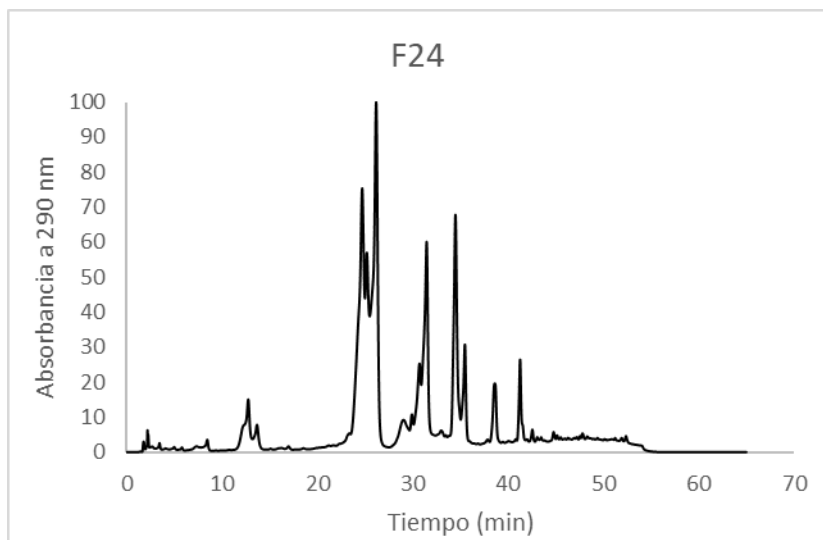
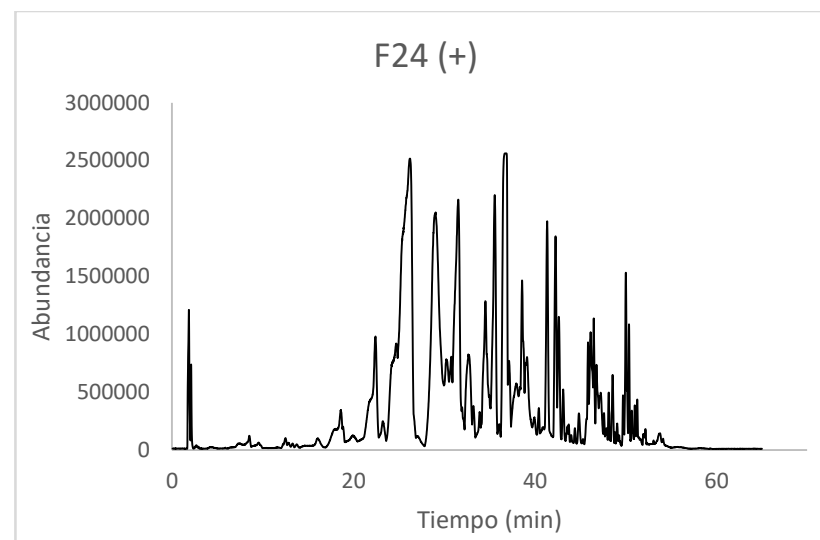
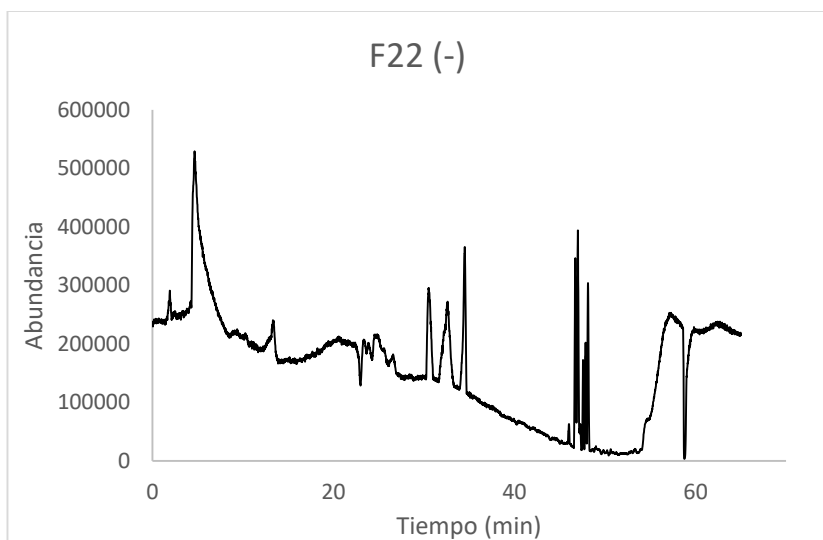


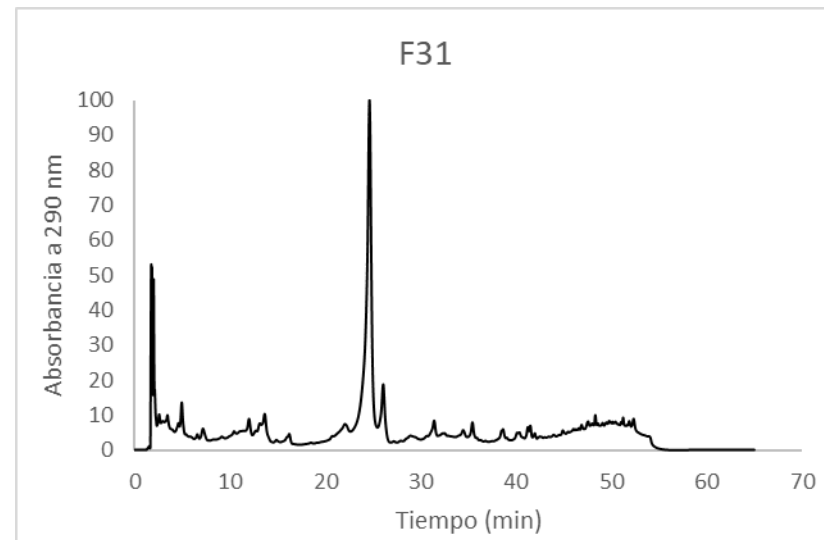
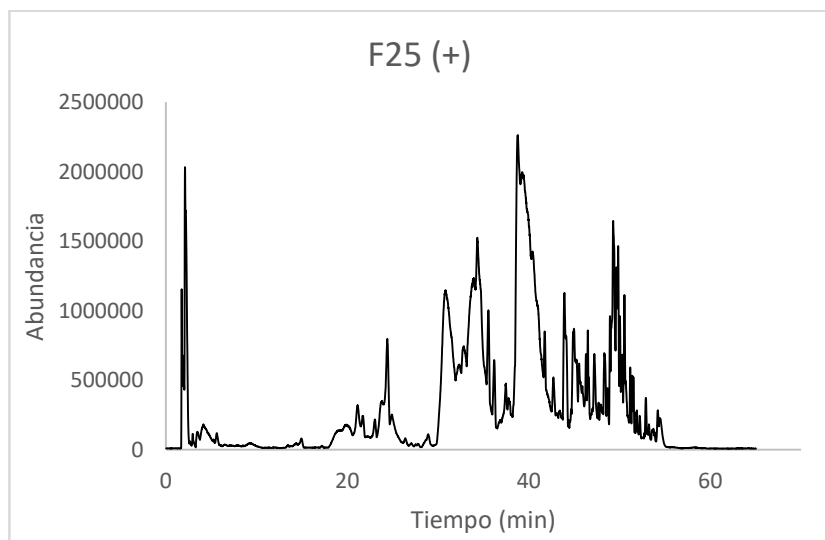
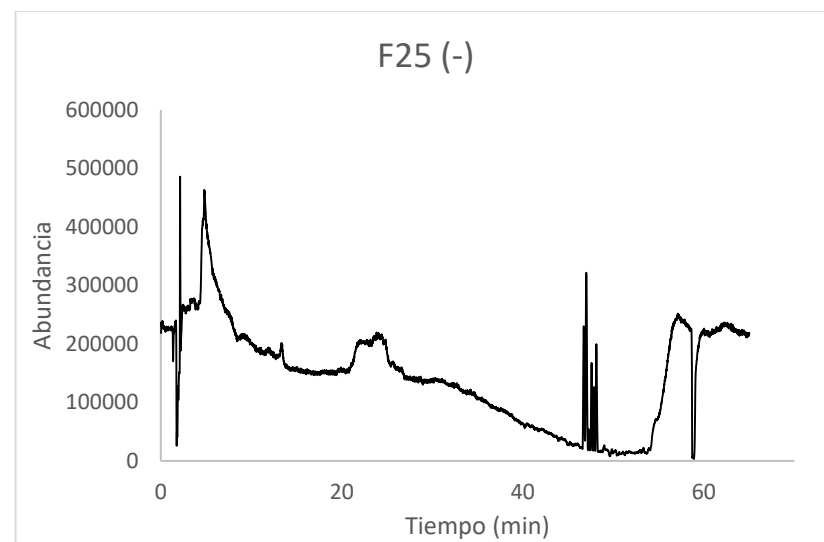
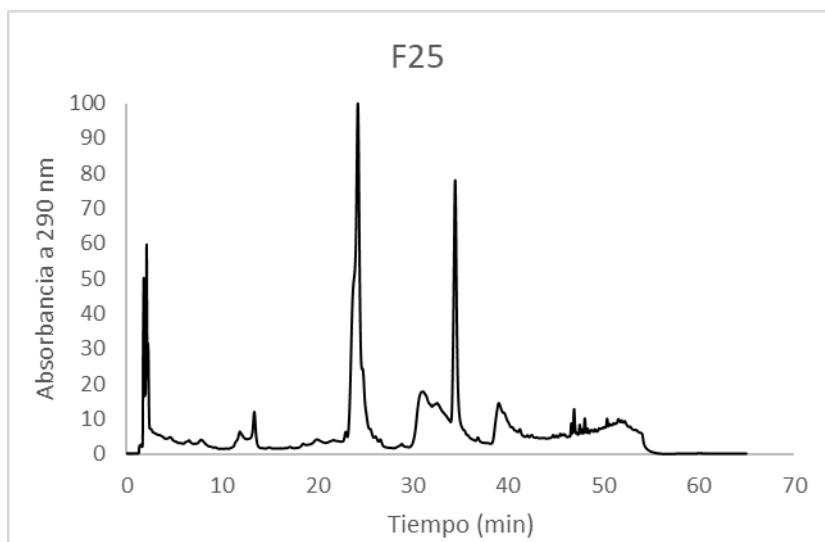


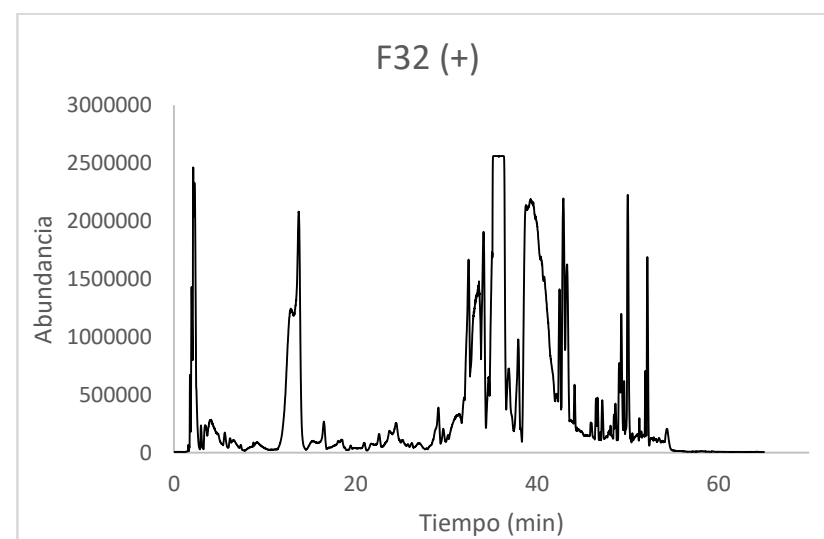
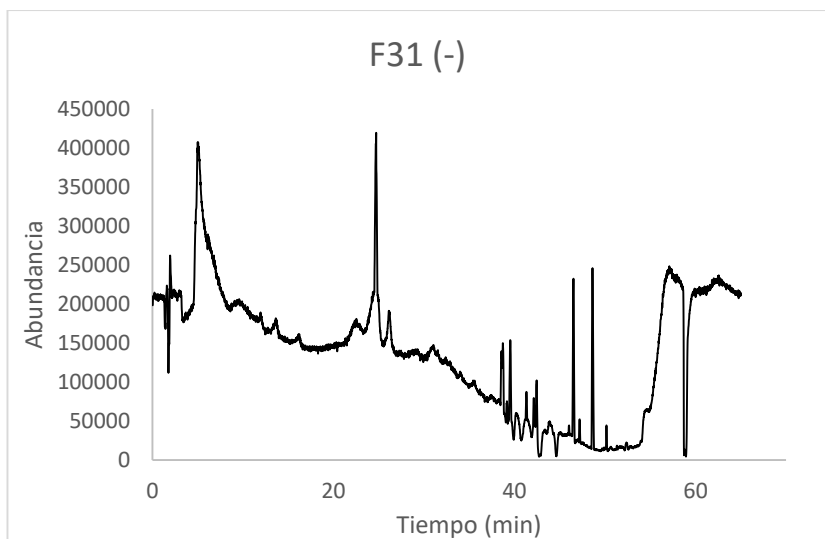
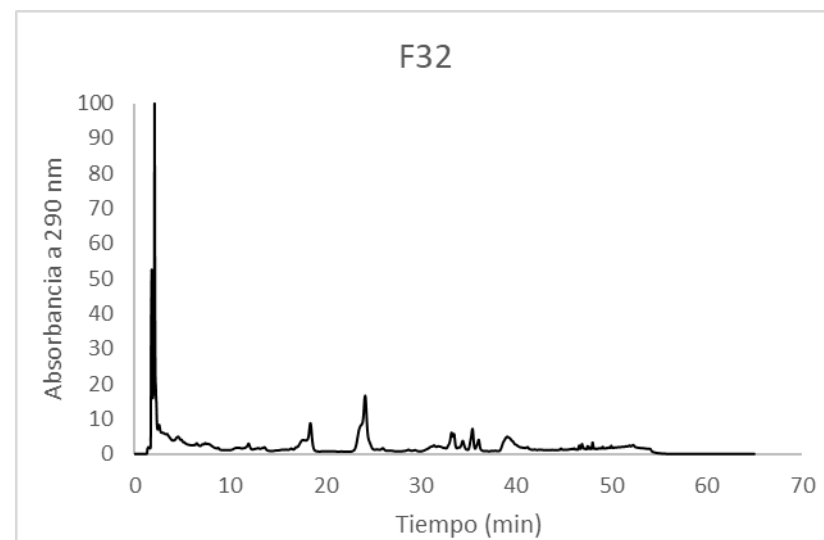
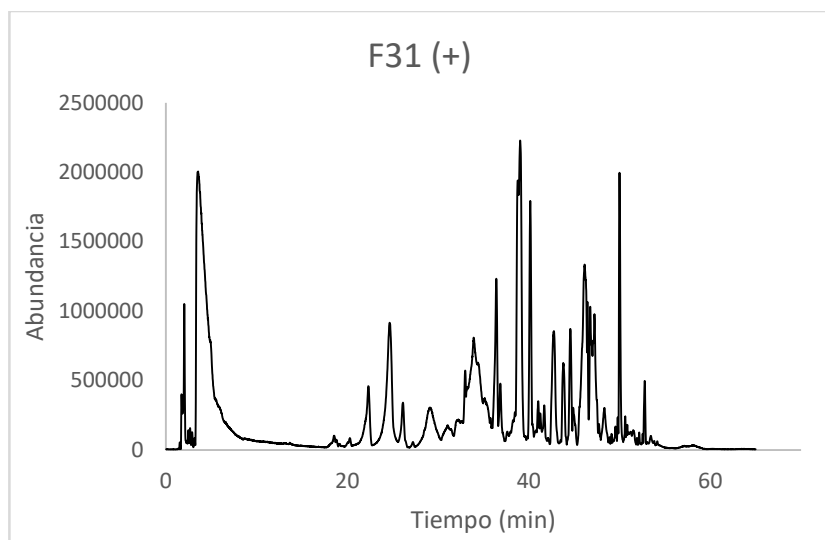


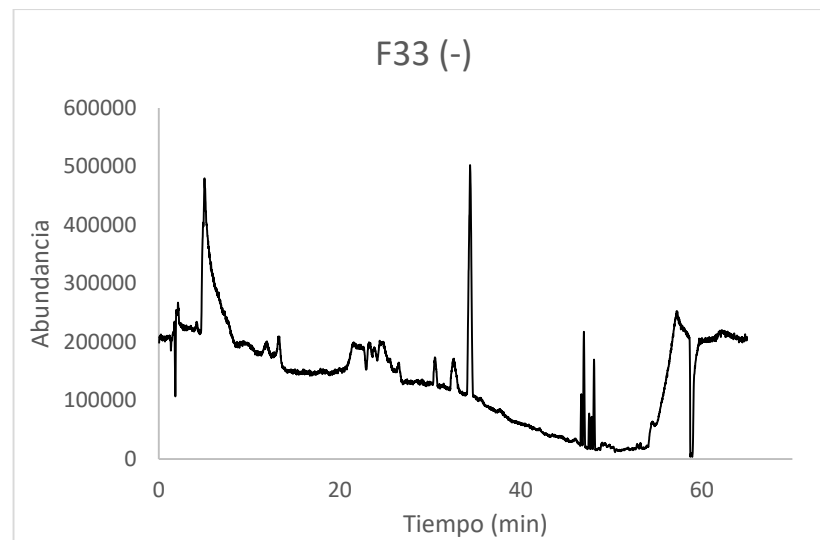
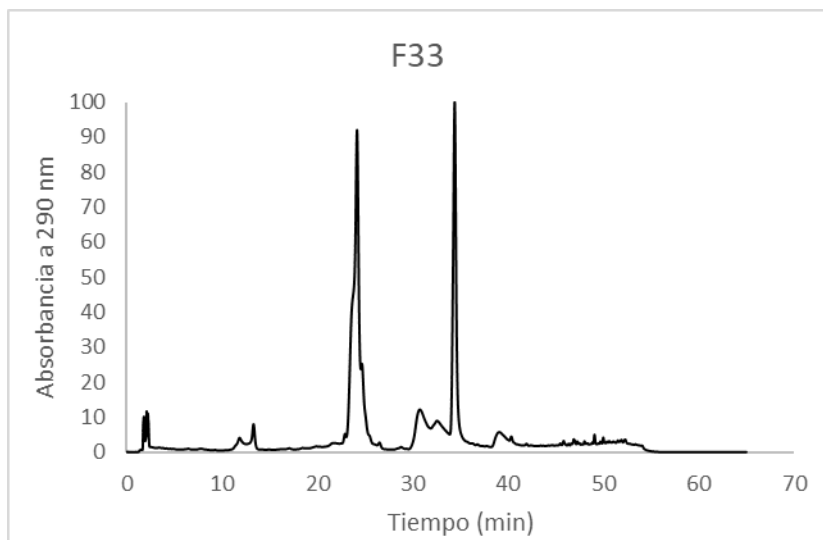
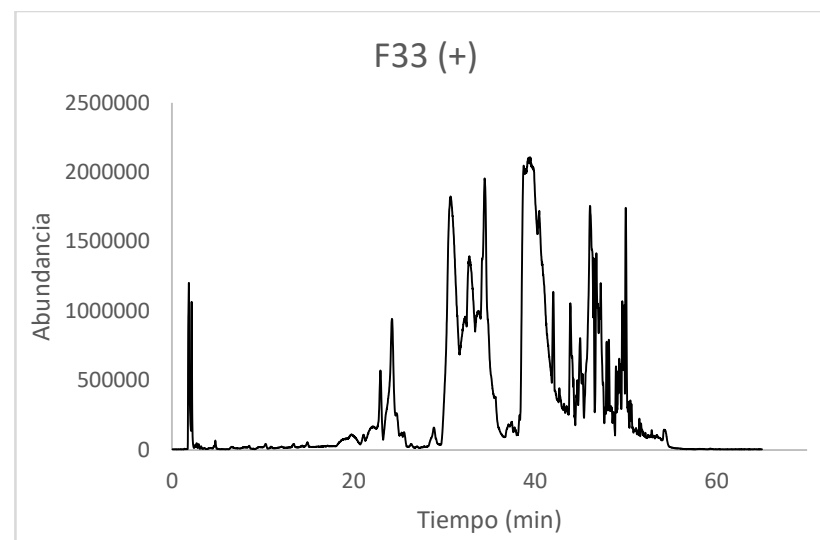
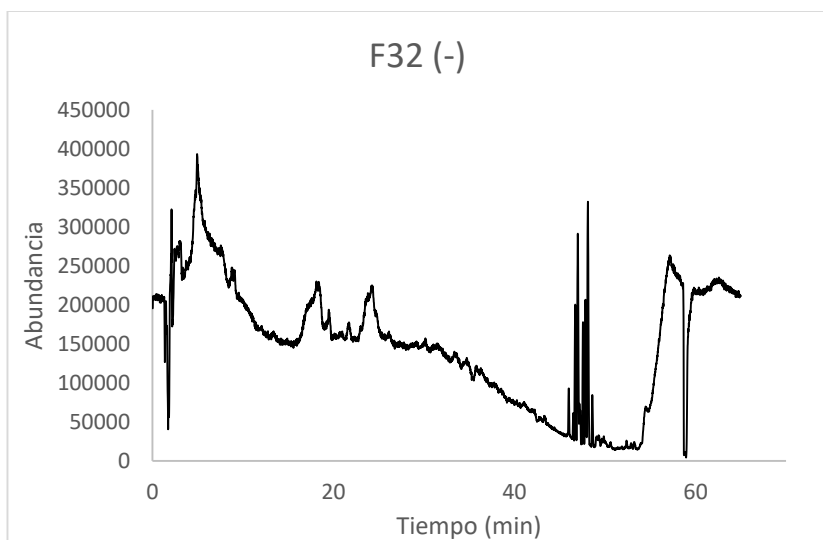


