



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ANTIBACTERIANA DE PROPÓLEOS MEXICANOS**

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**VALERIA DUNZZ MARTINEZ**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Aguilar Laurents María Isabel**  
**VOCAL:**               **Profesor: Castañeda López Perla Carolina**  
**SECRETARIO:**       **Profesor: Rivero Cruz José Fausto**  
**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Díaz Ruíz Gloria**  
**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Figueroa Saldivar Mario Alberto**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** LABRATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S):** VALERIA DUNZZ MARTINEZ

(nombre y firma )

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por permitirme realizar los estudios de licenciatura.

Al Dr. José Fausto Rivero por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito y la corrección del mismo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica 252006.

Los resultados de este trabajo se incluyen 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.

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>2</b>
2.1 Panorama o situación de la Apicultura .....	2
2.1.1 Regionalización de la producción apícola en México y a nivel mundial .....	3
2.2 Proceso de producción del propóleo .....	6
2.2.1 Recolección y tratamiento del propóleo .....	7
2.2.2 Producción del propóleo en México .....	7
2.3 Actividades biológicas del propóleo .....	8
2.3.1 El propóleo y su actividad antioxidante .....	8
2.3.2 El propóleo y su efecto antibacteriano .....	10
2.4 Análisis químico del propóleo .....	17
2.4.1 Análisis de los propóleos por RMN 1H .....	20
2.4.2 Análisis de los propóleos por PCA .....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>25</b>
4.1 Preparación de los extractos etanólicos .....	25
4.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales .....	25
4.3 Cuantificación de flavonoides totales .....	25
4.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo del blanqueamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) .....	26
4.5 Determinación de la capacidad antibacteriana de los extractos sobre bacterias patógenas .....	26
4.5.1 Microorganismos de prueba .....	26
4.5.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	27

4.6 Análisis de los propóleos por RMN- <sup>1</sup> H.....	27
4.6.1 Preparación de las muestras y equipo de RMN empleado.....	27
4.7 Procesamiento de los datos .....	27
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
5.1 Contenido de fenoles y flavonoides totales.....	33
5.2 Evaluación de la actividad antioxidante.....	37
5.3 Determinación de la capacidad antibacteriana del propóleo sobre bacterias patógenas .	39
5.4 Análisis de los propóleos por RMN <sup>1</sup> H.....	42
5.5 Análisis de los propóleos por PCA.....	45
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>49</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>
<b>9. ANEXO</b> Artículo: Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by <sup>1</sup> H-NMR Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis.....	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de regiones apícolas en la República Mexicana que clasifican los propóleos mexicanos de acuerdo a su origen de obtención (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Diferentes tipos de propóleo en el mundo.	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Contenido de fenoles totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto de propóleo.	<b>34</b>
<b>Figura 4.</b> Contenido de flavonoides totales expresados en mg de equivalentes de quercetina/g de extracto de propóleo.	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b> Capacidad antioxidante de los extractos de propóleo estudiados.	<b>38</b>
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 700-MHz de 40 mg de propóleo disueltos en 0.6 mL de DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> conteniendo TMS como referencia. (a) extracto de Puebla, Valsequillo 1 y (b) extracto de Puebla, Cuetzalan.	<b>42</b>
<b>Figura 7.</b> Principales flavonoides presentes en propóleos de zonas templadas.	<b>44</b>
<b>Figura 8.</b> Análisis de PCA de los espectros de RMN- <sup>1</sup> H de los propóleos estudiados.	<b>46</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Investigaciones realizadas en los últimos años sobre los efectos antioxidantes y antimicrobianos del propóleo.	<b>12</b>
<b>Cuadro 2.</b> Compuestos aislados a partir de extractos de propóleo en el período de 2016 a 2017.	<b>18</b>
<b>Cuadro 3.</b> Aplicaciones del estudio PCA a extractos de propóleos.	<b>22</b>
<b>Cuadro 4.</b> Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante y capacidad antibacteriana de los EEPs.	<b>29</b>



## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ABTS	2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Infusión de cerebro y corazón (brain heart infusion)
°C	Grados centígrados
CAPE	Fenil éster del ácido caféico
CHX	Digluconato de Clorhexidina
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CFI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
δ	Desplazamiento químico
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EEP	Extracto etanólico de propóleo
g	Gramos
µg	Microgramos
Mg	Miligramos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Análisis de Componente Principal
ppm	Partes por millón

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Trolox®	(+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2- carboxílico.
UFC	Unidades formadoras de colonia

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se han realizado numerosas investigaciones enfocadas en encontrar nuevos productos de origen natural que reemplacen a los productos sintéticos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, evitando los efectos adversos y la toxicidad que implican su uso. Se ha demostrado que los productos naturales como el propóleo son efectivos para la prevención y el tratamiento de diversos padecimientos debido a los compuestos que contiene.