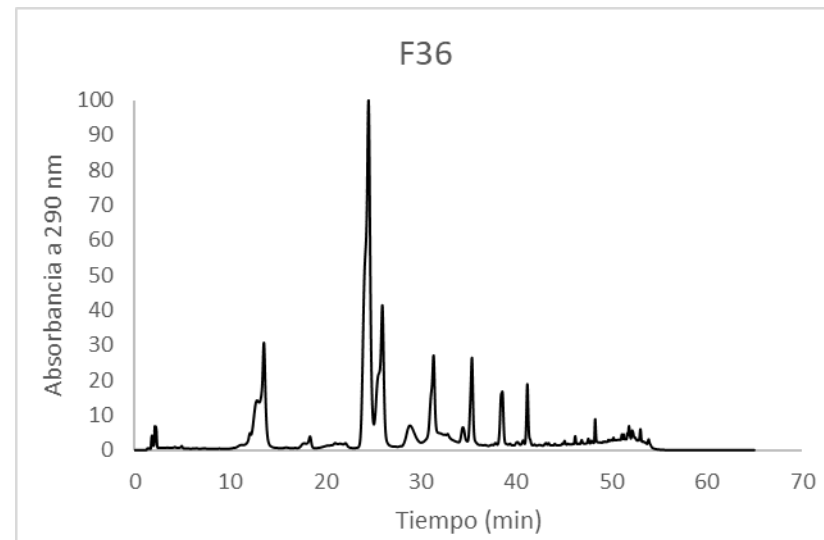
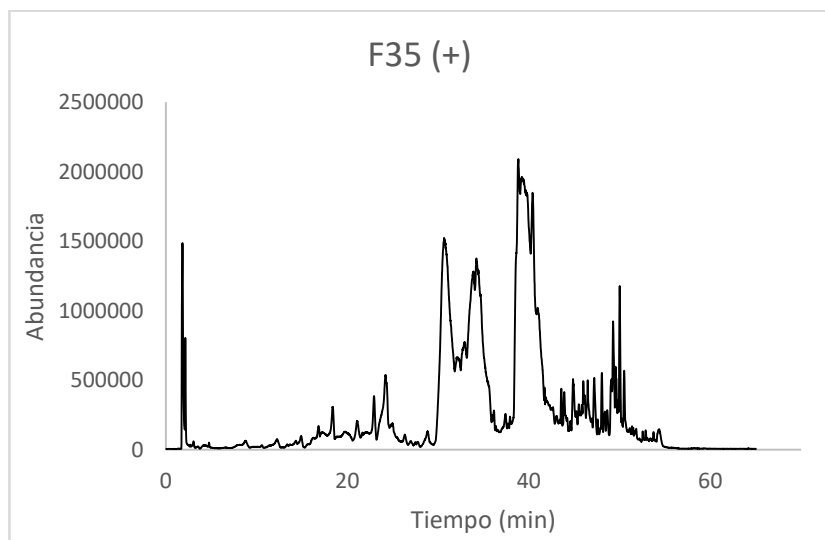
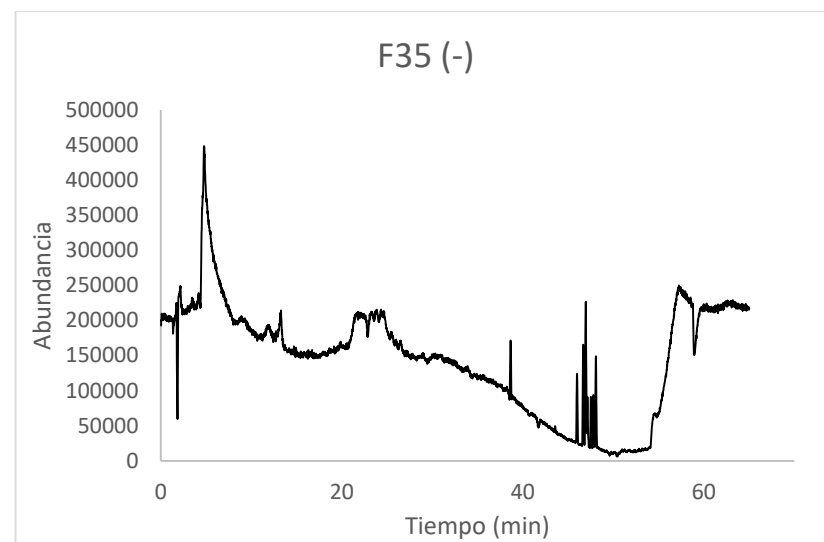
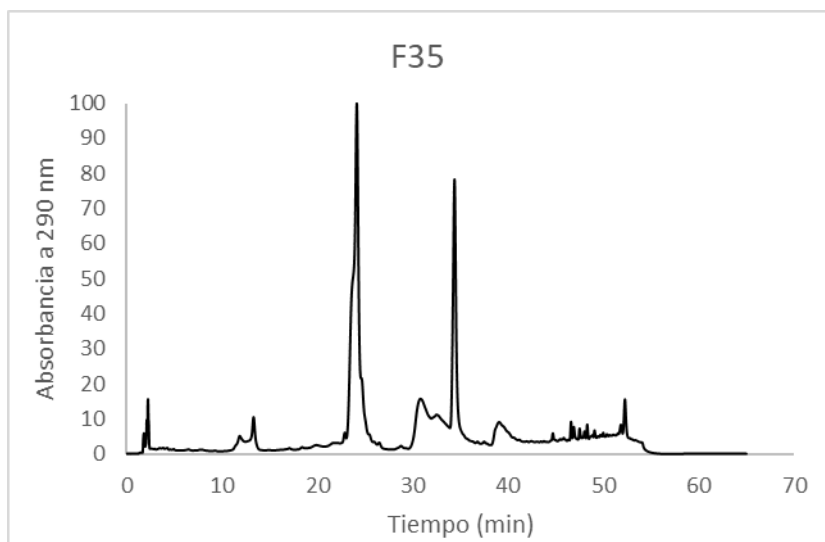


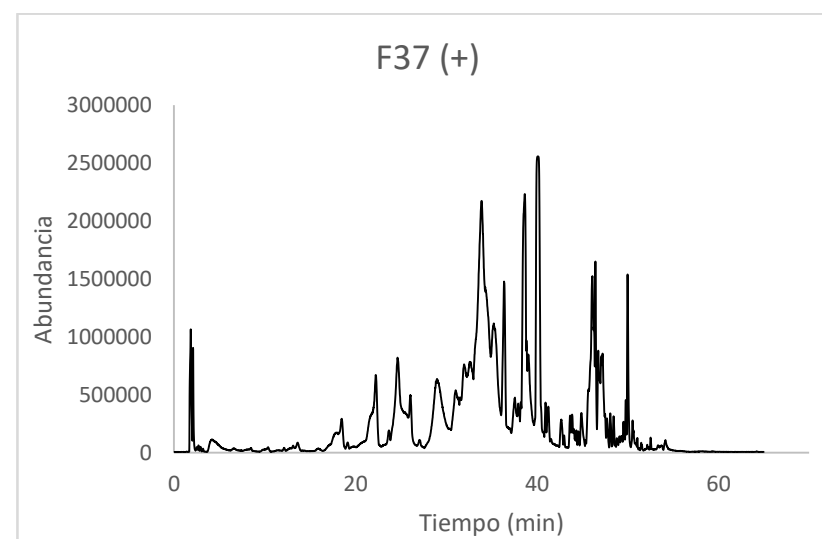
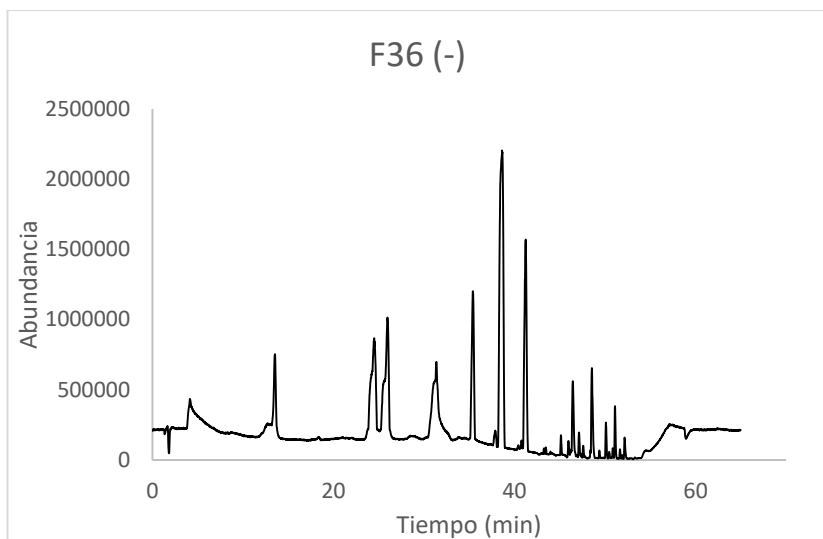
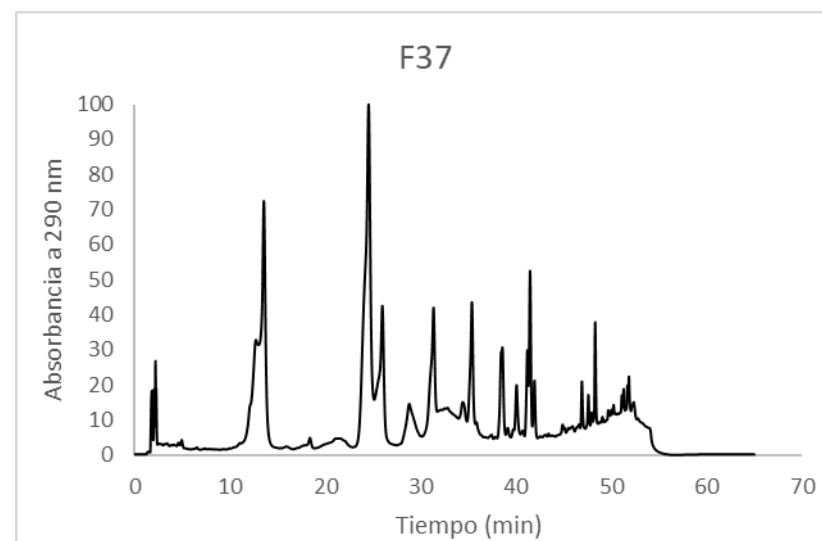
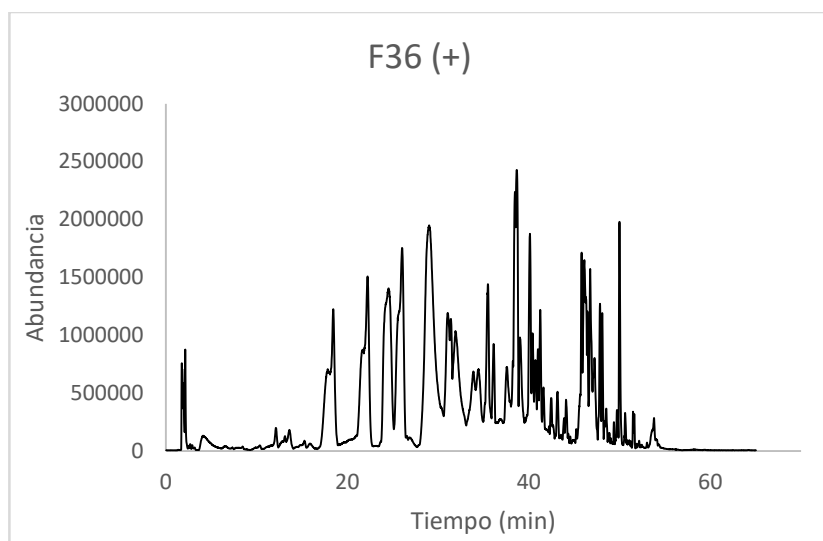


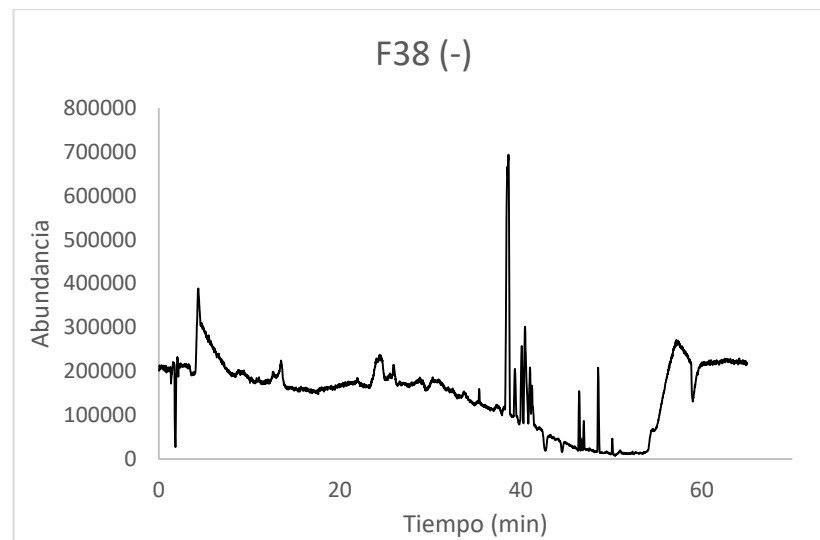
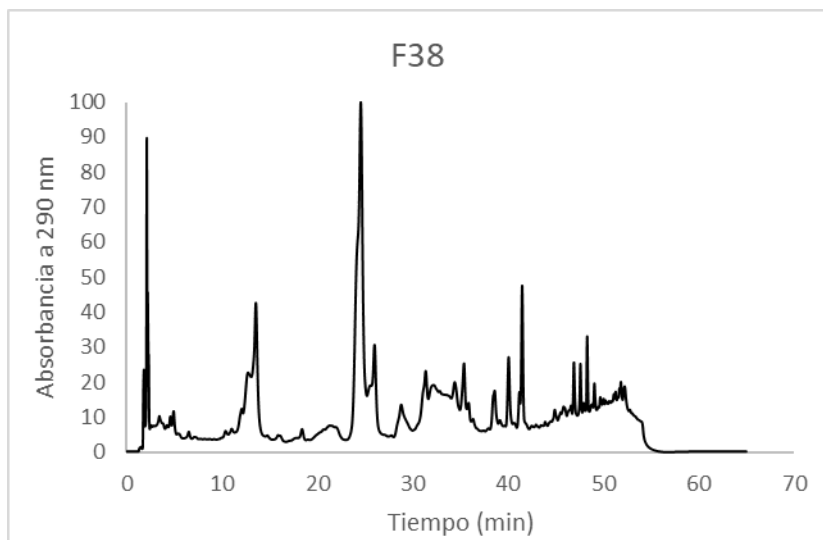
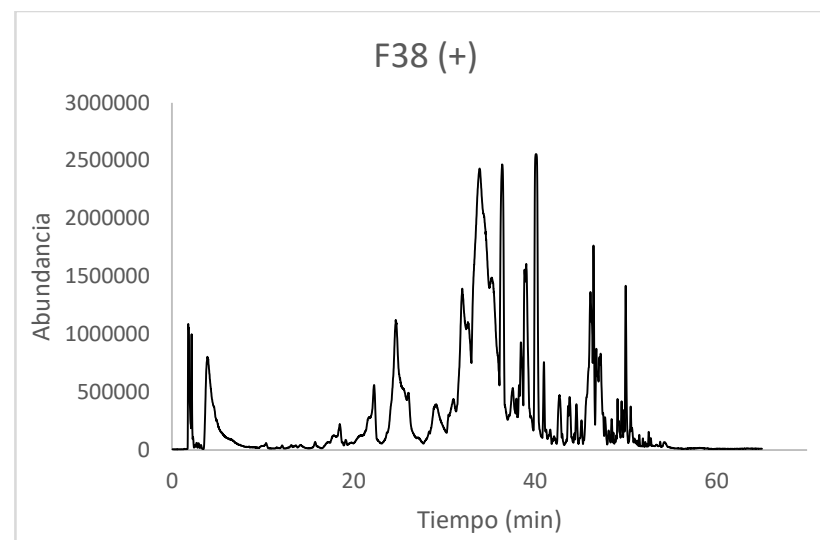
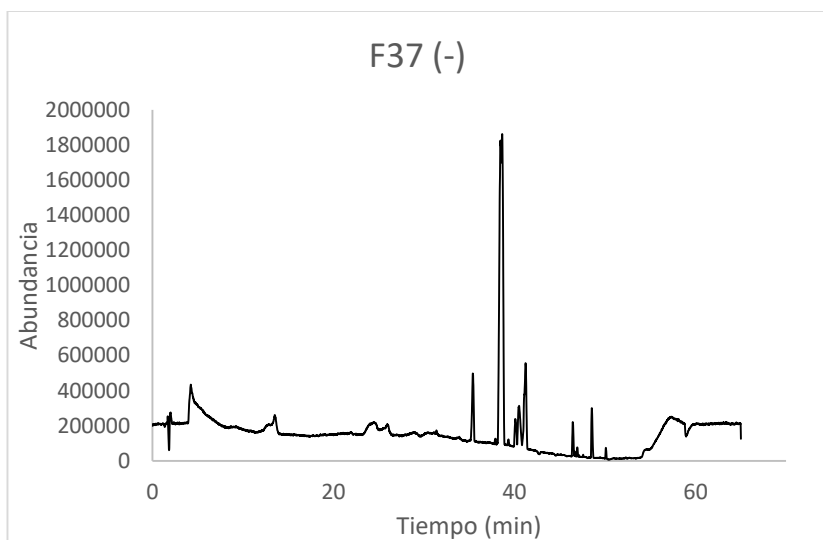


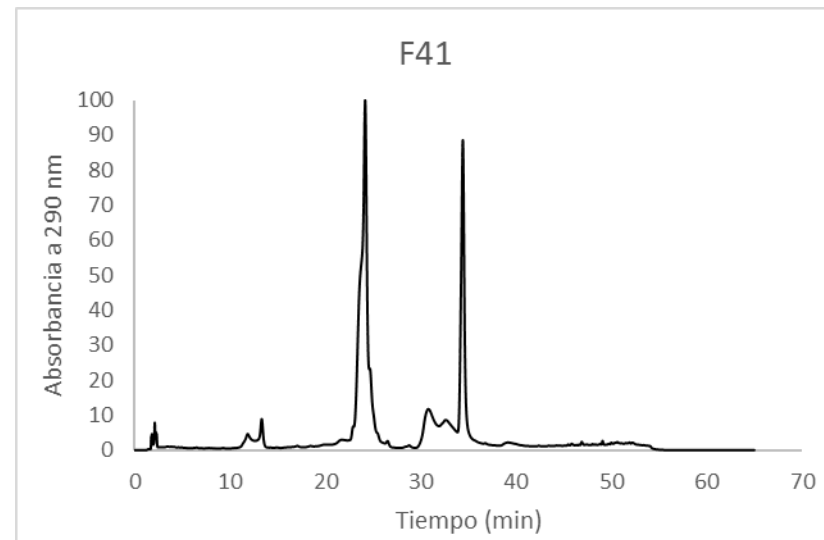
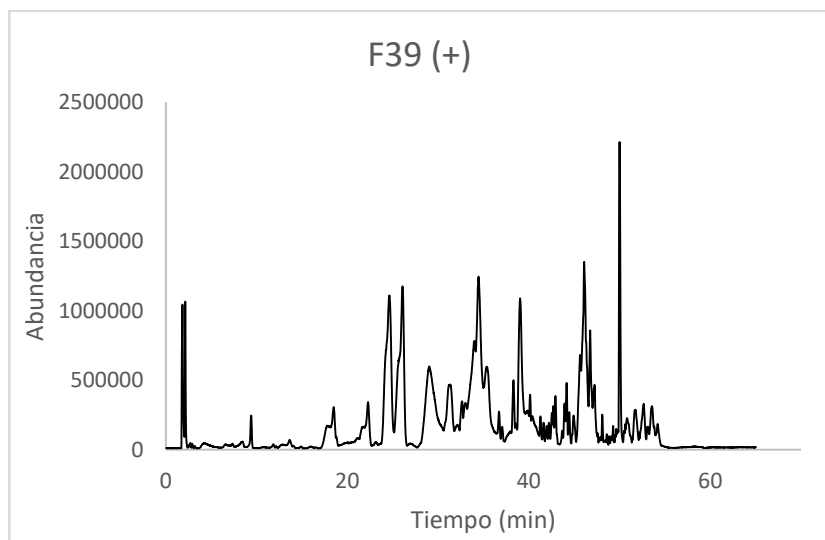
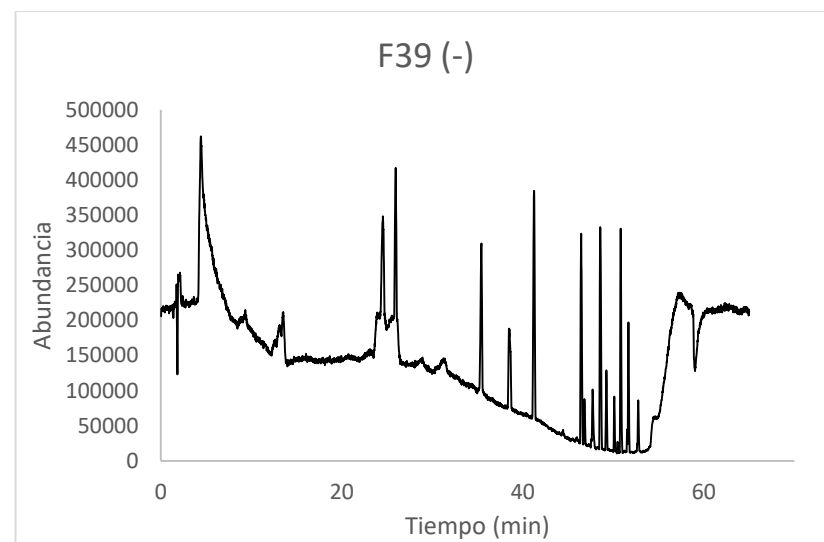
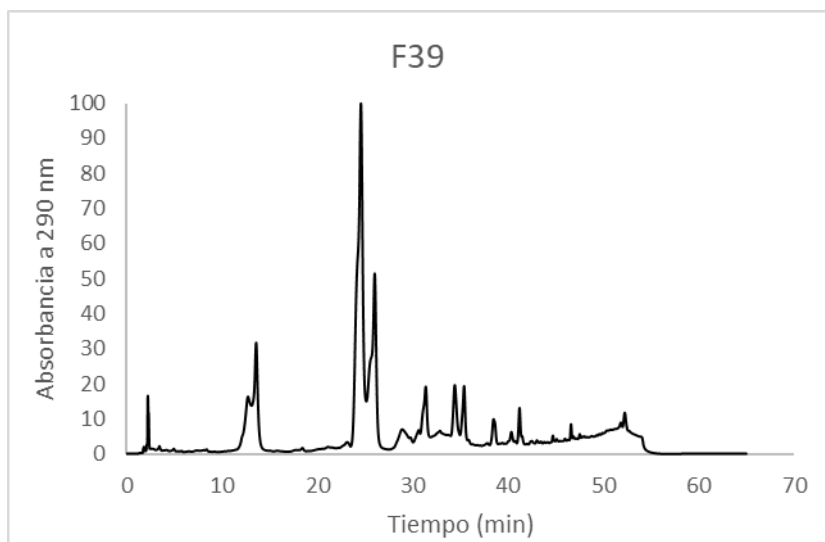


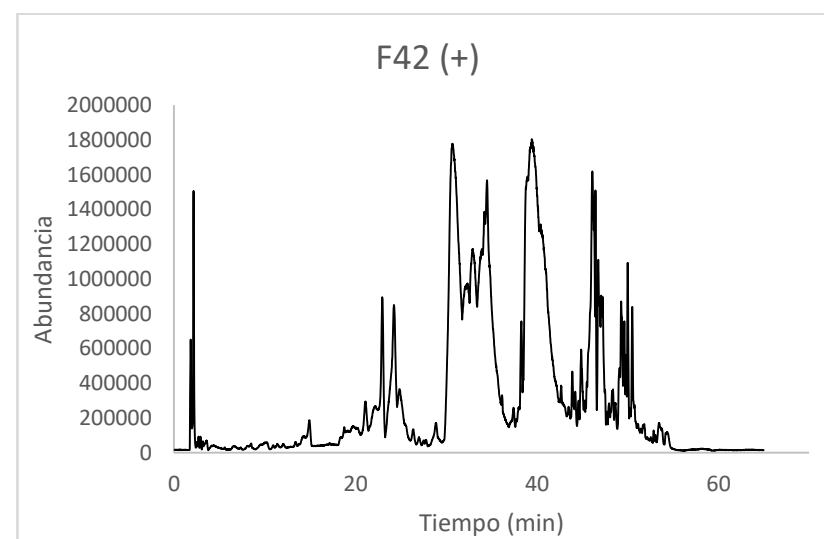
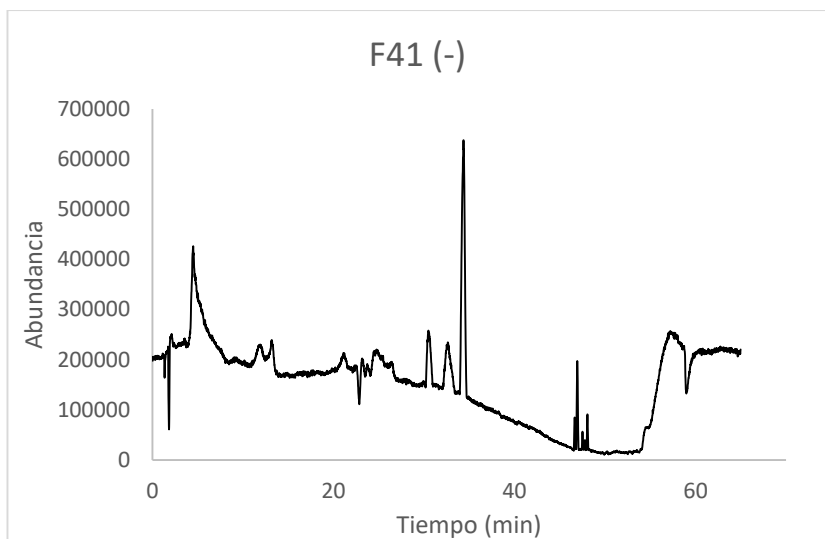
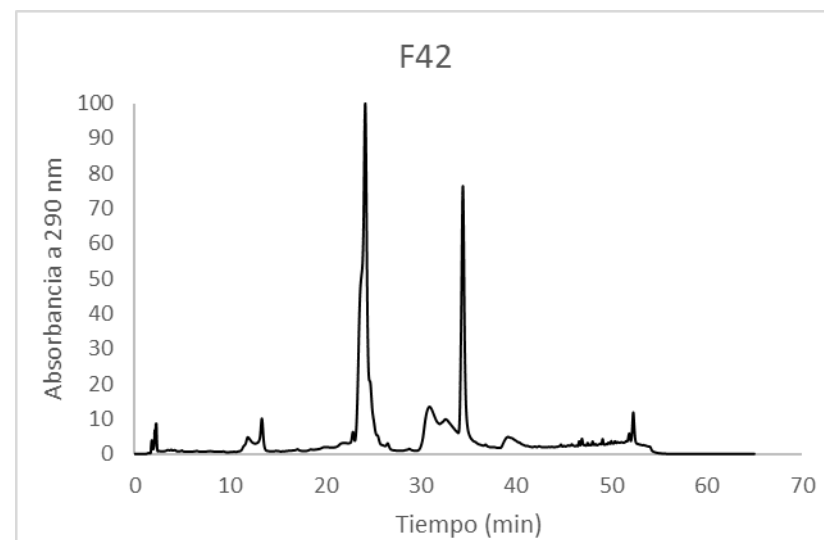
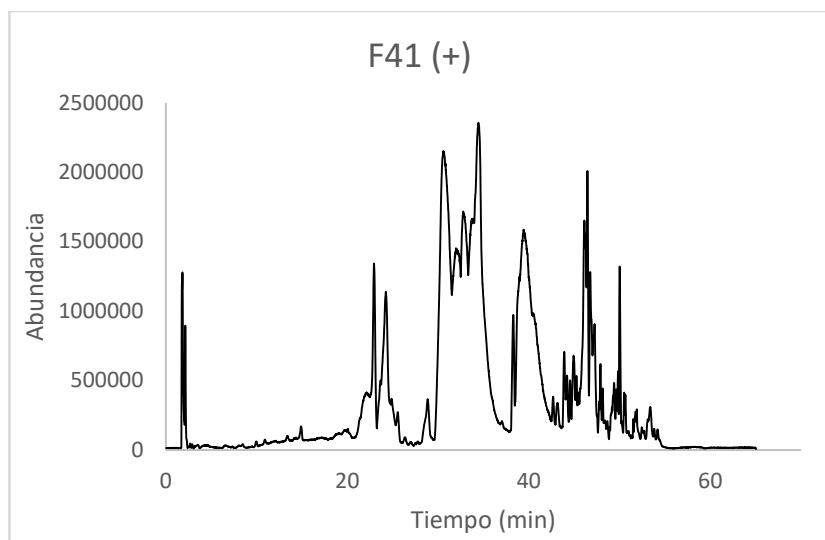


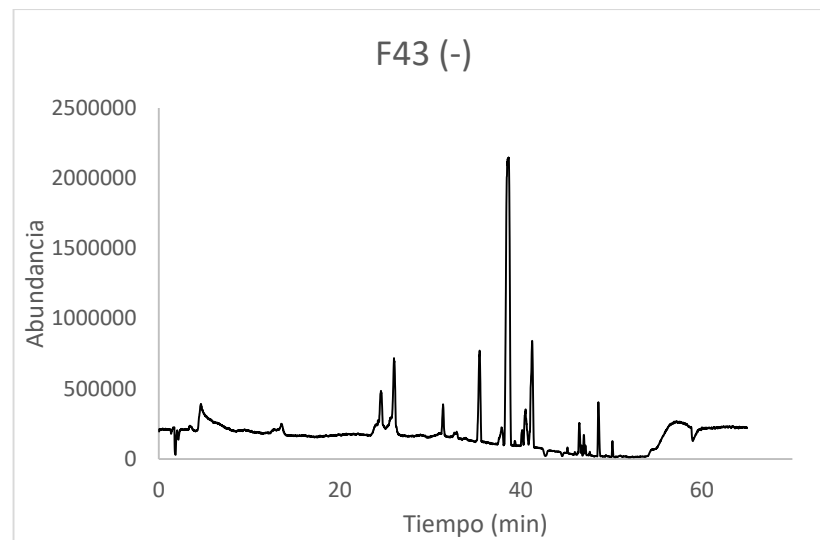
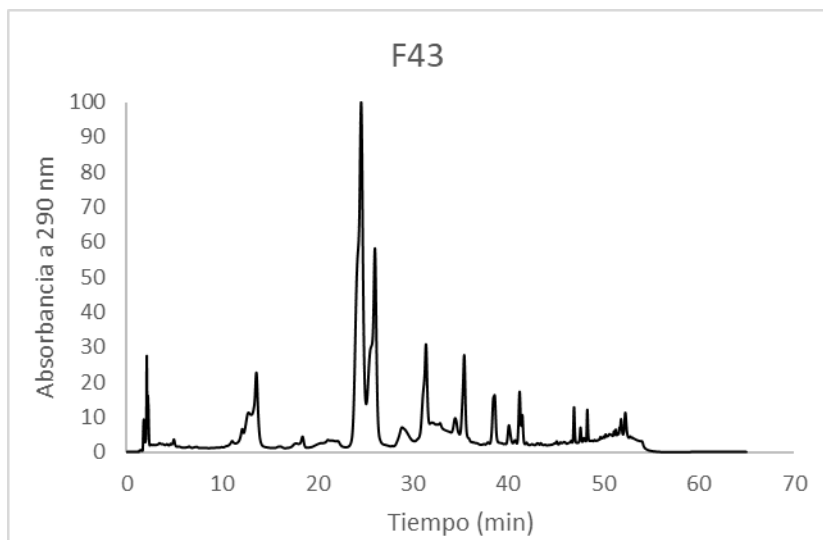
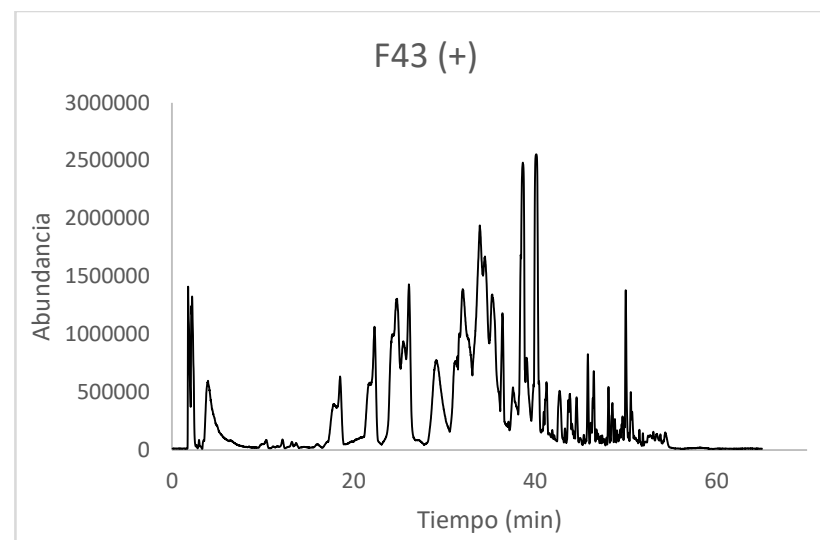
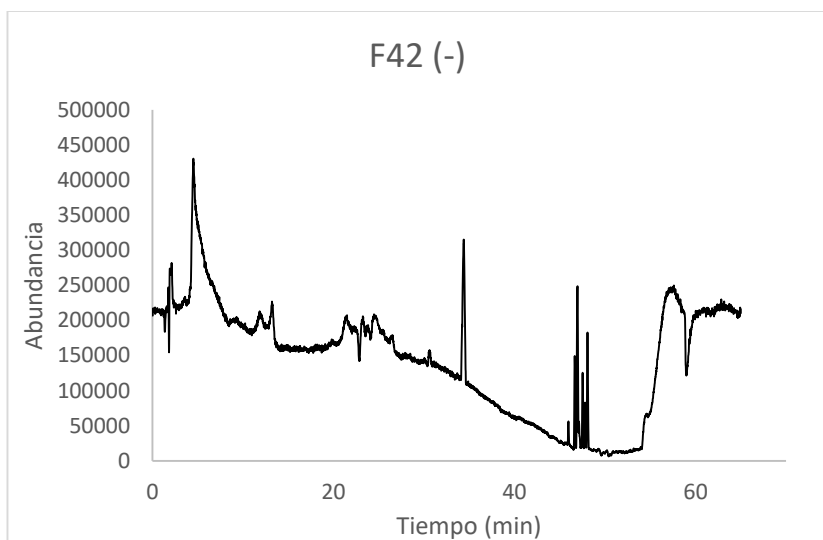


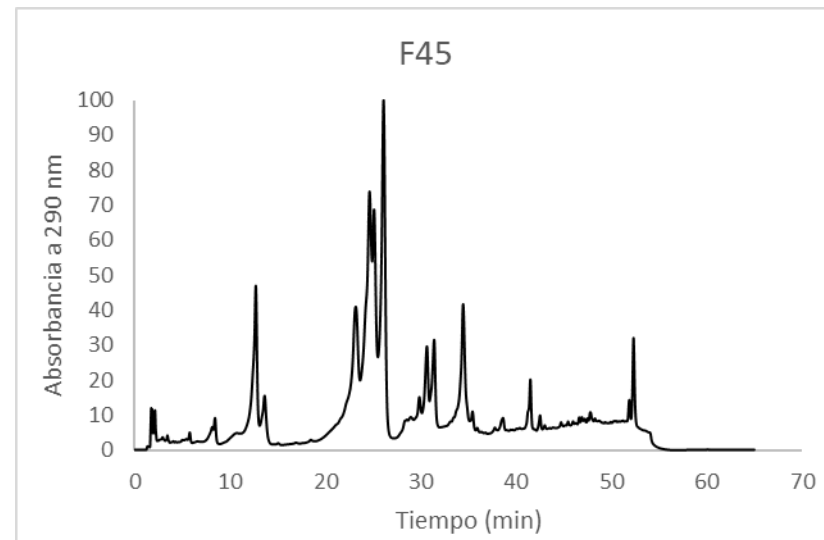
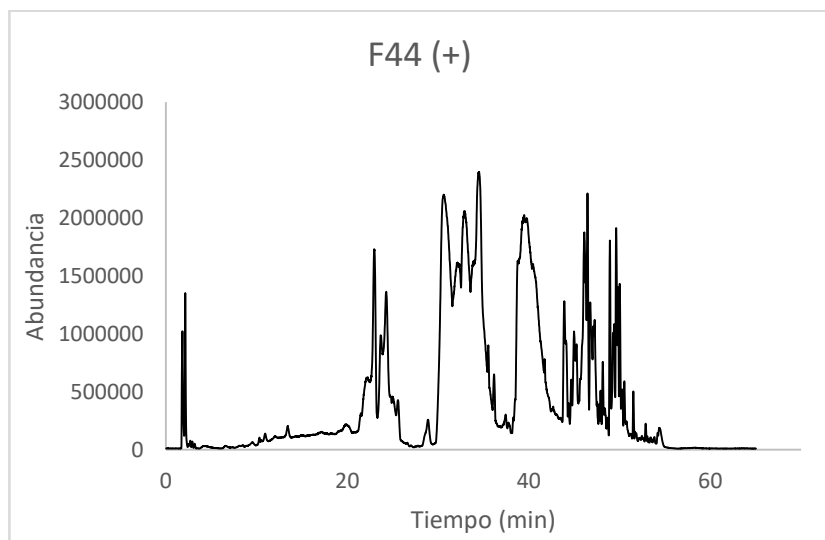
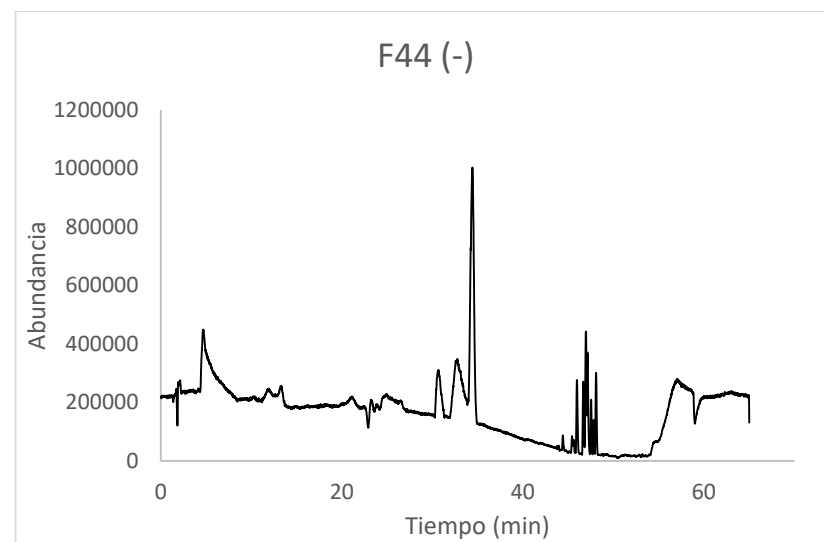
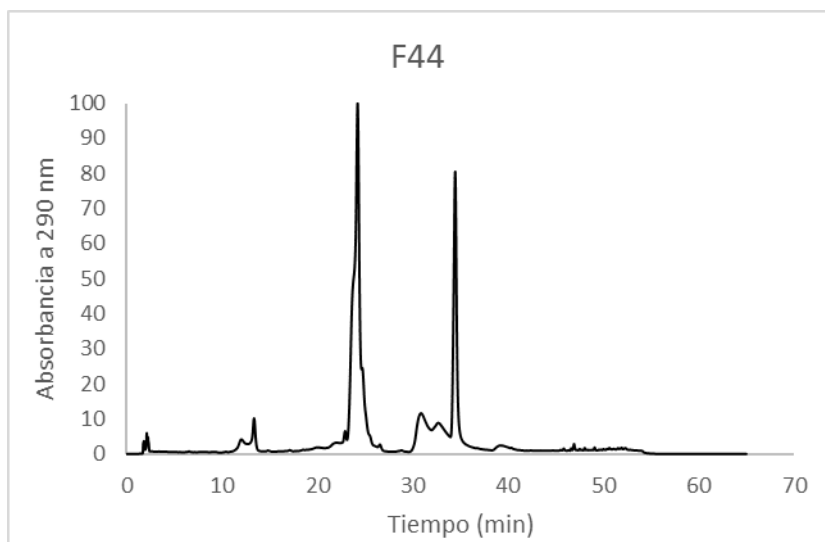