El propóleo como extracto natural se ha utilizado desde la antigüedad por los egipcios, romanos y persas como medicina tradicional en el tratamiento de abscesos, aftas y cicatrización de heridas. Esta resina es recolectada por las abejas a partir de las plantas y distintos árboles, para después mezclarlas con cera y sus propias secreciones salivales. La resina es pegajosa y de color variable (desde amarillo-verdoso hasta café). Las abejas lo utilizan para mantener la temperatura interna de la colmena, como material para recubrir las superficies internas de sus colmenas con la finalidad de propiciar un ambiente estable y estéril con el fin de evitar el crecimiento microbiano y su colonización por otros insectos (Tolba et al., 2016).

El propóleo está compuesto principalmente de resinas, bálsamos y ceras, y en menor proporción por aceites esenciales, aceites aromáticos, polen y desechos orgánicos. La composición química y sus constituyentes varía cualitativa y cuantitativamente dependiendo de la zona geográfica de donde es recolectado, así como de la fuente natural donde las abejas realizaron la colecta del producto vegetal (Ueda et al., 2017).

A la fecha, se han identificado más de 300 constituyentes en el propóleo. Entre los compuestos más importantes se encuentran: los flavonoides, los ácidos fenólicos, los terpenoides, los esteroides, las azúcares, las vitaminas y los aminoácidos; siendo los compuestos fenólicos los más abundantes.

## **2. ANTECEDENTES**

La actividad apícola se relaciona estrechamente con las condiciones climáticas, por lo que tradicionalmente genera incertidumbre entre los productores, no obstante, con el cambio climático derivado del calentamiento global, los riesgos y temores se incrementan, obligando al sector a la adopción de acciones que contrarresten los efectos negativos derivados tanto en la planta productiva como en la vegetación de características apibotánicas de las regiones productoras más importantes. La principal afectación y consecuencia de dichas contingencias, es la inestabilidad en las épocas de floración, pudiéndose encontrar retrasos en los inicios de las cosechas, la baja o nula producción de néctar, o simplemente que los árboles no florezcan (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

### **2.1 Panorama o situación de la apicultura**

La apicultura en México ha formado parte importante a lo largo de la historia de nuestro país, estaba particularmente desarrollada en el periodo de la cultura Olmeca en el sudeste del país, destacando la cultura Maya por sus prácticas apícolas. Actualmente tiene una gran importancia socioeconómica y ecológica, ya que es considerada como una de las principales actividades pecuarias generadora de divisas. La apicultura, es conocida y apreciada, principalmente, por la diversidad de productos que son obtenidos a partir de las abejas tal como la miel, pero también los productos derivados de la colmena como el polen, la cera, la jalea real, el propóleo y el veneno. Se destacan por su importante desempeño dentro de la misma colmena así como por sus aplicaciones en las industrias cosmética, farmacéutica y por supuesto la de los alimentos (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

Las abejas son fundamentales para un equilibrio del medio ambiente ya que al obtener el alimento de las flores fomentan en las plantas la capacidad de fecundarse. Gracias a ello, las plantas generan el oxígeno suficiente para la vida y aumentan el rendimiento en los cultivos, favoreciendo un incremento en alimentos de origen vegetal, materia prima textil, e insumos agropecuarios.

En los últimos años, la obtención de productos derivados de las abejas ha ido en decremento; de seguir presentándose a nivel mundial la pérdida de estos insectos, y aunado a factores como el cambio climático y el uso indiscriminado de plaguicidas, las abejas están en riesgo de extinguirse y desaparecer en ciertas regiones, provocando con ello que la sustentabilidad del apicultor se vea comprometida. Las pérdidas económicas que esto originaría a la apicultura serían mínimas comparadas con la de los ecosistemas, medio ambiente, disponibilidad de alimento y oxígeno (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

### **2.1.1 Regionalización de la producción apícola en México y a nivel mundial.**

La producción del propóleo depende de las condiciones del medio ambiente y de la disponibilidad de recursos naturales, como el polen y el néctar de las flores, por lo que en la mayor parte del país ésta se presenta fundamentalmente en dos épocas del año. La primera, en las regiones Sureste y Costas del país, donde la producción se obtiene entre los meses de marzo y mayo (primavera-verano), generando el 40 por ciento de la producción. La segunda, se obtiene en el Altiplano y Norte del país, entre los meses de septiembre y de noviembre (otoño-invierno), obteniendo el 60 por ciento restante de la producción.

Gracias a sus diferentes climas y flora, que influye sobre la composición de recursos de néctar y polen, México se divide en cinco regiones apícolas bien definidas, estas regiones son:

- **Región del Norte:** En esta región se integran los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León y parte del norte de Tamaulipas y altiplano de San Luis Potosí. Esta región se caracteriza por proveer productos apícolas de excelente calidad.
- **Región de la Costa del Pacífico:** Forman parte de esta región los estados de Sinaloa, Nayarit, poniente de Jalisco y Michoacán, Colima, parte de Guerrero, Oaxaca Chiapas. Se obtienen a partir de estas zonas productos de origen multifloral y de mangle.

- Región del Golfo: Esta región comprende al estado de Veracruz y parte de los estados de Tabasco, Tamaulipas y la región Huasteca de San Luis Potosí, Hidalgo y Querétaro.
- Región del Altiplano: Esta región incluye a Tlaxcala, Puebla, Ciudad de México, Morelos, Guanajuato, Aguascalientes, la parte oriente de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas y parte poniente de Hidalgo y Querétaro, así como la región media de San Luis Potosí. El origen floral de los productos obtenidos a partir de estas zonas son el acahual y la aceitilla.
- Región Sureste o Península de Yucatán: Esta región esta conformada por los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo y parte de los estados de Chiapas (Noreste) y Tabasco (Oriente). Se caracteriza por generar un gran volumen de productos apícolas y representa a la mayor parte de los apicultores del país. Los productos de esta zona gozan de gran prestigio nacional e internacional, ya que se caracterizan por tener su origen en floraciones únicas, como son la de Dzidzilche y de Tajonal.

Dado que la zona geográfica es uno de los factores primordiales a considerar en la composición y por ende en la actividad biológica de los propóleos, éstos se han clasificado de acuerdo a la región apícola en la cual fueron obtenidos; en el mapa de la Figura 1 es posible apreciar las diferentes regiones apícolas del país.



Fuente: Coordinación General de Ganadería / SAGARPA.

**Figura 1.** Mapa de regiones apícolas en la República Mexicana que clasifican los propóleos mexicanos de acuerdo a su origen de obtención (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

La composición química de los propóleos se ha estudiado extensivamente en diversas partes del mundo. Basándose en el origen floral y su perfil fitoquímico, los propóleos generalmente se clasifican en 5 diferentes grupos. En la Figura 2 se ilustra la distribución de los diversos tipos de propóleo existentes en todo el mundo.

Actualmente se ha demostrado que en las zonas templadas de Europa, América del Norte, regiones no tropicales de Asia, Nueva Zelanda y México, la principal fuente de propóleos son las secreciones de los álamos negros (*Populus nigra*) (Bankova et al., 2000). Así mismo, estudios demuestran que los propóleos originarios de estas zonas se caracterizan por tener una composición química similar, siendo sus principales constituyentes compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres (Salatino et al., 2011).

Los propóleos mexicanos al ubicarse en zonas templadas, pertenecen al tipo de Propóleo I donde predominan las fuentes vegetales de las especies *Populus*.

Se ha podido comprobar que las especies de plantas del género *Populus* son la fuente principal de exudados vegetales para la elaboración de propóleos de zonas templadas en la que predominan los flavonoides sin sustituciones en el anillo B.



**Figura 2.** Diferentes tipos de propóleo en el mundo. I: Derivado de álamo (zonas templadas de todo el mundo), II: Verde brasileño (Centro y sureste de Brasil), III: Derivado de *Clusia* (Noreste de Brasil, Venezuela, Zona de la selva Amazónica, Cuba), IV: Derivado de *Macaranga* (Este de África, Taiwán y Japón), V: Derivado del mediterráneo (Grecia, Creta y Turquía).

## 2.2 Proceso de producción de propóleo

Las abejas de la especie *Apis mellifera* recolectan resina de las yemas y las grietas en las cortezas de los árboles y brotes de las hojas. Posteriormente secreciones enzimáticas mandibulares son añadidas a la resina y el material parcialmente digerido es mezclado con la cera de abeja para utilizarse en la colmena principalmente como material de construcción para sellar agujeros en los panales, así como dar forma a las paredes de la colmena con el fin de proteger la entrada a la misma y mantener una temperatura y humedad adecuadas; se cree que esta resina también sirve como antiséptico para crear superficies dentro de la colmena libres de gérmenes (Burdock, 1998; Kuropatnicki et al., 2013).



Generalmente la producción de propóleo de una colonia depende de factores climáticos, de los recursos forestales, de las mismas abejas y del método o mecanismo de recolección, sin embargo los datos encontrados en la literatura muestran resultados variados, que van de 150 a 200 g (Ghisalberti, 1979) y de 10 a 300 g de propóleo al año por colonia (Andrich et al., 1987).