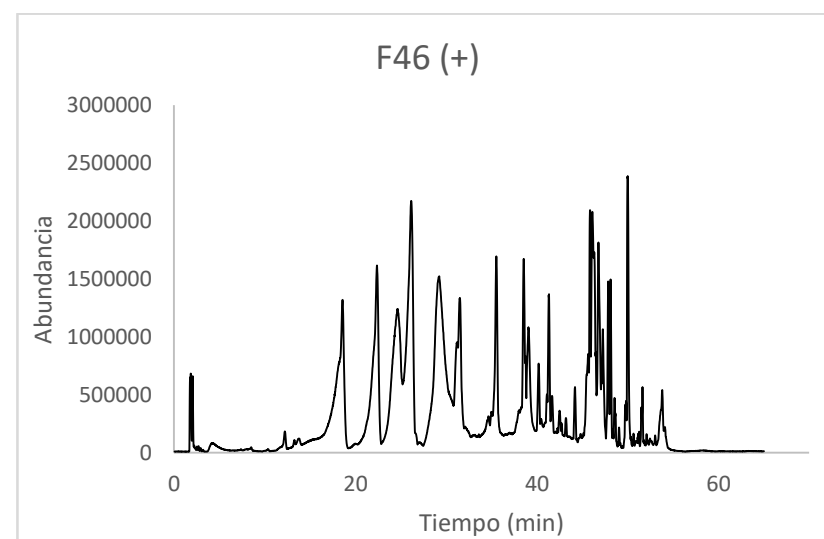
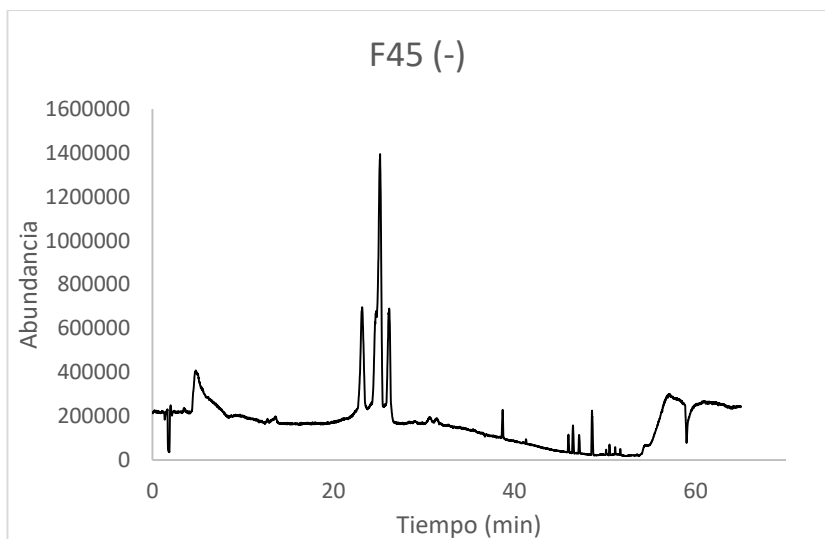
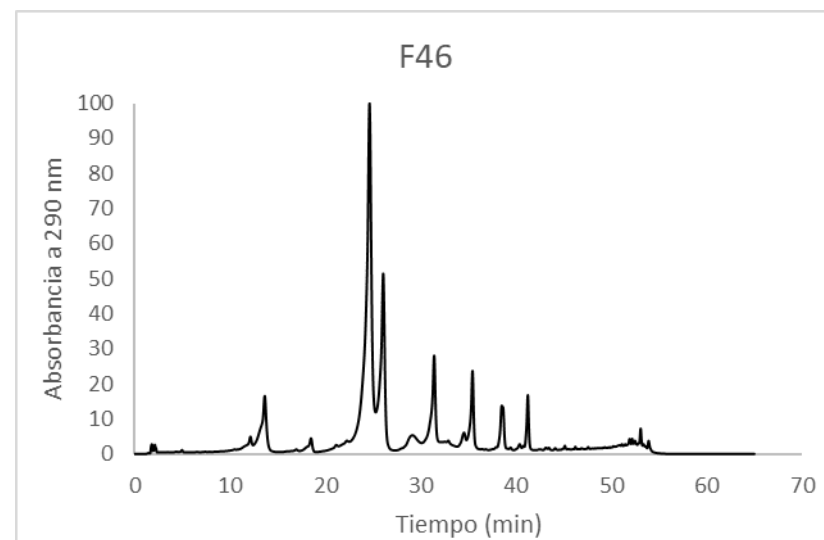
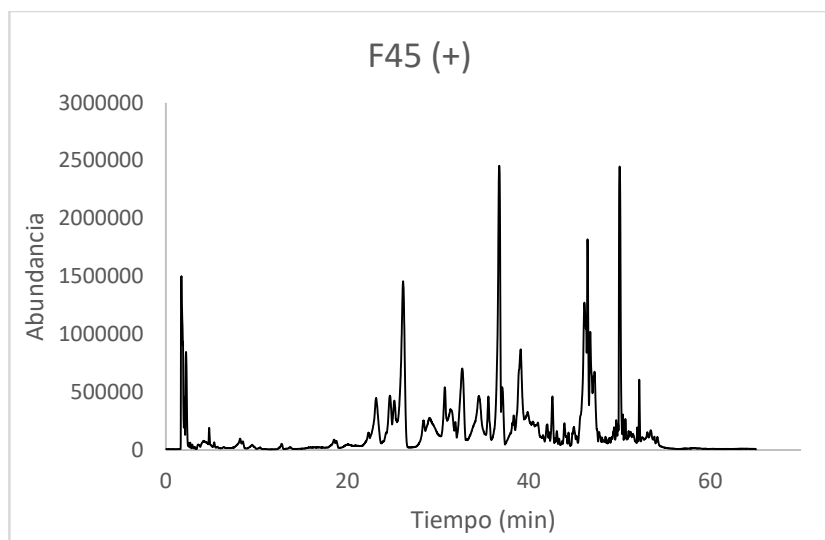


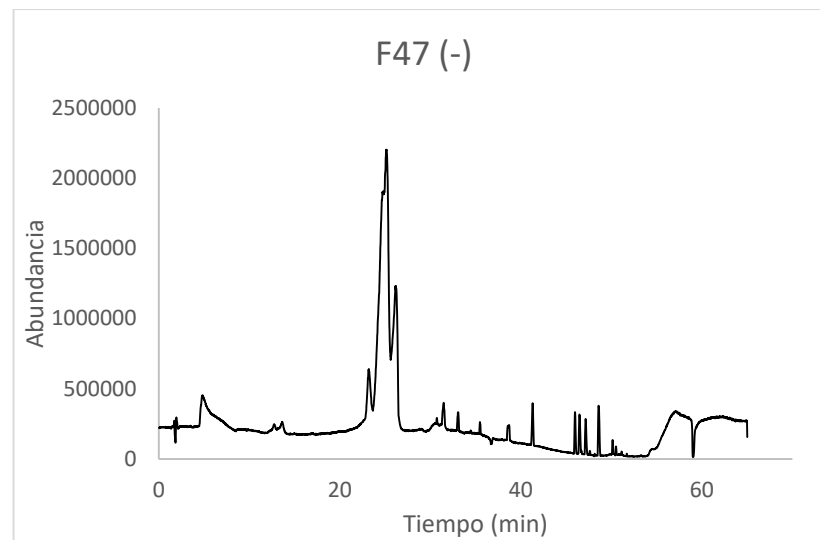
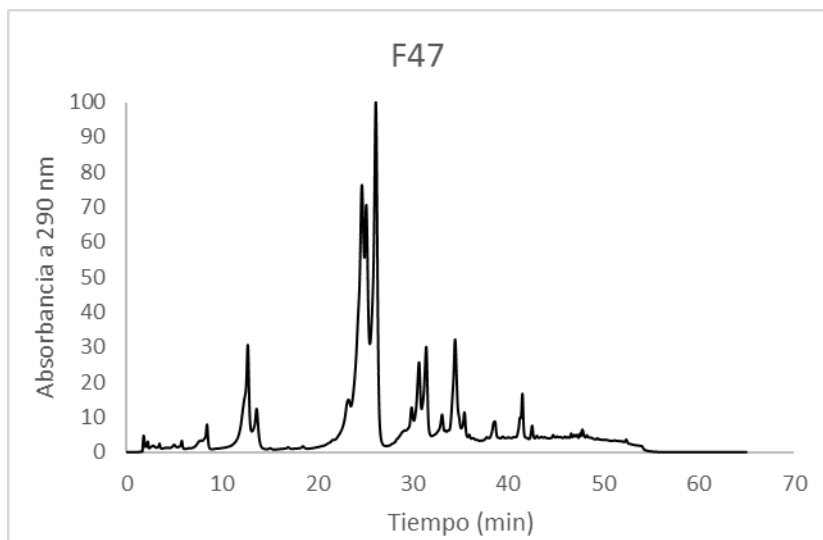
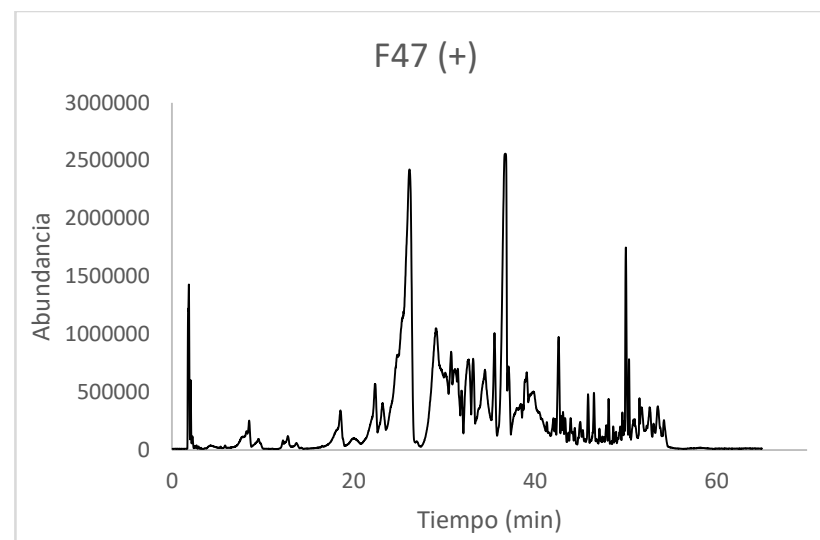
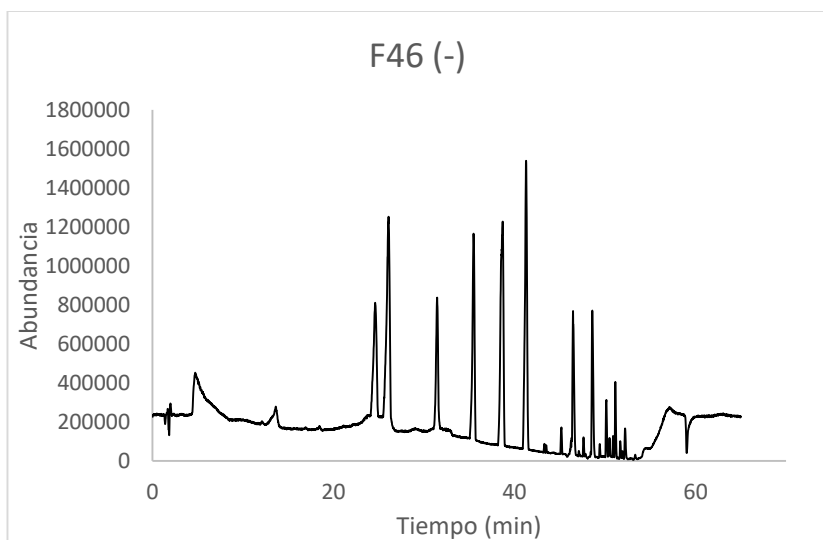


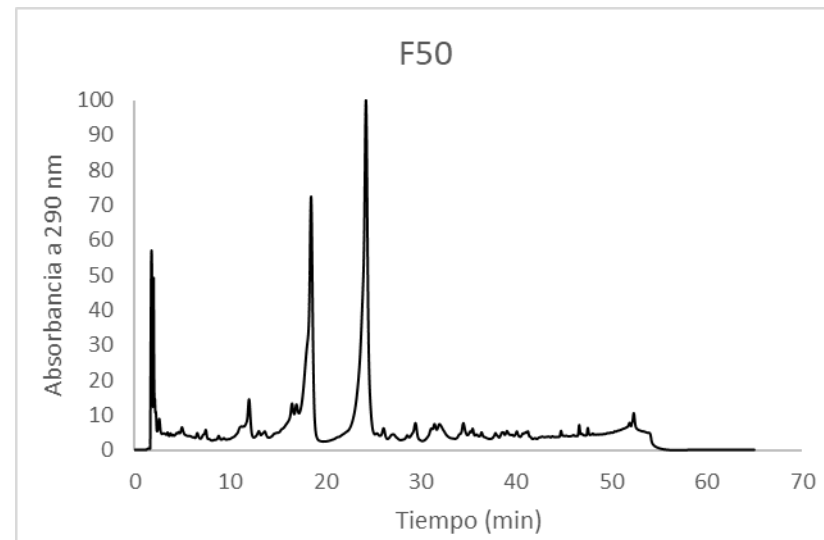
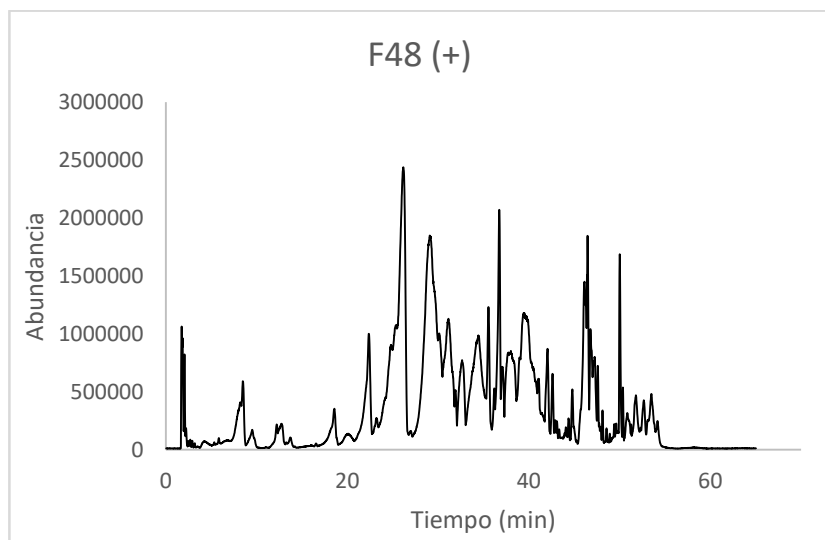
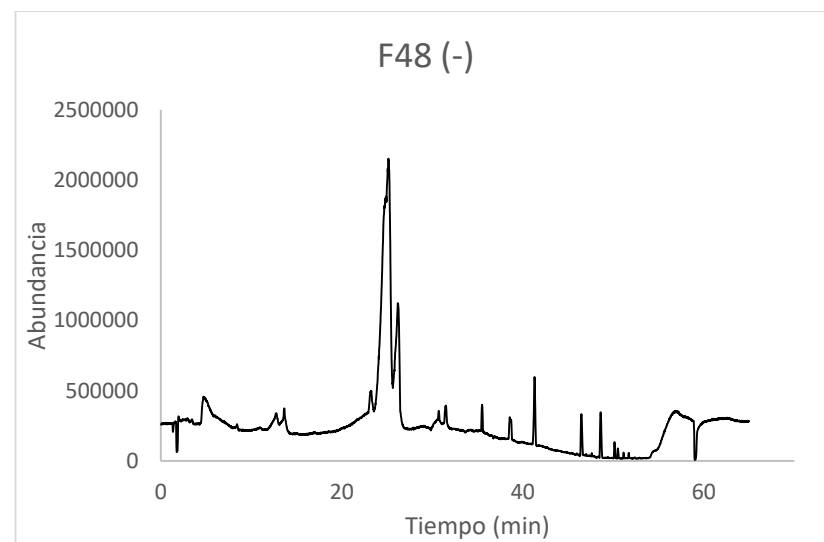
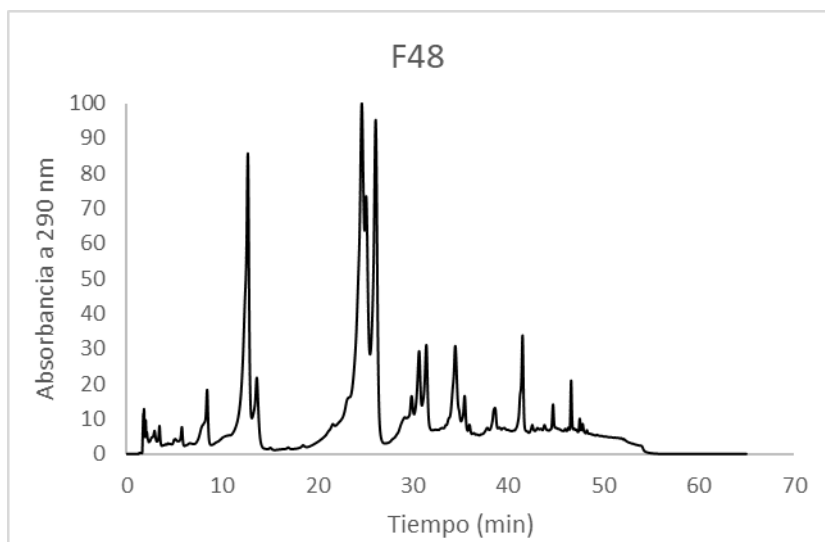