### **2.2.1 Recolección y tratamiento del propóleo**

La recolección del propóleo de las colmenas se realiza mediante los métodos de raspado o trampas, siendo este último el que ofrece la mejor calidad ya que permite disminuir la contaminación de la resina provocada por la manipulación a diferencia del raspado de las colmenas en malla. La temporada de recolección se realiza dependiendo de las condiciones ambientales estacionales, donde se ha observado una propolización más activa; en las zonas templadas la obtención se realiza antes de la llegada del invierno, mientras que en los climas tropicales se hace al inicio de la estación lluviosa (Farré *et al.*, 2004).

Si el propóleo es muy ceroso se lava con agua fría y es secado con aire en pantallas de acero inoxidable. Posteriormente se disuelve en etanol al 95% para remover ceras y se filtra para retirar residuos de material orgánico no deseado (SAGARPA Claridades Agropecuarias, 2010).

### **2.2.2 Producción de propóleo en México**

Los países que destacan en la producción mundial de propóleo son China, Argentina, Brasil, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá (CONACYT Agencia Informativa, 2015).

La producción de propóleos en México es muy limitado y de no muy buena calidad, debido a que muchos apicultores mexicanos carecen del conocimiento para la extracción y procesamiento del propóleo y la mayoría ignora el valor de la resina, por lo que la mayor parte de su producción está basada en el raspado interno que realiza el productor durante la revisión de sus colmenas. También influye la falta de demanda por parte de las empresas, ya que el mercado de los productos de la colmena está principalmente enfocado al comercio de la miel,

resultando en el lento desarrollo de la promoción para incrementar la producción y uso del propóleo, sin embargo, por ser un producto que da alternativas económicas al productor, mediante la capacitación y asistencia técnica se puede fomentar la producción utilizando la tecnología, a través de trampas que permitan coleccionar un propóleo de mejor calidad en el mediano plazo para cubrir la demanda nacional, e incursionar en el largo plazo en mercados internacionales como lo es Japón, que adquiere alrededor del 85 por ciento de la producción mundial de propóleos, y sabiendo que el precio internacional del propóleo es aproximadamente de 100 dólares por kilogramo. Sin lugar a dudas es una importante fuente alterna de ganancias para los apicultores que necesita ser promovida y explotada.

## **2.3 Actividades biológicas del propóleo**

### **2.3.1 El propóleo y su actividad antioxidante**

El oxígeno es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aerobios, ya que participa en diversas reacciones de oxidación, incluyendo la respiración. Es utilizado por las células como fuente de energía a través de los procesos de fosforilación oxidativa; durante estos mecanismos el oxígeno molecular se reduce, dando origen a las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS), las que en su mayoría son radicales libres (Lopez et al., 2014).

Los radicales libres son aquellas especies químicas con un electrón desapareado lo que hace que sean muy inestables y altamente reactivas. Una vez que el radical libre consigue sustraer el electrón que le hace falta, la molécula estable que se le cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con electrón desapareado, iniciándose así con reacciones en cadena que provocan destrucción celular y alteran estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas. A pesar de que la producción de ROS se encuentra controlada fisiológicamente, un aumento en la producción de estos que no es compensado por la defensa antioxidante celular, genera el estrés oxidante.

El estrés oxidante, provocado por un aumento en la producción de radicales libres o por un decremento en la cantidad de antioxidantes presentes, se caracteriza por la incapacidad de los antioxidantes endógenos de contrarrestar el daño oxidativo en blancos biológicos. En este contexto, se ha sugerido que al no contar con la suficiente cantidad de antioxidantes en el cuerpo, aumenta el riesgo de desarrollar alguna patología asociada con el envejecimiento celular tal como el cáncer, procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos como Alzheimer y Parkinson, entre otros (Tolba et al., 2016).

Para contrarrestar el estrés oxidante, los antioxidantes ejercen su acción impidiendo el daño de moléculas biológicas al reaccionar más rápido con los radicales libres y los ROS. El cuerpo humano posee diferentes mecanismos de defensa frente a las agresiones oxidativas; enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y glutatión peroxidasa son el sistema principal encargado de proteger al organismo de la oxidación (Lei et al., 2012) pero si la producción de radicales libres supera la capacidad del sistema enzimático, existe una segunda línea de defensa que son los antioxidantes presentes en las vitaminas C y E, los carotenoides y los compuestos fenólicos que son aportados por medio de la dieta o a través de fármacos; razón por la cual, se ha concentrado toda la atención en la capacidad antioxidante de productos naturales como los derivados de abejas (miel y propóleo) y extractos de plantas medicinales (Bittencourt et al., 2015).

Los compuestos fenólicos y flavonoides son los metabolitos más abundantes de los propóleos. Ambos tipos de compuestos han demostrado poseer gran capacidad para remover a los radicales libres. Debido a los diversos efectos biológicos del propóleo, su uso ha ido evolucionado con el tiempo, y hoy en día se utiliza como ingrediente en la elaboración de dulces, mieles, bebidas, productos farmacéuticos y productos cosméticos (Zingue et al., 2017).

Se han desarrollado diversos ensayos *in vitro* que han permitido el estudio del potencial antioxidante de productos naturales; ya que evaluar los mecanismos de

acción de los antioxidantes de forma *in vivo* representa mucha mayor complejidad además de que requieren de mucho más tiempo.

El ensayo de atrapamiento del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es uno de los métodos *in vitro* más utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras de propóleos. El DPPH es un radical libre estable que reacciona con compuestos capaces de donar un átomo de hidrógeno. Este método se basa en el atrapamiento del DPPH a través de la adición de especies antioxidantes que decoloran la solución de DPPH. La actividad antioxidante es medida finalmente por una disminución en la absorbancia a 515 nm (Moreno et al., 2000).

### **2.3.2 El propóleo y su efecto antibacteriano**

Las propiedades antimicrobianas del propóleo son atribuidas, principalmente, a la presencia de flavonoides como la pinocembrina, galangina y al fenetil éster del ácido caféico (CAPE) ya que son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos (Nam et al., 2016). Ejerce sus propiedades antibacterianas sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y su grado de efectividad depende de la forma de extracción del propóleo, del disolvente empleado, la procedencia geográfica (el lugar de origen de la colmena de donde es recolectada la resina) y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos los más efectivos (Rivero et al., 2017). Es importante mencionar que la actividad inhibitoria del propóleo sobre diversas bacterias depende principalmente del origen geográfico de éste, ya que el ambiente ejerce influencia en el contenido de compuestos fenólicos, que como ya se mencionó anteriormente, son los responsables de las propiedades antimicrobianas de los propóleos.

Los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* son representantes principales de bacterias patógenas; los *Streptococcus* son considerados bacterias cariogénicas, los *Staphylococcus* son agentes etiológicos importantes

asociados a infecciones dérmicas superficiales y profundas, y las *Pseudomonas* son bacterias causantes de diversas infecciones.

El mecanismo por el cual el propóleo actúa contra microorganismos patógenos aún no ha sido del todo entendido; no obstante diversos estudios sugieren que su actividad antimicrobiana es compleja y puede ser atribuido al sinergismo entre flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos presentes en ellos, y no a la acción que cada uno ejerce por separado. Así mismo, se ha encontrado que actúa principalmente debilitando la membrana citoplasmática y la pared celular provocando lisis celular, inhibición de la síntesis proteica e inhibición del proceso de replicación y expresión genética de los microorganismos (Eralp et al., 2016).

La mayoría de las cepas bacterianas han ido evolucionando con el tiempo alterando su composición química en un intento por seguir sobreviviendo ante los ambientes más hostiles (Bryan et al., 2016); son de gran importancia clínica por el incremento progresivo de mutaciones que les han conferido resistencia a múltiples antibióticos. En la actualidad, se ha estado retomando el uso de la herbolaria tradicional como alternativa de combate de diversas enfermedades, y aún se encuentra en proceso de estudio el lograr suplementar o incluso reemplazar a los productos farmacéuticos por productos naturales o sus extractos debido a que estos últimos generan nulas o mínimas reacciones adversas en comparación a las principales desventajas que limitan la administración de fármacos como son sus características citotóxicas y efectos adversos variables (Nam et al., 2016).

En los propóleos, la capacidad antioxidante y antibacteriana, como ya se mencionó anteriormente, se ha relacionado con la variación en su composición química que influye así mismo, con su habilidad de prevenir diversas enfermedades; a continuación en el Cuadro 1 se detallan algunos estudios realizados en diversos países durante los años 2016-2017 de los propóleos en relación a sus efectos antimicrobianos y antioxidantes.

**Cuadro 1.** Investigaciones realizadas en los últimos años sobre los efectos antioxidantes y antimicrobianos del propóleo.