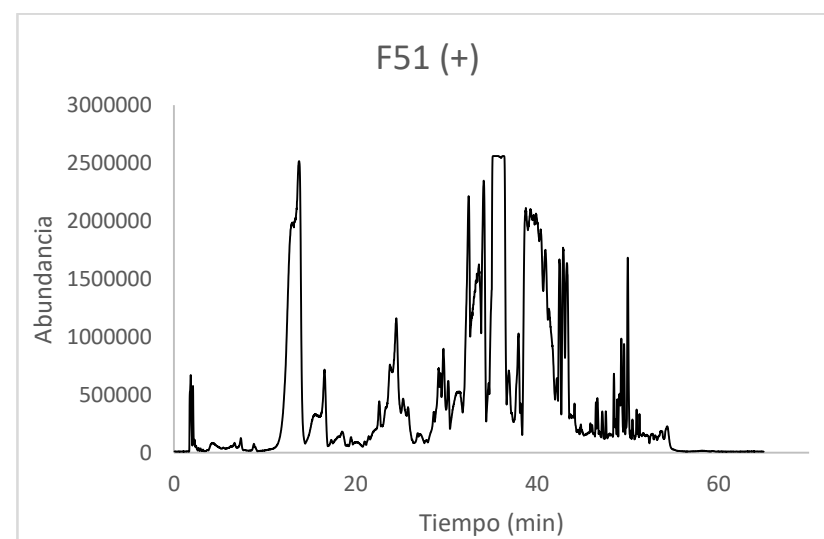
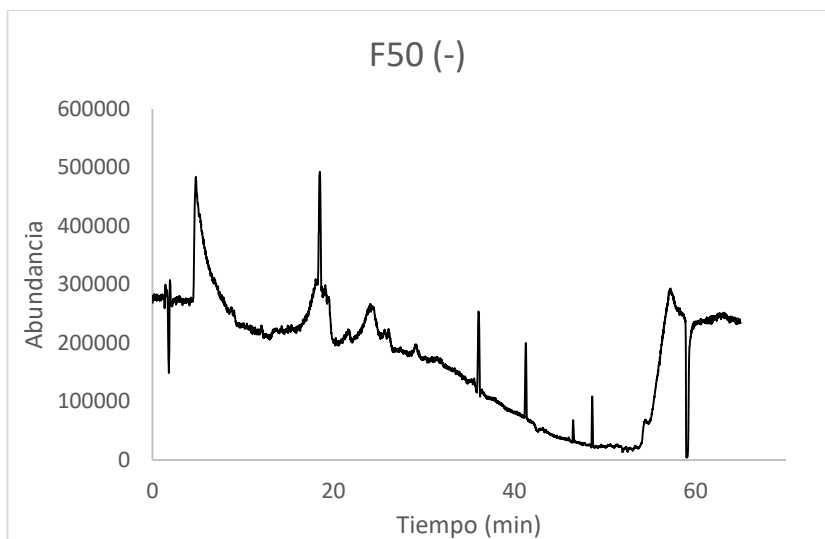
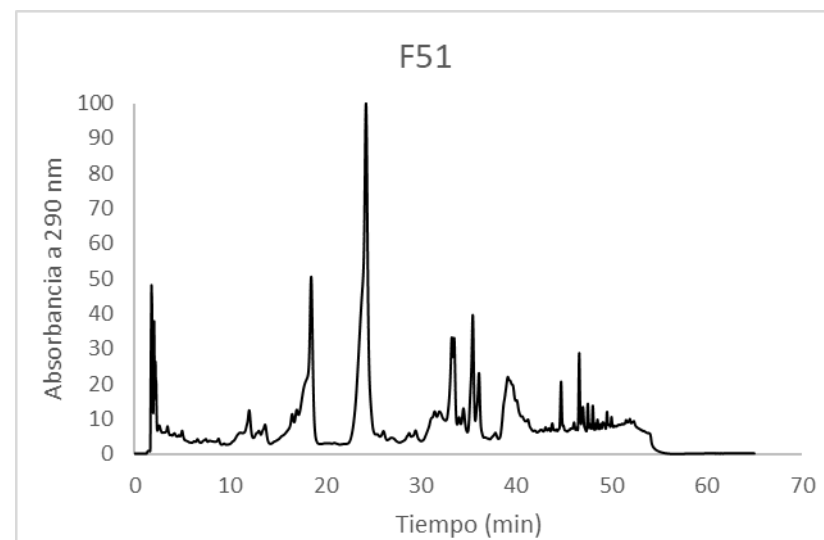
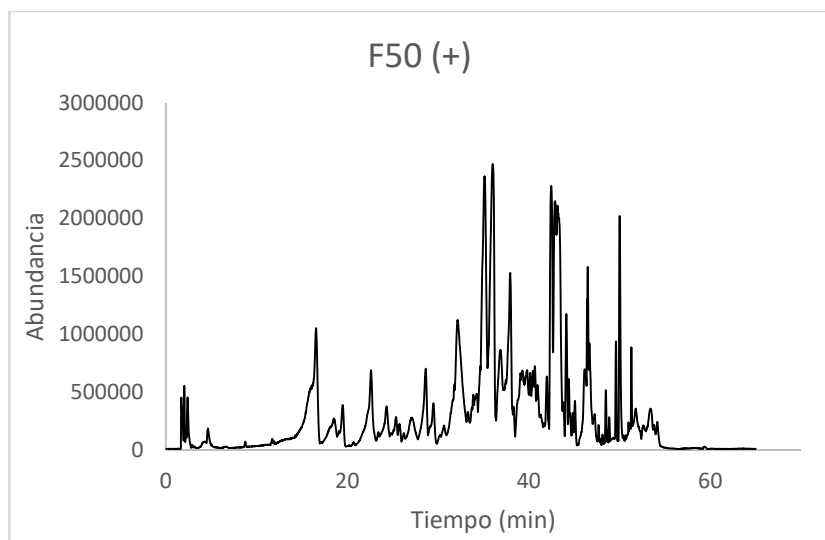


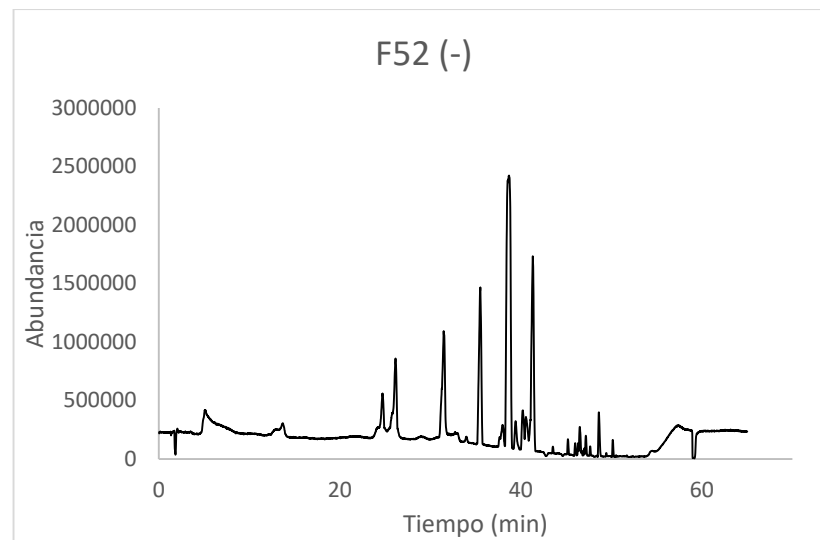
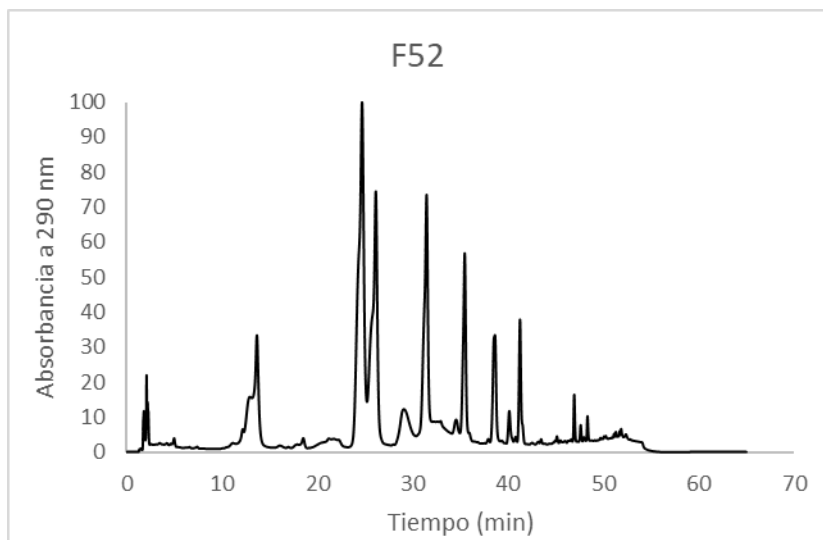
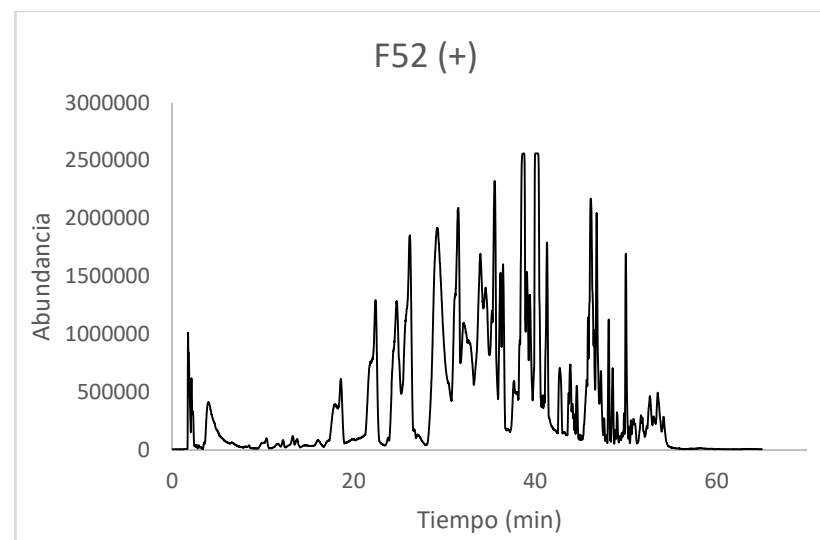
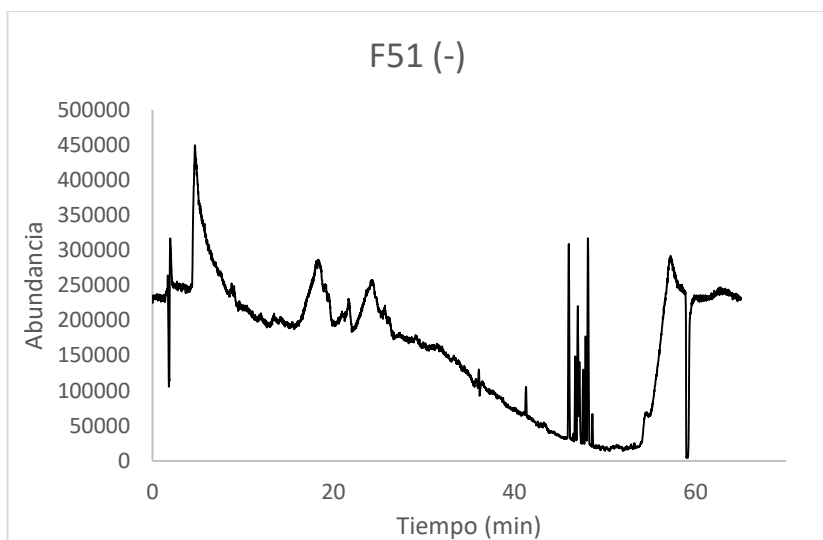


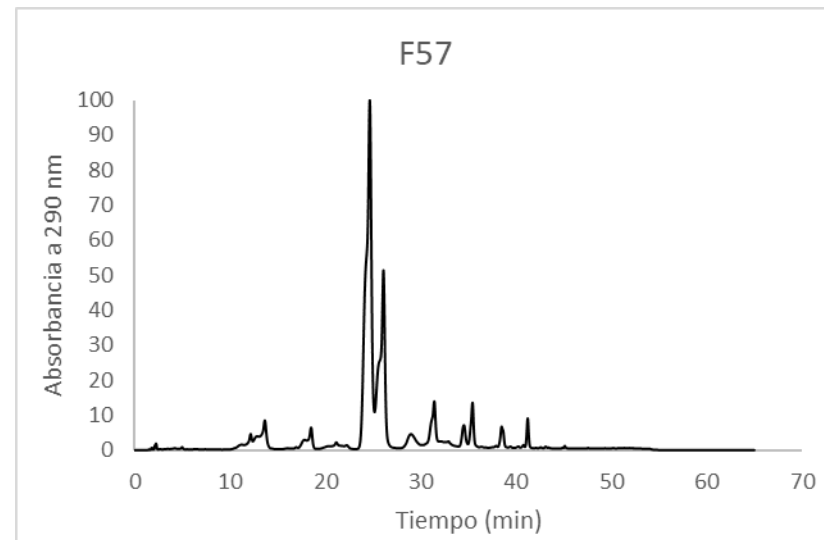
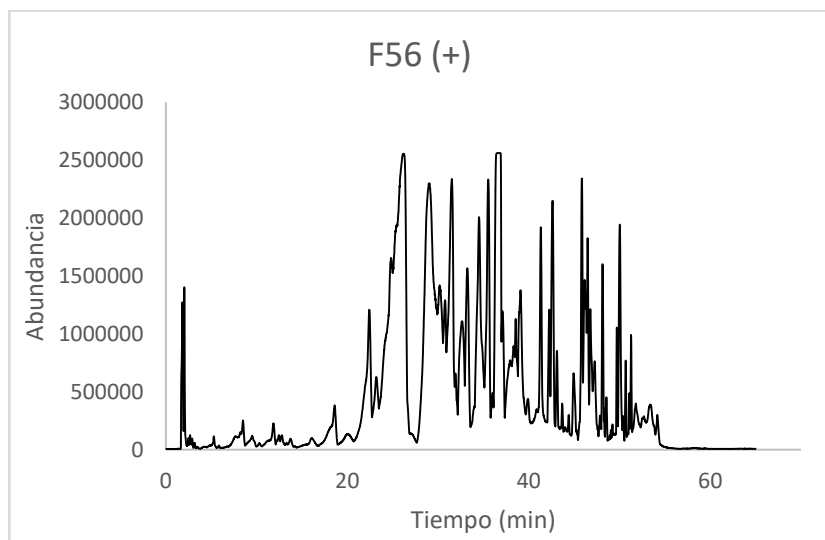
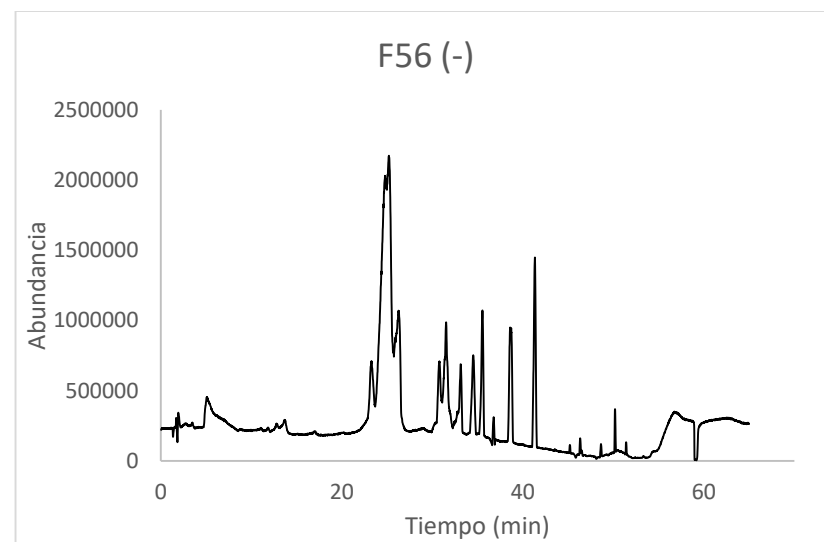
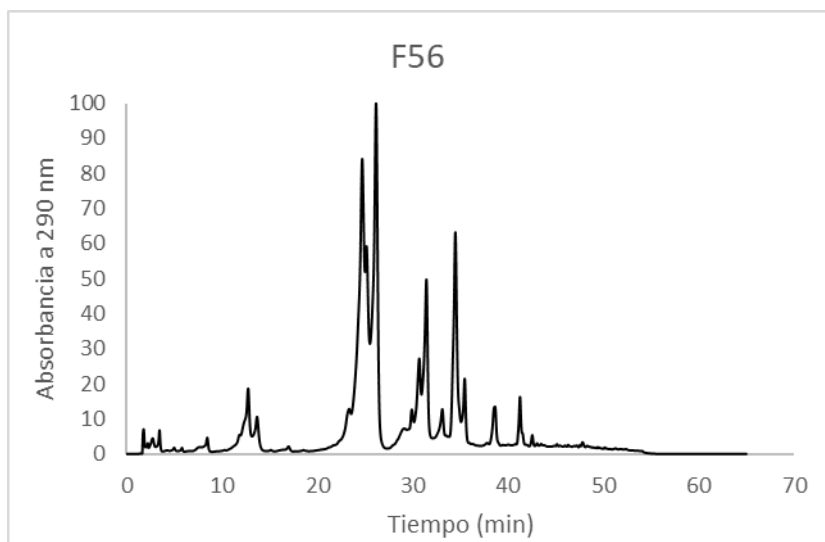


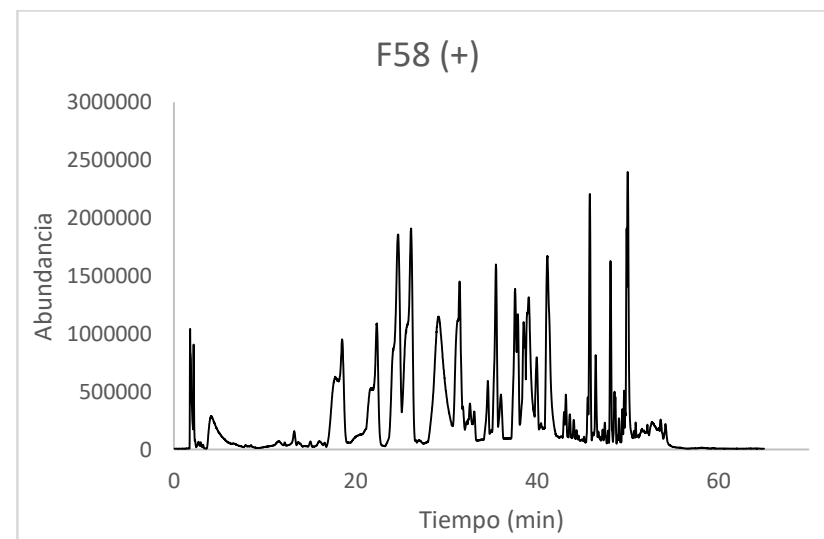
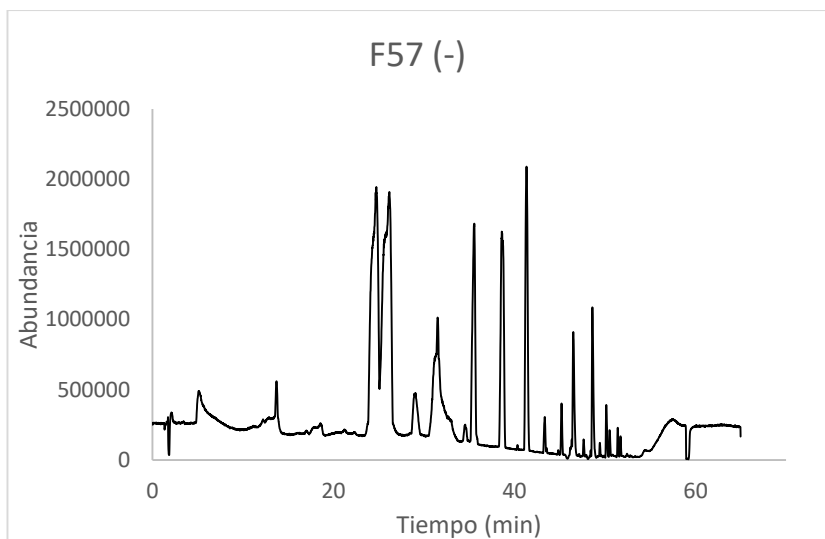
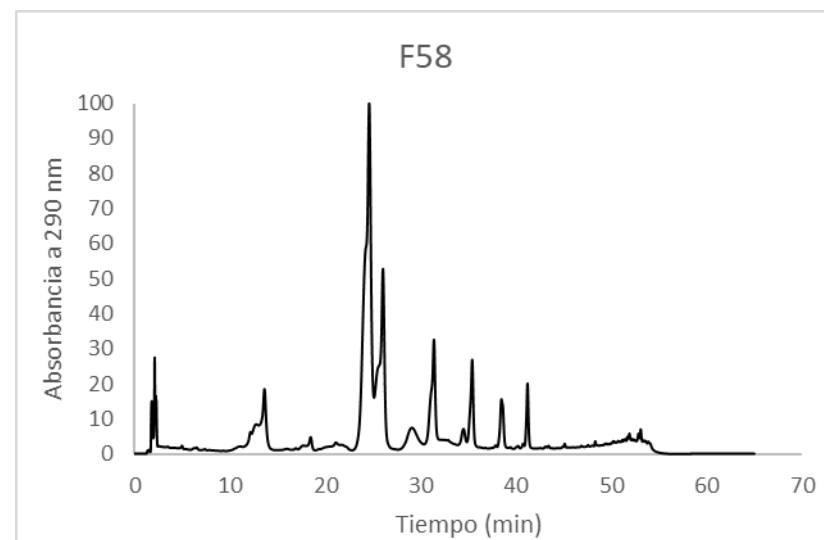
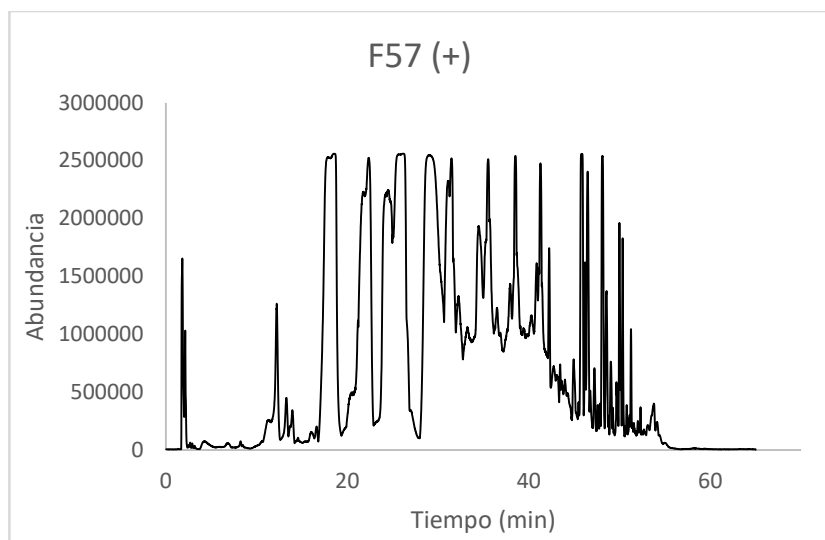