<b>CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA</b>		
<b>Descripción</b>	<b>Resultados</b>	<b>Autores</b>
<p>Se evalúa la actividad antioxidante y antimicrobiana de diferentes extractos de propóleo (etanólicos, hidroetanólicos y acuosos) provenientes de Kashmir, India mediante los ensayos de blanqueamiento del radical DPPH y la difusión en disco en agar, respectivamente.</p> <p>Así mismo realizaron la cuantificación de fenoles y flavonoides totales.</p>	<p>Todos los extractos mostraron capacidad de capturar radicales libres, pero el EEP fue el que presentó mayor potencial, obteniendo un valor de <math>CI_{50} = 65.49 \pm 7.01 \mu\text{g/mL}</math> para el ensayo de DPPH, En la actividad antimicrobiana, los EEPs probaron tener mayor eficacia contra cepas como <i>Staphylococcus aureus</i>, generando un diámetro de halo de inhibición de <math>25.63 \pm 0.63\text{mm}</math>.</p> <p>En la cuantificación de fenoles y flavonoides totales, se obtuvieron valores de <math>260 \pm 10.0 \text{mgEAG/g}</math> y <math>105 \pm 5.0 \text{mgEQ/g}</math>, respectivamente.</p>	(Wali et al., 2016)
<p>Se evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana de propóleos rojos, verdes y cafés de Brasil obtenidos por extracción etanólica y supercrítica. La actividad antioxidante se determinó siguiendo la metodología ABTS.</p> <p>Se estudió a <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> para evaluar la actividad antimicrobiana usando el método de microdilución en placa con el fin de obtener las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).</p>	<p>Los EEPs resultaron con un potencial antioxidante mayor que aquellos propóleos obtenidos por extracción supercrítica. Dichos resultados corroboran que la capacidad antioxidante de las muestras varía de acuerdo a su forma de extracción.</p> <p>Los EEPs rojos fueron los que presentaron la mayor capacidad antioxidante y de la misma manera, exhibieron el mejor efecto antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> con un valor de CMI de <math>62.5 \mu\text{g/mL}</math>.</p>	(Silva et al., 2017)

**Cuadro 1.** Investigaciones realizadas en los últimos años sobre los efectos antioxidantes y antimicrobianos del propóleo (continuación).

<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b>		
<b>Descripción</b>	<b>Resultados</b>	<b>Autores</b>
Reportan la capacidad antioxidante del propóleo de Maland, Indonesia. Describen el contenido de fenoles y flavonoides totales así como la capacidad de capturar radicales libres por el ensayo de DPPH.	El contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos de propóleo fue de 0.379 µg/g de panal seco y 0.913 µg/g panal seco, respectivamente. La habilidad de capturar al radical DPPH fue de 57.510 ± 3.027 %.	(Nugraheni et al., 2016)
Se analizaron propóleos de diversas regiones de Bolivia por HPLC-DAD-MS/MS y RMN para identificar los principales metabolitos responsables de la actividad biológica. Así mismo, se determinó la cantidad de fenoles y flavonoides totales y se evaluó la actividad antioxidante de todos los extractos.	Por el análisis de HPLC-DAD-MS/MS se demostró que existen diferencias químicas entre los extractos estudiados. Independientemente de la región de recolecta, el propóleo boliviano presentó alto contenido de fenoles y triterpenoides. Los extractos metanólicos ricos en fenoles ejercieron actividad antioxidante moderada a alta; mientras que aquellas fracciones ricas en triterpenoides ejercieron actividad deficiente.	(Nina et al., 2016)
Se probó el efecto de un propóleo Mexicano proveniente de Chihuahua en ratones previamente inducidos con diabetes mellitus. Evaluaron la capacidad antioxidante de los extractos por el ensayo de atrapamiento del radical DPPH, se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales y se analizó la composición química de las muestras por las técnicas de HPLC-DAD y HPLC-MS.	Los resultados demostraron que los EEPs de Chihuahua inhibieron significativamente el incremento de glucosa en sangre y la pérdida de peso en ratones diabéticos. También ejercieron una potente capacidad antioxidante ( $SA_{50} = 15.75 \mu\text{g/mL}$ ) que se relacionó directamente con las concentraciones de fenoles (314 mg EAG/g de EEP) y flavonoides (6.25 mg EQ/g de EEP) totales. Así mismo, compuestos como la pinocembrina, la quercetina, la naringina, el kaemferol y la crisina fueron identificados en las muestras mediante las distintas técnicas de HPLC empleadas.	(Rivera et al., 2018)

**Cuadro 1.** Investigaciones realizadas en los últimos años sobre los efectos antioxidantes y antimicrobianos del propóleo (continuación).

Descripción	Resultados	Autores
Se estudió las características químicas de los principales metabolitos del propóleo verde de Brasil así como su capacidad antioxidante. La separación e identificación de los compuestos se logró por las técnicas de HPLC-UV y HPLC-ESI-MS/MS. También se realizó un estudio off-line HPLC-DPPH para la evaluación del proceso de captura de radicales libres.	Se presentaron variaciones en la cantidad de fenoles totales y flavonoides de las distintas fracciones de propóleo estudiadas. Se obtuvieron concentraciones en un rango de 87.5 a 148.06 mg EAG/g y 38.4 a 67.6 mg EQ/g, respectivamente. Todas las fracciones ejercieron buena capacidad de captura de radicales libres con valores de $CI_{50}$ que variaron de 93.51 a 190.27 $\mu\text{g/mL}$ . Se descubrieron nueve compuestos relacionados con el potencial antioxidante, destacando la artepilina C y los derivados de los ácidos cafeoquinicos.	(Zhang et al., 2017)

<b>ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</b>		
Se estudiaron EEPs de Rusia a diferentes concentraciones como agente antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . Para entender el mecanismo de acción por el cual el propóleo es capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias, se realizaron estudios de microscopía y lisis bacteriana.	Se obtuvo la exitosa inhibición de <i>S. aureus</i> pero no resultó ser así contra <i>E. coli</i> . Explican que dicho resultado se asocia con la diferencia en la composición de la pared celular de las bacterias. A la concentración de 3% peso/volumen de EEP sólo se observó la inhibición de bacterias Gram-positivas. En contraste, cuando se trató a la concentración de 5% p/v resultó la completa inhibición de ambas cepas. Se cree que la capa extra de polisacáridos que poseen las bacterias Gram-negativas actúa como un recubrimiento extra de protección. Se demostró que el mecanismo de acción del propóleo se apega más a generar un daño estructural que funcional ya que daña la membrana provocando lisis celular.	(Brayan et al., 2016)



**Cuadro 1.** Investigaciones realizadas en los últimos años sobre los efectos antioxidantes y antimicrobianos del propóleo (continuación).

Descripción	Resultados	Autores
<p>Evaluaron la capacidad antimicrobiana de EEPs de origen Pakistán contra patógenos anaerobios asociados a enfermedades periodontales utilizando ensayos de difusión en agar. Se comparó la efectividad de extractos etanólicos obtenidos por ultrasonificación y maceración.</p>	<p>Las muestras etanólicas extraídas por ultrasonificación ejercieron mayor actividad que los extraídos por maceración. El propóleo extraído por ultrasonificación actuó sobre <i>Prevotella intermedia</i> y <i>Phorphyromona gingivalis</i> obteniendo una difusión en agar de 19.8 y 20.7 mm respectivamente. Los propóleos extraídos por maceración generaron difusiones en agar de 20.4 y 20.2 mm.</p>	<p>(Shabbir et al., 2016)</p>
<p>Estudian la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de diversas regiones en Bolivia. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se obtuvieron por microdilución en caldo y se utilizaron bacterias patógenas como <i>Staphylococcus aureus</i>, diversas cepas de <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Salmonella enteritidis</i>, entre otras.</p>	<p>Los extractos metanólicos con mayor actividad obtuvieron valores de CMI de 31.2µg/mL contra <i>E. coli</i>. Los resultados comprueban que el propóleo de Bolivia es mucho más activo contra bacterias Gram-negativas que Gram-positivas. Los valores de CMI contra <i>S. aureus</i> resultaron ser de 125 a 250 µg/mL. Concluyen que la actividad antibacteriana atribuida a los propóleos depende de su sitio de recolección y que además se ve influenciado por la composición química de estos.</p>	<p>(Nina et al., 2016)</p>
<p>Se comparó la efectividad de propóleos de Turquía con la efectividad de la clorhexidina (CHX) contra el crecimiento de diversas bacterias y sus respectivos biofilms. Entre las cepas estudiadas se destacan: <i>S. mutans</i>, <i>S. sobrinus</i>, <i>E. faecalis</i>, <i>S. aureus</i>.</p>	<p>Los EEPs y la CHX inhibieron el crecimiento de todas las cepas. La CHX presentó CMI mucho más bajas que las de los EEPs contra los biofilms de <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i>. Los EEPs fueron más efectivos inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas. Concluyeron que el propóleo podría servir como alternativa natural en la elaboración de enjuagues bucales para evitar la aparición de efectos secundarios provocados por la CHX.</p>	<p>(Eralp et al., 2016)</p>

**Cuadro 1.** Investigaciones realizadas en los últimos años sobre los efectos antioxidantes y antimicrobianos del propóleo (continuación).

Descripción	Resultados	Autores
<p>Evalúan la composición y actividad antibacteriana del propóleo rojo de Brasil (BRP) respecto a la temporada y estación del año en la que se recolectan. La composición química se determinó por análisis fisicoquímicos y HPLC. La actividad antimicrobiana se evaluó contra <i>S. mutans</i>, <i>S. sobrinus</i>, <i>S. aureus</i> y otros.</p>	<p>Los perfiles químicos variaron de acuerdo al periodo de recolección. El compuesto mayoritario fue la formonetina Sugirieron que el efecto antibacteriano puede asociarse a la presencia de la isoliquiritigenina, el (3S)-neovestitol y el (3S)-vestitol. Las CMI's variaron de 15.6 hasta 125 µg/mL, Se afirma que la temporada de recolección si afecta la composición química y la actividad antimicrobiana del propóleo ya que varía la concentración de los compuestos activos.</p>	<p>(Bueno-Silva et al., 2017)</p>
<p>Se evaluaron EEPs de Australia al 5% y 10% de peso seco. Se estudió la actividad antibacteriana de este propóleo con el fin de prevenir caries asociadas a bacterias como <i>S. gordinii</i>, <i>S. intermedius</i> y <i>S. sanguinis</i>.</p>	<p>Ambas concentraciones de propóleo inhibieron el crecimiento bacteriano. El efecto antibacteriano observado permite sugerir que el propóleo podría ser utilizado como alternativa terapéutica en el tratamiento de infecciones bucales sin causar efectos adversos provocados por los productos farmacéuticos.</p>	<p>(Nam et al., 2016)</p>
<p>Se desarrollaron nanofibras de celulosa de ácido poliláctico (PLA) recubiertas con EEPs de Irán. Se estudió su composición química para determinar los compuestos principales asociados a su capacidad antimicrobiana. Se evaluó su efectividad contra microorganismos patógenos como <i>Bacillus cereus</i> y <i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella entérica</i>.</p>	<p>El análisis químico indicó que los propóleos presentaron concentraciones altas de ácidos aromáticos, fenoles, ésteres y otros derivados, quienes son responsables de sus propiedades antibacterianas. Las nanofibras cubiertas con propóleo lograron inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas incluso a concentraciones muy bajas. por lo que la adición de este producto natural incrementó drásticamente el efecto antibacterial de las nanofibras. .</p>	<p>(Abdulkhani et al., 2017)</p>