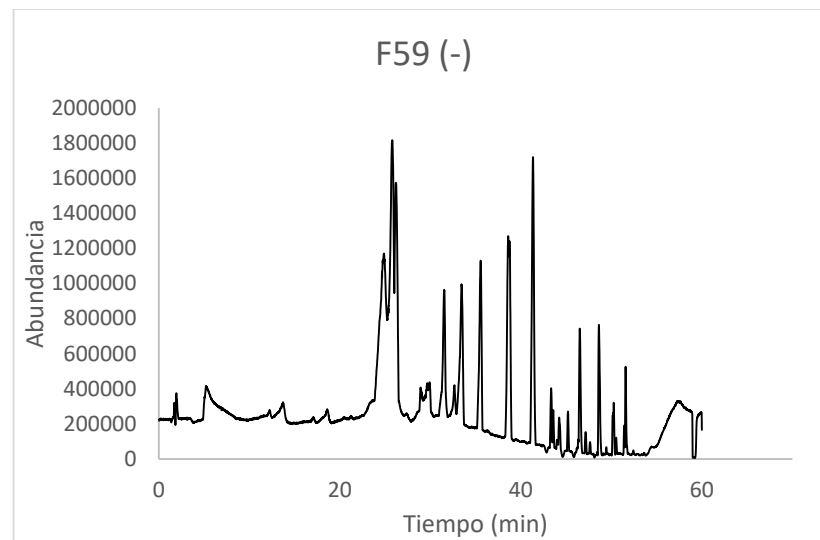
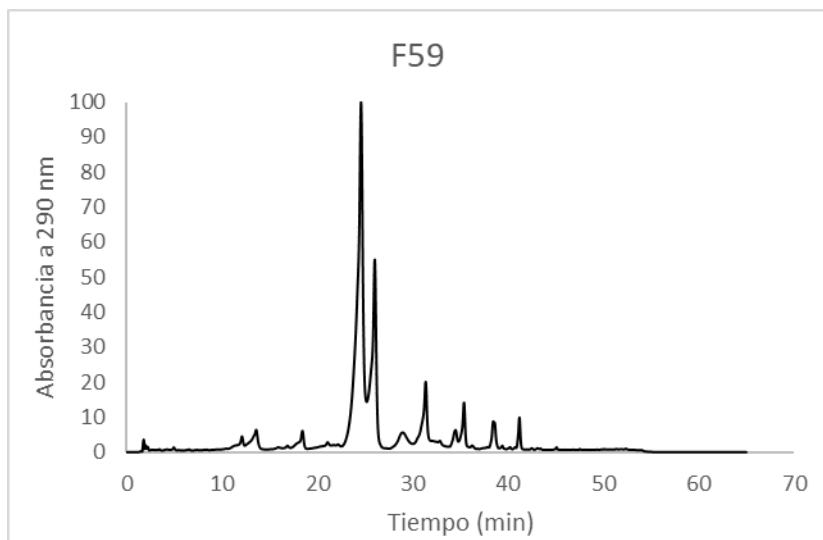
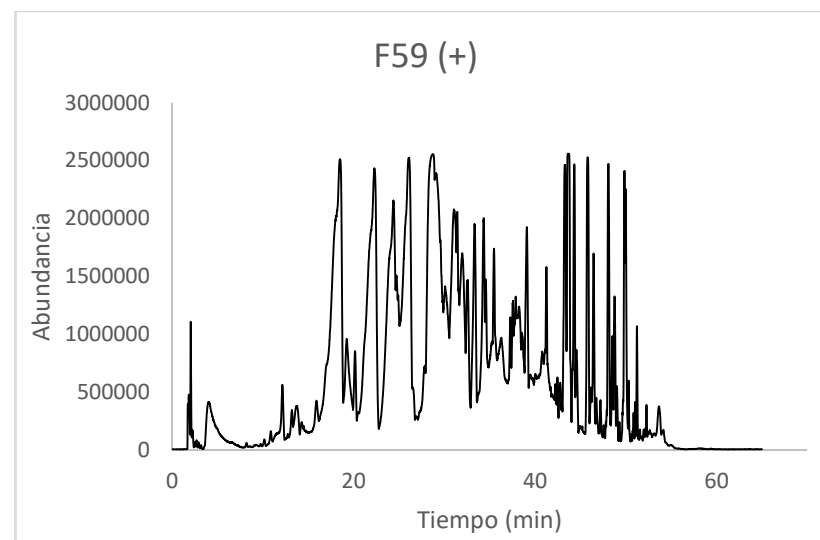
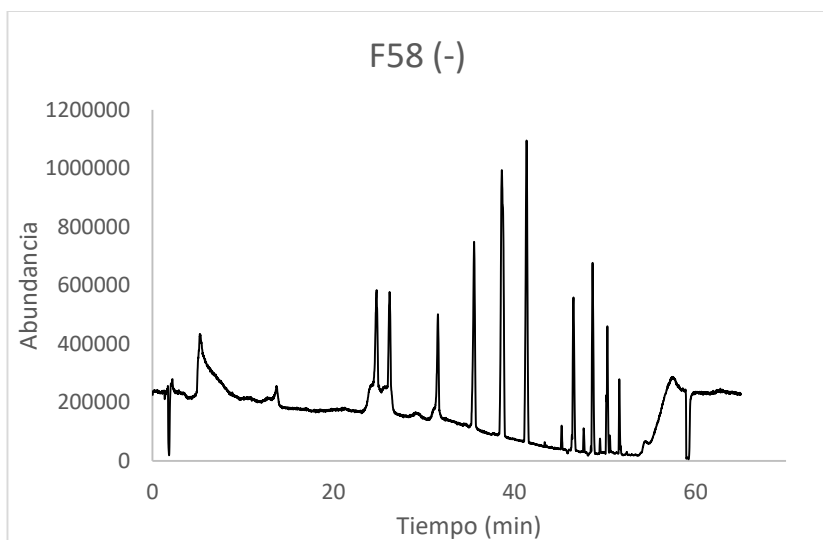















Article

Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by ¹H-NMR Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis

J. Fausto Rivero-Cruz ¹, Eduardo Rodríguez de San Miguel ¹ , Sergio Robles-Obregón ¹, Circe C. Hernández-Espino ², Blanca E. Rivero-Cruz ¹, José Pedraza-Chaverri ¹  and Nuria Esturau-Escofet ^{2,*} 

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Cd. Mexico, Mexico; joserc@unam.mx (J.F.R.-C.); erdsmg@unam.mx (E.R.d.S.M.); srobleso@hotmail.com (S.R.-O.); blancariv@unam.mx (B.E.R.-C.); pedraza@unam.mx (J.P.-C.)

² Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Cd. Mexico, Mexico; chernandez@iquimica.unam.mx

* Correspondence: nesturau@iquimica.unam.mx; Tel.: +52-55-5622-4770 (ext. 45648)

Received: 1 May 2017; Accepted: 10 July 2017; Published: 14 July 2017

Abstract: A feasibility study to predict antimicrobial and antioxidant activity properties of propolis extracts using 700-MHz ¹H-NMR spectra and multivariate regression data analysis is presented. The study was conducted with thirty-five propolis samples to develop a rapid and reliable method for the evaluation of their quality. The extracts have been evaluated by measuring phenolic and flavonoid contents; the antioxidant activity; and the antimicrobial activity. The obtained spectral data were submitted to multivariate calibration (partial least squares (PLS) and orthogonal partial least squares (OPLS)) to correlate the relative intensity and position of NMR resonance peaks with the metabolites contents and biological activities. The developed PLS and OPLS model were successfully applied to the determination of the target properties for proof of the concept. The OPLS observed vs. predicted properties plots indicate the absence of systematic errors with determination coefficients between the ranges 0.7207 to 0.9990. Up to 86.1% of explication of variation in the spectral data and 99.9% in the measured properties were attained with 88.6% of prediction capabilities in the best case (*S. mutans* activity) according to the cross-validation procedure. The figures of merit of the developed PLS and OPLS methods were evaluated and compared as well.

Keywords: propolis extract; proton nuclear magnetic resonance; chemometrics; antibacterial; antioxidant capacity; multivariate statistical analysis

1. Introduction

Propolis (bee glue), is a sticky dark-colored hive product collected by bees from living plant sources [1,2]. It possesses pharmacological activities such as antibacterial, antifungal, antioxidant, antitumoral, anti-inflammatory properties and is used extensively as an ingredient of candies, honeys, biopharmaceuticals, cosmetics and in beverages in various parts of the world where it is claimed to improve human health and to prevent diseases such as diabetes and cancer [3,4]. Recently, propolis has been proposed as chemical preservative in ground meat and as a germicide and insecticide for food packaging [4].

More than 300 compounds have been identified in different propolis samples [5]. This complex mixture contains a variety of chemical compounds such as flavonoid aglycones, phenolic acids and their esters, phenolic aldehydes, alcohols, ketones, sesquiterpenes, coumarins, steroids, amino acids

and inorganic compounds [4,6–8]. The results have revealed that the propolis composition varies with geography and is strongly related with the flora surrounding the hive [1,4].

The main constituents of propolis in North America are flavonoids and phenolic acid esters [9]. Limited research has been conducted on the chemical composition and pharmacological properties of Mexican propolis. A study conducted by Velazquez et al., [10], investigated the antibacterial and free-radical scavenging (FRS) activities of propolis collected from three different areas of Sonora (Mexico). Navarro-Navarro et al., [11] reported the anti-*Vibrio* activity of propolis collected from three different regions of Sonora. Valencia et al., [3], studied the seasonal effect on the chemical composition and biological activities (antiproliferative and antioxidant activities) of Sonoran propolis.

The biological effects of propolis can be associated with its antioxidant activity, and in the last few decades new analytical techniques have been proposed to determine its antioxidant activity [12,13]. They are based, for example, on the determination of total phenolic and flavonoid contents or the antioxidant activity/capacity assays: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing/antioxidant power (FRAP), and generation of the (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)) radical cation [14]. It is known that "quantitative evaluation of antioxidant capacity" needs more than one single assay method. A range of analytical methods have also been used to profile propolis, including chromatography techniques, linked to spectroscopic detection, resulting in various modern hyphenated techniques, e.g., GC-MS and HPLC-MS [15].

As already mentioned, propolis consists of a wide range of organic compounds of varying polarity and the only technique that can simultaneously examine waxes, terpenoids and phenolics is Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy [16]. One of the main advantages of this technique is that structural and quantitative information can be obtained for a wide range of chemical species in a single NMR experiment. NMR is frequently applied to samples that can be directly examined as liquids, but very simple extraction or sample preparation procedures may also be used [17,18].

Since the NMR pattern of natural products in propolis is extremely complex, the use of chemometric methods to analyze such complex spectral data sets is mandatory [19]. In the case of propolis, NMR with chemometric techniques have been proposed to identify and classify different propolis sources or geographic origins [18,20,21]. However, to the best of our knowledge, no study concerning the prediction of antioxidating and antibacterial properties of propolis based on multivariate calibration has been reported up to now.

In the present paper, the application of $^1\text{H-NMR}$ coupled with multivariate statistical analysis, based on partial least squares, is employed to quantitatively predict the antibacterial and antioxidant activities of propolis extracts. The net analyte signal concept is used to determine the figures of merit of the developed methods. The study was conducted with 35 propolis samples obtained from different Mexican apiaries and four samples from out of the country (one from Ecuador and three from China) to develop a rapid and reliable method to evaluate the quality of them.

2. Results and Discussion

2.1. Extraction, Antioxidant and Antibacterial Activities

In this work, the ethanolic extracts of thirty-five samples of propolis obtained from different Mexican apiaries and four samples out of the country (one from Ecuador and three from China) were studied. The total phenolic and flavonoid contents were estimated using standard chemical assay procedures (Folin-Ciocalteu and AlCl_3 methods). Several biological activities were evaluated including antioxidant capacity using the free radical scavenging DPPH assay and antimicrobial properties using *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguinis* as test models. The results of the bioassays of the ethanolic extracts of propolis (EEP) samples are reported in Table 1. The total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity are in agreement with the literature for poplar propolis [3,6,10].

Table 1. Characteristics of the of EEP samples from Mexico City (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) and China (CHINA) used in this study.

Source of Sample	Date of Harvesting	Harvesting Method	Total Phenols ^a	Total Flavonoids ^b	% DPPH ^c	MIC (µg/mL)		
						<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>
Mexico City (CDMX)								
<i>Tlalpan</i>								
Topilejo 1	September 2011	plastic nets	112.7	15.7	42.3	128	128	256
Topilejo 2	October 2011	plastic nets	116	24.9	46.1	128	128	256
Topilejo 3	November 2011	plastic nets	106.7	12.6	40.2	32	32	64
Topilejo 4	October 2012	plastic nets	134.1	14.2	52.5	128	128	256
Topilejo 5	October 2013	plastic nets	101.3	13.6	40.8	128	128	256
Topilejo 6	October 2014	plastic nets	106.3	12.1	32.6	128	128	128
<i>Xochimilco</i>								
San Luis Tlaxialtemalco 1	October 2011	scraping	99.7	22.1	66.8	512	512	512
San Luis Tlaxialtemalco 2	November 2011	scraping	157.3	15.6	52.9	128	128	256
San Luis Tlaxialtemalco 3	October 2012	scraping	76.4	14.1	26.6	512	512	1024
San Luis Tlaxialtemalco 4	October 2013	scraping	175.9	17.1	60.2	64	128	128
San Luis Tlaxialtemalco 5	October 2013	plastic nets	116.4	14.5	54.6	128	128	256
San Luis Tlaxialtemalco 6	November 2013	plastic nets	134.6	13.5	44.6	128	128	256
<i>Milpa Alta</i>								
San Pablo Oztotepec 1	October 2011	plastic nets	101.3	25.2	59.6	128	128	128
San Pablo Oztotepec 2	October 2011	scraping	247.3	27.8	84.4	32	32	32
San Pablo Oztotepec 3	November 2012	plastic nets	128.9	12.2	39.6	128	128	256
San Pablo Oztotepec 4	October 2011	scraping	223.2	34.6	77.5	32	32	64
San Pablo Oztotepec 5	November 2012	scraping	225.4	32.6	75.6	32	32	64
San Pablo Oztotepec 6	October 2011	plastic nets	135.2	27.5	64	64	64	128
San Pablo Oztotepec 7	October 2012	scraping	203.8	31.5	81.7	16	16	32
San Pablo Oztotepec 8	October 2013	plastic nets	204.3	16.3	84.8	32	32	64
San Pablo Oztotepec 9	October 2012	scraping	218.9	22.1	77.5	32	32	32
San Pablo Oztotepec 10	November 2012	scraping	178.3	16.3	57.5	64	128	128
San Pablo Oztotepec 11	October 2013	scraping	168.6	16.1	58.8	64	64	128
San Antonio Tecomitl 1	November 2013	scraping	198.5	23.9	75	32	64	128
San Antonio Tecomitl 2	October 2011	scraping	215.7	30	51.2	32	64	64
San Antonio Tecomitl 3	October 2011	plastic nets	99.6	10.1	33.8	256	256	512
San Antonio Tecomitl 4	October 2013	plastic nets	105.3	13.1	43.6	64	64	128
San Antonio Tecomitl 5	October 2012	plastic nets	89.8	10.5	36.5	256	256	512

Table 1. Cont.

Source of Sample	Date of Harvesting	Harvesting Method	Total Phenols ^a	Total Flavonoids ^b	% DPPH ^c	MIC (µg/mL)		
						<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>
Puebla (PUE)								
Valsequillo 1	October 2011	wooden wedges	205.6	48.7	80.9	16	32	32
Valsequillo 2	October 2012	scraping	287.2	56.7	86	16	16	16
Cuetzalan	October 2011	scraping	24.7	2.3	28.7	1024	1024	2048
Oaxaca (OAX)								
Pinotepa Nacional 1	October 2011	scraping	38.5	2.1	7.1	2048	2048	2048
Pinotepa Nacional 2	October 2012	scraping	12	1.3	0	2048	2048	2048
Guanajuato (GUAN)								
Silao	October 2012	plastic nets	87.3	14.2	52.4	256	256	512
Tlaxcala (TLAX)								
Tlaxcala	October 2011	scraping	23.5	3.1	12.1	512	512	1024
South America (ECUA)								
Quito/Ecuador	2011		198.3	20.1	16.3	64	128	128
China (CHINA)								
China 1 *	2013		221.7	28.3	83.7	64	64	64
China 2 *	2013		215.6	29.1	79.1	64	64	64
China 3 *	2012		189.9	27.8	67.8	64	64	128
Positive control [†]						0.12	0.12	0.24

^a Expressed in mg GAE/g EEP; ^b Expressed in mg QE/g EEP; ^c DPPH radical scavenging activity (percent); * Purchased in a local market in Mexico City; [†] Chlorhexidine gluconate.

2.2. $^1\text{H-NMR}$

The $^1\text{H-NMR}$ spectra of the EEP were recorded and, as an example, two selected spectra are shown in Figure 1. While spectrum Figure 1a belongs to an active extract, the Figure 1b one corresponds to an inactive one. In spectrum Figure 1a flavonoid compound signals are observed. Antioxidant and antimicrobial activities are well documented for this type of natural products [22,23]. The singlets around δ 12.0 ppm could be attributed to intramolecular hydrogen bond forming -OH groups frequently present in the A-ring of flavonoids. The aromatic protons of these phenolic constituents are observed between δ 6.0 ppm and 8.0 ppm. The signals between δ 6.0 ppm and 5.0 ppm could correspond to the vinylic protons of the C-ring of flavones present in the extract. The protons of the ABX system of the C-ring of a flavanone are expected between δ 5.0 ppm and 2.5 ppm. The singlet nearby δ 4.0 ppm could be attributed to a methyl moiety of an aromatic methoxy group frequently observed in flavonoids. On the other hand, spectrum Figure 1b is dominated by signals in the δ 2.0 ppm–0.5 ppm region, which could be originated from protons belonging to waxes or linear fatty acids whose contribution to antimicrobial or antioxidant activities may be considered less relevant.

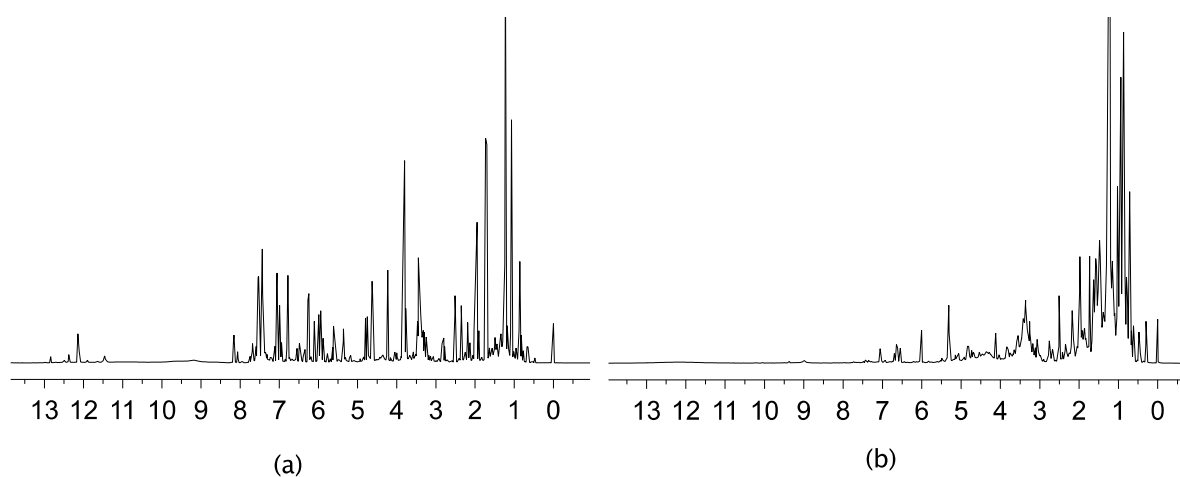


Figure 1. The 700-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra of 40 mg of propolis sample dissolved in 0.6 mL of $\text{DMSO-}d_6$ containing TMS. (a) Sample Puebla; Valsequillo 1 and (b) sample Puebla, Cuetzalan.

2.3. Multivariate Analysis

The obtained spectral data were submitted to multivariate analysis; first, to study the variations among the sample spectra, and second, to correlate the relative intensity and position of NMR resonance peaks to antioxidant activity determined by DPPH, the total phenolic and flavonoid contents, and the antimicrobial activity.

Principal component analysis (PCA) is a technique used to emphasize variation and bring out strong patterns in a dataset. It's often used to make data easy to explore and visualize. By examining the underlying structure of the variables, a new coordinate system is defined. The original variables are linear combined in new ones, named principal components, and in such form the dimensionality, i.e., complexity of the data space is reduced. The PCA analysis of the $^1\text{H-NMR}$ spectra of propolis showed that with six components 73.3% of spectral variation was explained ($R^2X(\text{cum})$). This value is a measure of the amount of information contained within the model to explain the dispersion observed when comparing the different sample spectra. The percent of variation that can be predicted by the model according to a leave-one-out cross-validation procedure reached 48.7% ($Q^2X(\text{cum})$). Cross-validation is used to estimate how accurately a predictive model will perform in practice and it is employed as an estimator of the prediction behavior in the absence of an independent set of samples for validation. A quick view of the sample distribution according to spectral similarities in the plot of scores t_2 vs. t_1 (Figure 2), where the scores are the values of the new variables, indicated a natural

tendency of the samples of the same apiary or apiaries to lie in close proximity, but no grouping among the samples according to their different origins is in fact observed in the plot. This was confirmed by the tolerance ellipse that defines a 95% confidence interval for a Hotelling T^2 test, indicating that all samples can be considered as representative of the same population. It was also observed that although some samples lay very close to the limits of the ellipse, no outliers were really present in the data. On the basis of the analysis of the loadings plots (supplementary information), the differences among samples are mainly of quantitative rather than of qualitative nature, as the chemical shifts in their NMR spectra cannot be assigned to any particular discriminant unique features. In addition, the analysis showed that some samples had distance to the model (DModX) values just slightly above the critical value; however, it was decided to include them in further treatments. DModX is the distance of an observation in the data set to the X model plane or hyperplane, which is proportional to the residual standard deviation (RSD) of the X observation. Interestingly such values corresponded to samples outside Mexico City (Puebla) and even the country (China).

The spectra were also treated with PLS regression analysis. PLS is a method for relating two data matrices, X (the $^1\text{H-NMR}$ spectra) and Y (the properties, e.g., phenol content), by a linear multivariate model, but goes beyond traditional regression in that it models the structure of X and Y by PCA analysis as well. The regression is then performed with the analogous of the principal components, named latent variables, of the X and Y matrices.

In a first step the complete spectral range was employed (0.5 ppm–13.5 ppm). However, from the analysis of the regression coefficients, an improvement in regression parameters was observed when the range was restricted to 0.5 ppm–8.2 ppm, and further processing was done using this interval.

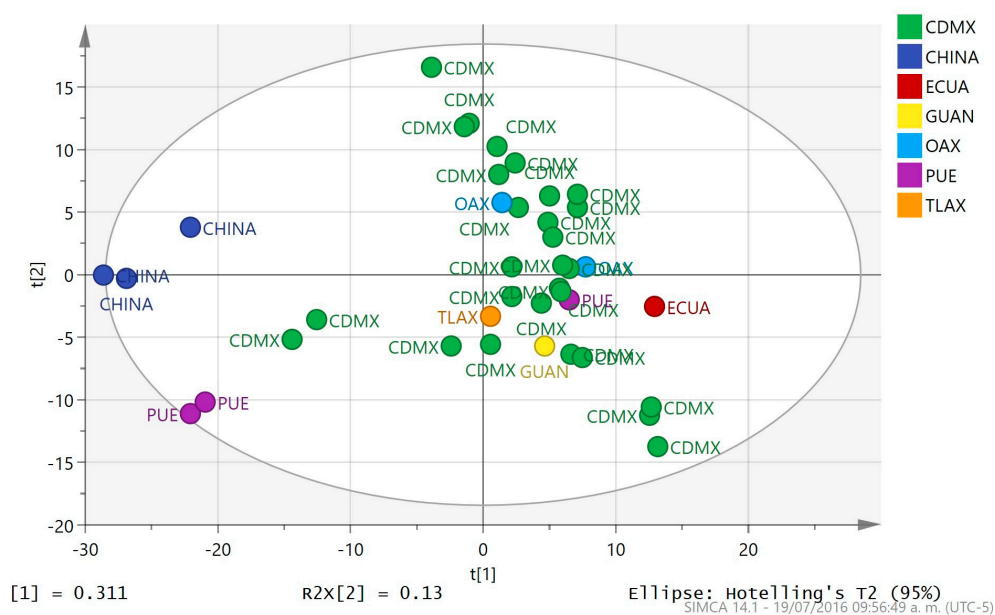


Figure 2. t_2 vs. t_1 score plot for PCA analysis of $^1\text{H-NMR}$ spectra of propolis samples labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) and China (CHINA).

In Table 2, the values of $R2X$ (cum), $R2Y$ (cum), and $Q2X$ (cum) for the different evaluated properties are indicated. $R2Y$ (cum) has the same meaning that $R2X$ (cum) but instead of analyzing spectrum data, it considers the data contained in Y matrix (responses). Values for the determination coefficient (R^2), the Root Mean Square Error of Estimation (RMSEE) and the Root Mean Standard Error of Cross Validation (RMSECV), as well as for the number of latent variables used in the models are in addition included. RMSEE and RMSECV are descriptive statistic parameters that allow the accuracy of the model to be quantitatively measured. The numbers of significant latent variables were

selected according to the cross-validation rules included in SIMCA for such purposes: (i) $Q^2 > \text{limit}$, where $\text{limit} = 0$ for PLS models with more than 100 observations. $\text{Limit} = 0.05$ for PLS models with 100 observations or less, and $\text{limit} = 0.01$ for OPLS; (ii) $Q^2V > \text{limit}$ for at least 20% of the y -variables when $M \geq 25$ or $\text{sqrt}(M)$ when $M < 25$, where $M = \text{number of } y\text{-variables}$ and Q^2V is Q^2 for individual variables. Overall, good performance is achieved for all properties and no systematic variations are detected based on the slope and intercept values of the regression equations between the defined and predicted values.

With the aim of improving the prediction error for the data by eliminating orthogonal variation in X , the OPLS method was tested. This orthogonal variation is due to sources of variation which are not correlated with the measured properties, i.e., it is the non-predictive part of the variation in the X matrix. As observed in the same Table, in general, better performance characteristics are obtained, i.e., a reduction in RMSEE and RMSECV, an increase in R^2X (cum), R^2Y (cum), Q^2 (cum) and R^2 , without deterioration in the regression equations, as most of the points fall close to the 45 degree line, with no systematic errors present. Values of R^2 ranging from 0.7207 to 0.9990 were observed for the regression lines indicating strong relationships between the defined and predicted values of total phenol and flavonoid content, DPPH radical scavenging activity, and in vitro antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguinis*. At this point it is also important to mention that the residual plots of the data for both the PLS and OPLS analyses showed no systematic trends and a satisfactory fit to normal probability plots, thus confirming the correct application of the models.

Table 2. Results of the PLS and OPLS modeling of propolis samples.

Property	Number of Latent Variables	Regression Equation ^a	R^2	R^2X (cum)	R^2Y (cum)	Q^2 (cum)	RMSEC	RMSECV
PLS								
Phenol content	2	$x - 1.397 \times 10^{-6}$	0.6003	0.400	0.600	0.263	43.548	56.086
Flavonoid content	2	$x + 1.212 \times 10^{-7}$	0.7204	0.397	0.720	0.482	6.334	8.305
DPPH	2	$x + 1.61 \times 10^{-7}$	0.7110	0.388	0.711	0.325	12.760	18.511
MIC (<i>S. oralis</i>)	3	$x + 1.165 \times 10^{-5}$	0.9411	0.460	0.941	0.778	118.005	244.768
MIC (<i>S. sanguinis</i>)	3	$x + 7.404 \times 10^{-6}$	0.9434	0.460	0.943	0.784	115.076	241.684
MIC (<i>S. mutans</i>)	3	$x + 2.033 \times 10^{-6}$	0.9245	0.463	0.925	0.696	156.141	322.235
OPLS								
Phenol content	1 + 2 + 0	$x - 1.106 \times 10^{-5}$	0.7207	0.472	0.721	0.249	36.920	57.356
Flavonoid content	1 + 2 + 0	$x + 1.22 \times 10^{-6}$	0.8298	0.463	0.830	0.627	5.012	7.027
DPPH	1 + 3 + 0	$x - 5.353 \times 10^{-6}$	0.8603	0.542	0.860	0.515	9.128	15.878
MIC (<i>S. oralis</i>)	1 + 4 + 0	$x + 1.108 \times 10^{-5}$	0.9736	0.596	0.974	0.850	81.405	178.283
MIC (<i>S. sanguinis</i>)	1 + 4 + 0	$x + 3.338 \times 10^{-5}$	0.9744	0.595	0.974	0.854	79.644	174.984
MIC (<i>S. mutans</i>)	1 + 12 + 0	$x - 2516 \times 10^{-6}$	0.9990	0.861	0.999	0.886	20.785	181.999

^a observed vs. predicted values.

To better understand the differences between PLS and OPLS methods to model and predict the response values, some characteristic examples of the inner relationship plot of the analysis of the models described in Table 2 are shown in Figures 3 and 4. These plots represent the correlation between the scores of the predictors (u data) and response (t data). A perfect match between the X- and the Y-data is observed when all data points are located on the diagonal line with slope equal to one. Conversely, when there is a weak correlation structure between X and Y, there is a considerable spread of the points around such line. The plot is also useful to identify curved (non-linear) relationships between the predictors and the responses and to identify outliers in X- and Y-data, and in the relationship between X and Y. As observed in Figure 3, PLS models give moderate correlations between spectra and properties, denoted by both medium values of the determination coefficient (r^2 values ranging from 0.3867 to 0.4617) and significant spread of the samples along the reference line. Some samples inside Mexico City (CDMX) and outside the city (Oaxaca (OAX), Puebla (PUE) and Tlaxcala (TLAX)) and even the country

(China) look like outliers in the relationship between the X- and Y-blocks. In contrast, OPLS modeling produces very strong correlation results (Figure 4) as high reduction in the spread of the samples along the reference line is observed with a considerable increase in the values of the determination coefficients (r^2 values ranging from 0.8298 to 0.999). This time, the outlier samples observed in PLS modeling practically disappear at all, suggesting that OPLS modeling reduces a particular source of variability in the NMR chemical shifts associated with such samples. Further analysis of the regression coefficients of the PLS and OPLS models will be latter performed to identify the chemical shifts responsible for differences in PLS and OPLS modeling. Similar results were observed for the properties not shown in Figures 3 and 4.

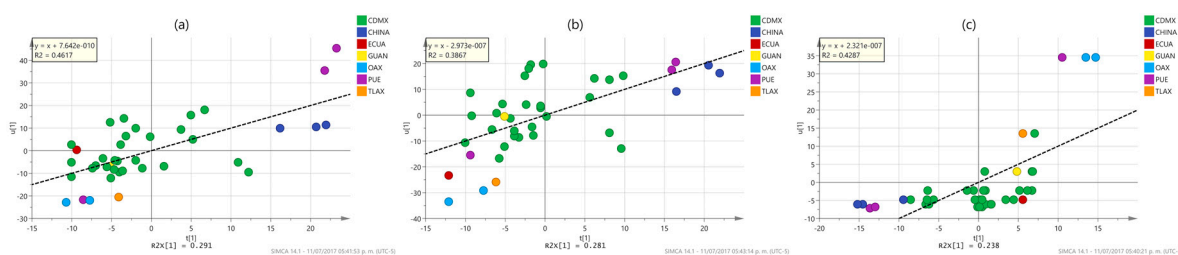


Figure 3. Inner relationship plots for the X-scores (u-data) and Y-scores (t data) between the first latent variables of the PLS models for (a) flavonoid content; (b) antioxidant (DPPH) content; and (c) antimicrobial *S. mutants* MIC activity, labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) and China (CHINA). Inside the figures the lineal regression equation and determination coefficient value of the data are reported.

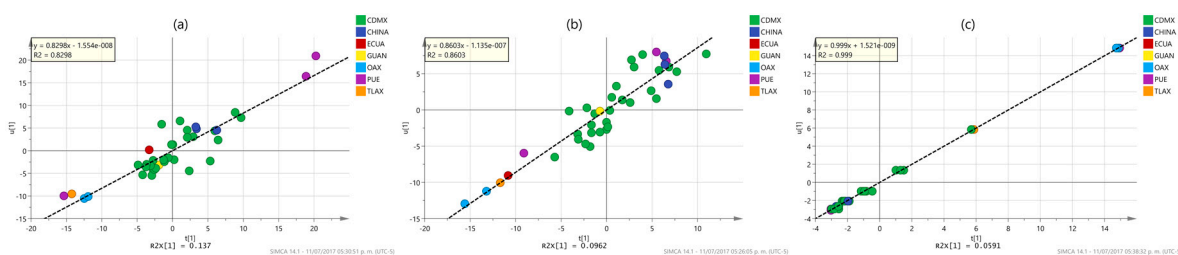


Figure 4. Inner relationship plots for the X-scores (u-data) and Y-scores (t data) between the first latent variables of the OPLS models for (a) flavonoid content; (b) antioxidant (DPPH) content; and (c) antimicrobial *S. mutants* MIC activity, labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) and China (CHINA). Inside the figures the lineal regression equation and determination coefficient value of the data are reported.

In Figures 5 and 6 the observed vs. predicted values plots of the different properties using OPLS modeling are shown. It is obvious that the samples are not homogeneously distributed, as most of the observations are clustered and others grouped outside the main array. This is especially true concerning the antibacterial activity, in which it is clearly noted that the inclusion of samples outside Mexico City (CDMX), especially Puebla (PUE), Oaxaca (OAX) and Tlaxcala (TLAX), allows a more suitable prediction due to the extend range that such samples confers for modeling. This fact is reflected in the RMSEE and RMSECV values which are lower for phenol and flavonoids contents and DPPH activity than for MIC assays. The plots also shown that although phenol and flavonoid contents as well as DPPH activity are almost equally spaced between samples, the MIC activities are not. This trend clearly indicates that although the compounds that produce the antioxidant properties are presents in an extended range of concentrations in the samples discernable by the measuring method by a continuous variable, not all of them have antimicrobial activities. In addition, the observed grouping in

the MIC activities is a logical consequence of the nature of the MIC analysis (two-fold serial dilutions) which produces a discrete variable as results and the similarities between samples concerning this parameter. The low antibacterial activity of certain samples, especially those from Puebla (PUE), Oaxaca (OAX) and Tlaxcala (TLAX), is clearly related to their low phenol and flavonoid contents, as expected for the antioxidant capacity of such compounds. The inclusion of new samples with a diversity of origins and further characterization of the propolis samples will be a recommendable form to extend the model prediction capabilities.

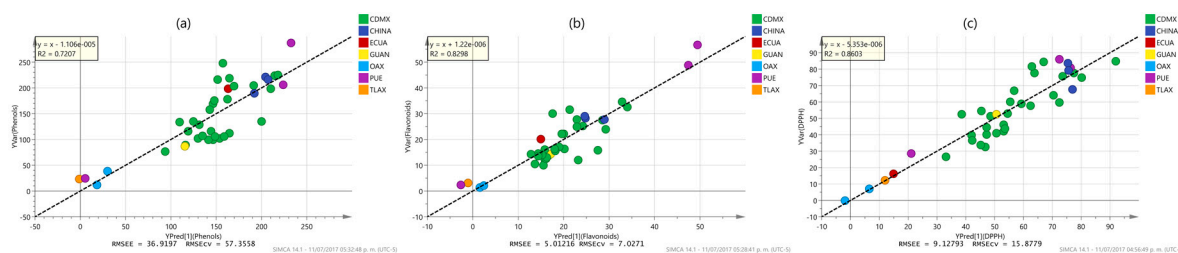


Figure 5. OPLS model observed vs. predicted (a) phenol content; (b) flavonoid and (c) antioxidant (DPPH) content plot of propolis samples labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) and China (CHINA).

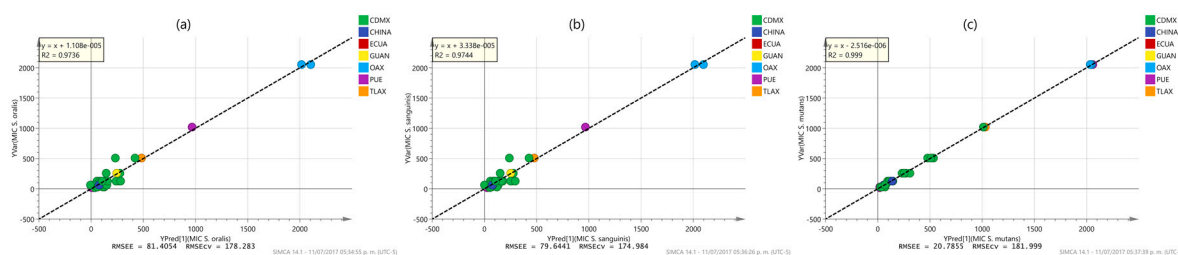


Figure 6. OPLS model observed vs. predicted antimicrobial MIC activity (a) *S. oralis*; (b) *S. sanguinis*, and (c) *S. mutants*, plot of propolis samples labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) and China (CHINA).

In Table 3 the figures of merit of the PLS and OPLS methods are reported. As observed, both methods perform similarly. Clearly the orthogonal signal correction of OPLS algorithm filters uncorrelated variability in the sample spectra, thus increasing the selectivities up to its maximum values of 1.00, thus allowing better prediction capabilities of the model as measured by Q^2X (cum). By comparing PLS and OPLS selectivity results, this uncorrelated variability has an average value of 17%. A comparison of the sum of squares of the regression coefficients for all properties for the PLS and OPLS models (Figure 7) reveals that both models give high importance to predict the target properties to the 0.5 ppm–6.0 ppm region; however the OPLS technique give more relevance to the 1.7 ppm–2.2 ppm and 5 ppm–5.8 ppm regions of the $^1\text{H-NMR}$ spectra, which according to the discussion above, such chemical shifts were mainly attributed to protons belonging to waxes or linear fatty acids and to the vinylic protons of the C-ring of flavones present in the extract, respectively, which content seems to be determinant in the values of the of total phenol and flavonoid content, DPPH radical scavenging activity, and in vitro antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguinis*.

Table 3. Figures of merit of the PLS and OPLS models.

Figure of Merit	Phenol Content	Flavonoid Content	DPPH	MIC (<i>S. oralis</i>)	MIC (<i>S. sanguinis</i>)	MIC (<i>S. mutants</i>)
PLS						
LD	0.37 mg GAE g EEP ⁻¹	0.35 mg QE g EEP ⁻¹	0.40%	0.51 µg mL ⁻¹	0.51 µg mL ⁻¹	0.53 µg mL ⁻¹
LC	1.12 mg GAE g EEP ⁻¹	1.08 mg QE g EEP ⁻¹	1.21%	1.55 µg mL ⁻¹	1.55 µg mL ⁻¹	1.61 µg mL ⁻¹
Evaluated linearity	12–287.20 mg GAE g EEP ⁻¹	1.30–56.70 mg QE g EEP ⁻¹	0.40–86%	16–2048 µg mL ⁻¹	16–2048 µg mL ⁻¹	16–2048 µg mL ⁻¹
Sens	39.93 g EEP mg GAE ⁻¹	41.39 g EEP mg QE ⁻¹	36.80% ⁻¹	25.23 mL µg ⁻¹	25.27 mL µg ⁻¹	25.89 mL µg ⁻¹
Sel	0.87	0.87	0.86	0.79	0.79	0.79
γ	8.94 g EEP mg GAE ⁻¹	9.28 g EEP mg QE ⁻¹	8.28% ⁻¹	6.45 mL µg ⁻¹	6.46 mL µg ⁻¹	6.19 mL µg ⁻¹
γ ⁻¹	0.11 mg GAE g EEP ⁻¹	0.11 mg QE g EEP ⁻¹	0.12%	0.15 µg mL ⁻¹	0.15 µg mL ⁻¹	0.16 µg mL ⁻¹
OPLS						
LD	0.45 mg GAE g EEP ⁻¹	0.39 mg QE g EEP ⁻¹	0.49%	0.67 µg mL ⁻¹	0.66 µg mL ⁻¹	0.66 µg mL ⁻¹
LC	1.38 mg GAE g EEP ⁻¹	1.20 mg QE g EEP ⁻¹	1.50%	2.03 µg mL ⁻¹	1.86 µg mL ⁻¹	1.99 µg mL ⁻¹
Evaluated linearity	12–287.20 mg GAE g EEP ⁻¹	1.30–56.70 mg QE g EEP ⁻¹	0.40–86%	16–2048 µg mL ⁻¹	16–2048 µg mL ⁻¹	16–2048 µg mL ⁻¹
Sens	40.34 g EEP mg GAE ⁻¹	45.12 g EEP mg QE ⁻¹	37.76% ⁻¹	28.92 mL µg ⁻¹	29.13 mL µg ⁻¹	29.59 mL µg ⁻¹
Sel	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
γ	7.24 g EEP mg GAE ⁻¹	8.35 g EEP mg QE ⁻¹	6.66% ⁻¹	4.92 mL µg ⁻¹	4.95 mL µg ⁻¹	5.03 mL µg ⁻¹
γ ⁻¹	0.14 mg GAE g EEP ⁻¹	0.12 mg QE g EEP ⁻¹	0.15%	0.20 µg mL ⁻¹	0.20 µg mL ⁻¹	0.20 µg mL ⁻¹

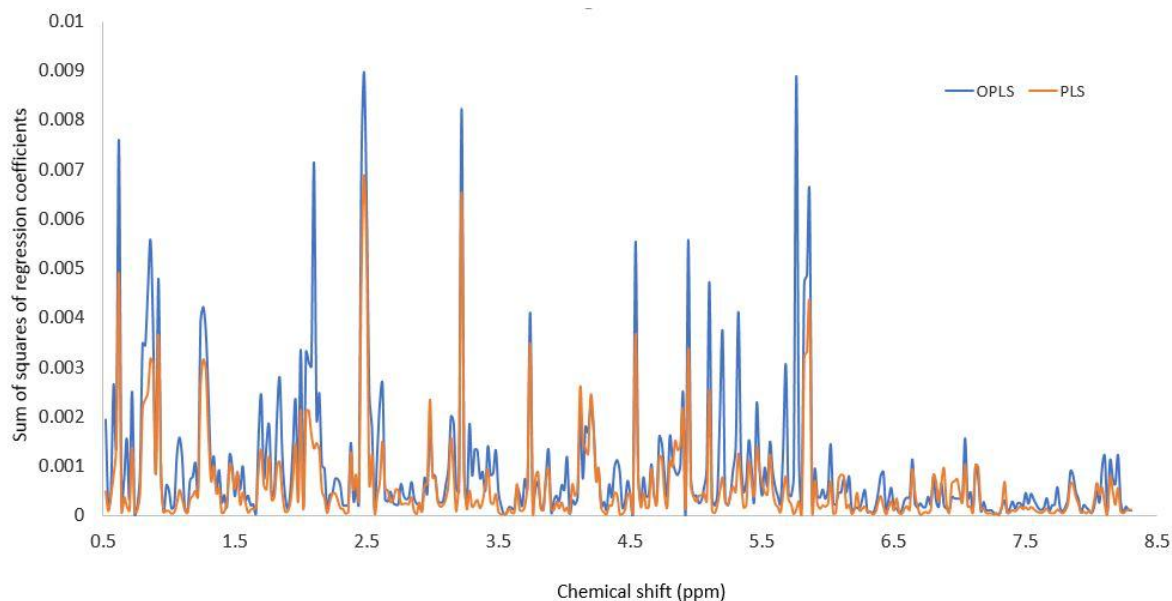


Figure 7. Sum of squares of the regression coefficient vectors of the PLS and OPLS models for all properties.

Further improvement in the developed methods may be performed for the implementation of potential quality control protocols and more accurate predictions by the inclusion of new samples with a diversity of origins, the determination of flavanones and dihydroflavonols with specific methods and the addition of IC₅₀ values of the samples as a target property. Specifically, as the method which involves the measurement at 410 nm–430 nm after addition of AlCl₃ solution is selective only for flavonols (quercetin, morin, kaempferol and rutin) and flavones luteolin, complementing the data with a measurement procedure at 510 nm in the presence of NaNO₂ in alkaline medium, may be a feasible form to evaluate rutin, luteolin and catechins, although it should be considered that phenolic acids exhibit considerable absorbance at this wavelength. With this new information, an improved interpretation of the relationship between polyphenols/flavonoids quantification and antimicrobial activity may be anticipated. This article allows a proof of the concept for such purposes.

3. Materials and Methods

3.1. Samples

Thirty-nine propolis samples were provided by local beekeepers (Federico Palma Valderrama and MVZ Ángel López Ramírez). The propolis samples were collected between 2011 and 2014 (Table 1). These 39 samples were obtained by different harvesting methods, 18 by scraping, one by wooden wedges (3 mm–5 mm thick), and 16 by plastic nets (mesh size = 2 mm).

3.2. Chemicals and Reagents

The reagents 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, 97%), gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), sodium carbonate, chlorhexidine gluconate, and quercetin, were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethanol was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Dimethyl sulfoxide-*d*₆ (D, 99.9%) +0.05% V/V TMS was supplied by Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA).

3.3. Extract Preparation

Five g of each crude propolis sample was extracted with ethanol (250 mL) at room temperature during 7 days. Each extract was taken to dryness under reduced pressure to afford the ethanolic extracts of propolis (EEP). Extracts were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

3.4. DPPH Radical Scavenging Assay

DPPH radical scavenging activity was investigated according to the method of Cheng et al. [24]. Briefly, an ethanolic solution of DPPH (0.208 mM, 0.1 mL) was mixed with extract (1 mg/mL, 0.1 mL) or Trolox (positive control, 1 mg/mL). The 96-well plate was incubated in the dark at room temperature for 20 min, and the absorbance was recorded at 540 nm. The percentage inhibition of the DPPH by each sample was calculated considering the percentage of the steady DPPH in solution after the reaction. All the determinations were performed in triplicates. The percentage scavenging effect was calculated as:

$$\text{Scavenging rate} = [1 - (A_2 - A_1)/A_0] \times 100\%$$

where A_0 is the absorbance of the control, A_1 the absorbance in presence of the sample, A_2 the absorbance of sample without DPPH radical.

3.5. Total Phenolic Content

The total phenolic content of propolis was determined as described by Singleton and Rossi [25] and Popova et al. [26]. Briefly, propolis extract (1 mg/mL, 20 μL) and Folin-Ciocalteu reagent (80 μL) were mixed well during 5 min and 7.5% sodium carbonate solution (80 μL) was added. The plate was covered and incubated in the dark (at room temperature) during 2 h. The absorbance was measured at 760 nm with a spectrophotometric microplate reader (Benchmark 11130, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Distilled water was used as a blank. The obtained absorbances were interpolated in a calibration curve ($y = 4.10x + 0.0324$, $R^2 = 0.9980$) of gallic acid. The results were expressed as mg equivalents of gallic acid/g of dry extract of propolis (EEP). All the determinations were performed in triplicates. The total phenolic content was estimated using gallic acid and quercetin as standards.

3.6. Total Flavonoid Content

The concentration of flavonoids was determined using the method described by Marquele et al. [27] using aluminum chloride reagent (2% in methanol). Extract (100 μL) was mixed with aluminum chloride solution (2% in methanol, 100 μL). After incubation for 30 min at room temperature, the absorbance was read at 420 nm and concentrations of flavonoids were determined from a calibration curve obtained with quercetin. The obtained absorbances were interpolated in a calibration curve ($y = 16.33x + 0.1032$, $R^2 = 0.9993$) of quercetin. The results were expressed as mg equivalents of quercetin/g of dry extract of propolis (EEP).

3.7. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The in vitro antibacterial activity of each EEP was determined using a broth microdilution test as recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute M7-A4 for bacteria CLSI [28]. The MIC was defined as the lowest concentration of the test agent that had restricted growth to a level <0.05 at 660 nm after incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 h–24 h. Growth inhibitory effects of the extracts were tested against *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Streptococcus oralis* (ATCC 35037) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). The procedures employed were as described previously [29]. Sterile 96-well microtiter plates were used. Each well in the microtiter plate contained *Streptococcus* (final concentration of 5×10^5 colony forming units (CFU)/mL), serially diluted EEP, and the appropriate growth medium. Triplicate samples were performed for each test concentration. The controls included inoculated growth medium without test compounds. Sample blanks contained uninoculated growth medium

only. All plates were incubated at 37 °C under appropriate atmospheric conditions with growth estimated spectrophotometrically (A_{660} nm) after 24 h using a microtiter plate reader. The MIC value for each test organism was defined as the minimum concentration of test compound limiting turbidity to $<0.05 A_{660}$ nm. As a positive control, chlorhexidine gluconate (CHX) was used.

3.8. NMR Experiments

All $^1\text{H-NMR}$ spectra of propolis extract were collected at 300 K on an Avance III HD 700 MHz spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) equipped with a 5-mm z-axis gradient inverse probe. The spectrum was recorded using the standard single-pulse sequence, with the 90° pulse length of 7.76 μs . 128 scans were collected into 32 k data points using a spectral width of 14 kHz with a relaxation delay of 5 s, and acquisition time 2.3 s. The free induction decays (FIDs) were multiplied by an exponential function with a line-broadening factor of 0.3 Hz before Fourier transformation. The $^1\text{H-NMR}$ spectra were manually corrected for phase and baseline distortion using MestReNova software (version 10.0.2, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). The $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts were referenced to TMS signal at 0.0 ppm. 20 mg of sample was weighed out and dissolved in 0.5 mL of $\text{DMSO-}d_6$ containing 0.03% TMS.

3.9. Data Processing for Multivariate Analysis

Using the software MestReNova each one-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectrum was sliced into 0.02 ppm sections between 0.5 ppm and 13.5 ppm. Processed spectra were normalized to the total average sum of integrals. The resulting normalized integrals composed the data matrix that was submitted to multivariate analysis.

3.10. Multivariate Analysis

Principal component analysis (PCA), an unsupervised explorative data analysis technique, and partial least squares regression projection to latent structures (PLS), and its orthogonal form (OPLS), regression models employed to find the fundamental relations between two data matrices, were used for data analysis. The quality of the models was evaluated based on the diagnostic tools: the cumulative modeled variation in matrix X , R^2X (cum), the proportion of the variance of the response variable that is explained by the model, R^2Y (cum), and the predictive ability parameter, Q^2 (cum).

All statistical data analyses were performed as implemented in the SIMCA 14.1.0.2047 software (MKS Umetrics, Malmö, Sweden) using unit variance (UV) scaling after optimization of this variable. For figures of merit determination an in house-made MATHLAB program was used with the outputs of the SIMCA software.

3.11. Figures of Merit

A figure of merit is a quantity used to characterize the performance of an analytical method. Well known in univariate calibration (where a single number is measured for each sample), the figures of merit can also be defined in multivariate calibration in an easy form through the Net Analyte Signal (NAS) concept [30–32].

The NAS concept arises from the fact that a prediction sample spectrum may have varying contributions from other sample components. Hence, the spectrum can be decomposed in two orthogonal parts: a part that can be uniquely assigned to the analyte of interest (the NAS), and the remaining part that contains the contribution from other components. Using the NAS, a multivariate calibration model can be represented in a pseudo-univariate plot. NAS is evaluated as:

$$\text{NAS}_i = (x_i \cdot b) \cdot (b^T \cdot b)^{-1} \cdot b^T$$

where x_i is a sample spectrum after preprocessing and b is a column vector of the PLS regression coefficients.

Accuracy. It expresses the proximity between the reference value and that predicted by the model. It can be measured in many forms, among them the Root Mean Square Error of Estimation (RMSEE) and the Root Mean Standard Error of Cross Validation (RMSECV):

$$RMSEE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 1}}$$

where y_i $y \hat{y}_i$ are the estimated and reference values, respectively, of the i , simple and n the total number of samples. RMSECV is calculated in a similar way by leaving out all permutations of a given number of samples from the training set and computing the total RMSEE value of the procedure by adding the RMSEE value for each calibration. RMSEE measures the fit of the model while RMSECV its predictive power.

Selectivity (sel). It expresses the fraction of the signal that changes when the concentration of the analyte varies in one unit. It can be evaluated through the NAS concept as:

$$sel = \frac{\|s_k^*\|}{\|s_k\|}$$

where $\|s_k\|$ stands for the norm of the sensitivity coefficients of the spectra containing the analyte k at unit concentration and $\|s_k^*\|$ for that corresponding to its NAS.

Sensitivity (sen). It is a measure of the response change with analyte concentration. In multivariate context represents the NAS generated by an analyte concentration equal to unity, and is evaluated through:

$$sen = \|s_k^*\| = \frac{1}{\|b\|}$$

where $\|b\|$ is the norm of the vector of regression coefficients of the calibration model.

Analytical sensitivity (γ). Defined by the ratio between sensitivity and instrumental noise, δx , as:

$$\gamma = \frac{sen}{|\delta x|}$$

it allows a comparison between methodologies based on very different instrumental measurements, as it is independent on the measured signal. The inverse of this parameter, γ^{-1} , establishes a minimum concentration difference that is discernible by the analytical method considering the random experimental noise as the only source of error.

Limit of detection (LD). It is defined as the minimum detectable value of the net signal (or concentration) for which the probabilities of false negatives (β) and false positives (α) are at maximum 5%. It is evaluated as:

$$LD = 3.3\delta x \frac{1}{sen}$$

Limit of quantitation (LQ). It determines the net signal or analyte concentration value which can be estimated with a relative error lower than 10%. It is evaluated as:

$$LQ = 10\delta x \frac{1}{sen}$$

4. Conclusions

The total phenol and flavonoid contents as well as the antioxidant (DPPH) and in vitro antibacterial activities against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguinis* were quantitatively correlated with ¹H-NMR spectra data using PLS and OPLS calibration models. Preliminary PCA analysis was performed to characterize the samples and to identify possible outliers. Results indicated a natural tendency of the samples of the same apiary or apiaries to lie in close proximity. PLS and OPLS regression methods gave excellent calibration models, although OPLS

performed better in terms of the RMSEE, RMSECV, R^2X (cum), R^2Y (cum), Q^2 (cum) and R^2 values, as expected due to the separation of the systematic variation in the predictive and non-predictive parts. The figures of merit of the developed methods were determined as well, so that methods were characterized in terms of their limits of detection and quantitation, sensitivity, selectivity and analytical sensitivity values (Table 3). The inclusion of new samples with a diversity of origins will be a recommendable form to improve the prediction capabilities of the developed models. The study demonstrates for the first time the possibility to develop a rapid and reliable method based on 1H NMR for the evaluation of the quality of propolis samples of different origin in terms of the evaluation of their chemical composition and antioxidant and antibacterial properties.

Supplementary Materials: Supplementary Materials are available online.

Acknowledgments: This work was supported by grants ICyTDF (PICSA 10-27) and CONACyT CB-252006. This study made use of UNAM's NMR lab: LURMN at IQ-UNAM, which is funded by CONACyT—Mexico (Project 0224747), and UNAM. We are in debt to Beatriz Quiroz, MVZ. Ángel López-Ramírez, Valeria Dunzz, Mary Jose Jasso, Fabiola Iñiguez and Mónica Casales for technical assistance. We also thank Sc. Baldomero Esquivel for his helpful advice on the preparation of this manuscript.

Author Contributions: N.E.-E. and J.F.R.-C. conceived and designed the experiments; S.R.-O. prepared the extracts and isolated the compounds; J.F.R.-C., J.P.-C. and S.R.-O. performed the antioxidant experiments, B.E.R.-C. performed the antimicrobial assays; C.C.H.-E. and N.E.-E. carried out the NMR experiments; E.R.S.M., N.E.-E. and C.C.H.-E. analyzed the data. N.E.-E., E.R.S.M. and J.F.R.-C. discussed the results and wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Sawaya, A.C.H.F.; Abdelnur, P.V.; Eberlin, M.N.; Kumazawa, S.; Ahn, M.-R.; Bang, K.-S.; Nagaraja, N.; Bankova, V.S.; Afrouzan, H. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta* **2010**, *81*, 100–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Zhang, T.; Omar, R.; Siheri, W.; Al Mutairi, S.; Clements, C.; Fearnley, J.; Edrada-Ebel, R.; Watson, D. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta* **2014**, *120*, 181–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Valencia, D.; Alday, E.; Robles-Zepeda, R.; Garibay-Escobar, A.; Galvez-Ruiz, J.C.; Salas-Reyes, M.; Jiménez-Estrada, M.; Velazquez-Contreras, E.; Hernandez, J.; Velazquez, C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.* **2012**, *131*, 645–651. [[CrossRef](#)]
4. Falcao, S.I.; Vilas-Boas, M.; Estevinho, L.M.; Barros, C.; Domingues, M.R.M.; Cardoso, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 887–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Salatino, A.; Fernandes-Silva, C.C.; Righi, A.A.; Salatino, M.L. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 925–936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Papotti, G.; Bertelli, D.; Bortolotti, L.; Plessi, M. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2852–2862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Papotti, G.; Bertelli, D.; Plessi, M.; Rossi, M.C. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 1610–1618. [[CrossRef](#)]
8. Nina, N.; Quispe, C.; Jimenez-Aspee, F.; Theoduloz, C.; Feresin, G.E.; Lima, B.; Leiva, E.; Schmeda-Hirschmann, G. Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the Región del Maule, Central Chile. *Molecules* **2015**, *20*, 18144–18167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Valenzuela-Barra, G.; Castro, C.; Figueroa, C.; Barriga, A.; Silva, X.; de Las Heras, B.; Hortelano, S.; Delporte, C. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Region Metropolitana de Santiago, Chile. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *168*, 37–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Velazquez, C.; Navarro, M.; Acosta, A.; Angulo, A.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Robles-Zepeda, R.; Lugo, E.; Goycoolea, F.M.; Velazquez, E.F.; et al. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 1747–1756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Navarro-Navarro, M.; Ruiz-Bustos, P.; Valencia, D.; Robles-Zepeda, R.; Ruiz-Bustos, E.; Virues, C.; Hernandez, J.; Dominguez, Z.; Velazquez, C. Antibacterial activity of Sonoran propolis and some of its constituents against clinically significant *Vibrio* species. *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 150–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768–1774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Buratti, S.; Benedetti, S.; Cosio, M.S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta* **2007**, *71*, 1387–1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yang, H.; Dong, Y.; Du, H.; Shi, H.; Peng, Y.; Li, X. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* **2011**, *16*, 3444–3455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 390–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bertelli, D.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Marcazzan, G.L.; Plessi, M. ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 260–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Simmler, C.; Napolitano, J.G.; McAlpine, J.B.; Chen, S.-N.; Pauli, G.F. Universal Quantitative NMR Analysis of Complex Natural Samples. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *25*, 51–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cuny, M.; Vigneau, E.; Le Gall, G.; Colquhoun, I.; Lees, M.; Rutledge, D.N. Fruit juice authentication by ¹H NMR spectroscopy in combination with different chemometrics tools. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 419–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Anđelković, B.; Vujisić, L.; Vučković, I.; Tešević, V.; Vajs, V.; Godevac, D. Metabolomics study of *Populus* type propolis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *135*, 217–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Watson, D.G.; Peyfoon, E.; Zheng, L.; Lu, D.; Seidel, V.; Johnston, B.; Parkinson, J.A.; Fearnley, J. Application of principal components analysis to ¹H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 323–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Maraschin, M.; Somensi-Zeggio, A.; Oliveira, S.K.; Kuhnen, S.; Tomazzoli, M.M.; Zeri, A.C.M.; Carreira, R.; Rocha, M. A machine learning and chemometrics assisted interpretation of spectroscopic data—A NMR-based metabolomics platform for the assessment of brazilian propolis. In *Lecture Notes in Computer Science, Proceedings of the IAPR International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics, Tokyo, Japan, 8–10 November 2012*; Springer: Berlin, Germany, 2012; Volume 7632, pp. 129–140.
22. Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Koo, H.; Rosalen, P.L.; Cury, J.A.; Park, Y.K.; Bowen, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1302–1309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7429–7436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
26. Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 235–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Marquede, F.D.; Di Mambro, V.M.; Georgetti, S.R.; Casagrande, R.; Valim, Y.M.L.; Fonseca, M.J.V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 455–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests*, 4th ed.; Approved Standards, M7-A4; CLSI: Wayne, PA, USA, 2008.
29. Cai, L. Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 987–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Olivieri Alejandro, C.; Faber Nicolaas, M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas John, H.; Mark, H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 633.

31. De Carvalho Rocha, W.F.; Nogueira, R.; Vaz, B.G. Validation of model of multivariate calibration: An application to the determination of biodiesel blend levels in diesel by near-infrared spectroscopy. *J. Chemometrics*. **2012**, *26*, 456–461. [[CrossRef](#)]
32. Braga, J.W.B.; Trevizan, L.C.; Nunes, L.C.; Rufini, I.A.; Santos, D., Jr.; Krug, F.J. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. *Spectrochim. Acta B* **2010**, *65*, 66–74. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Not available.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).