## **2.4 Análisis químico del propóleo**

El propóleo es un producto derivado de plantas que las abejas recolectan a partir de diferentes órganos de la planta, su composición química así como las moléculas responsables de su bioactividad dependen en gran medida del origen y la región botánica de cada planta. La comprensión de la diversidad química de esta resina ha sido de gran interés para diversos investigadores en los últimos años y es importante llevarla a cabo para cumplir con los criterios relacionados con control de calidad y normalización, que son necesarios para su uso en la industria.

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) es una de las técnicas analíticas más utilizadas para el análisis químico de mezclas complejas tal como lo es el propóleo (Bankova et al., 2016). Así mismo, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha sido y sigue siendo la técnica de separación más apropiada para el análisis de productos naturales. Por otra parte, el análisis cualitativo y cuantitativo para la identificación de los constituyentes del propóleo usualmente se lleva a cabo mediante la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN). El uso de la espectroscopía de masas-cromatografía de líquidos (LC-MS) se ha incrementado durante los últimos años, ya que es una eficiente herramienta que contrarresta la difícil tarea de realizar el perfil químico del propóleo, debido a la gran diversidad de resinas recolectadas por las abejas melíferas (Steinmann et al., 2011).

La huella digital obtenida por la espectrometría de masas es una herramienta analítica que permite caracterizar la composición química de muestras de propóleo, donde identificar el origen de la resina vegetal es una de las ventajas que le confieren a dicho método. La espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI-MS) es útil para discriminar claramente entre la diversidad de grupos existentes en las muestras que se analizan (Bankova et al., 2016). El uso de un método quimométrico como el PCA para el análisis de resultados es necesario por el gran número de iones presentes en los espectros; este método de análisis es capaz de agrupar las fracciones que son similares en su

composición, indicando sus marcadores iónicos e incluso, en algunos casos, correlacionándolo con la actividad biológica de las muestras (Brereton 2002).

En el Cuadro 2 resumen los compuestos químicos aislados a partir de extractos de propóleo recolectados en diversas regiones del mundo durante el período 2016 a 2017. Los compuestos que se encontraron con mayor frecuencia en los propóleos son de tipo fenólico y a ellos se les considera los responsables de las actividades farmacológicas y biológicas del propóleo. Algunas de las actividades biológicas y farmacológicas que se le han descrito al propóleo son las actividades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (Wali et al., 2016).

**Cuadro 2.** Compuestos aislados a partir de extractos de propóleo en el período de 2016 a 2017.

Nombre del compuesto	Procedencia	Referencia
3,7,4',5'-tetrametil éter de mirecetina 3,7,3'-trimetil éter de quercetina	Túnez	(Saeed et al., 2016)
5,6,7-trihidroxi-3,4'-dihydroxiflavona kaempferida Aromadendrina-4',3,5,7-trihidroxi-6,4'- dimetoxiflavona Éter metílico de la artepilina C	Brasil	(Saeed et al., 2016)
Galangina Crisina 3-O-metilgalangina 7-O-methylgalangina	Chile	(Saeed et al., 2016)
2',4'-dihidroxi-3' metoxichalcona 2',4'-dihydroxichalcona 2',4',4-trihidroxi-6'-metoxichalcona 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona 4',5-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona 7-hidroxi-5,8-dimetoxiflavona	Argentina	(Saeed et al., 2016)

**Cuadro 2.** Compuestos aislados a partir de extractos de propóleo en el período de 2016 a 2017 (continuación).

Nombre del compuesto	Procedencia	Referencia
Ácido 9-octadecanoico Ácido hexadecanoico Ácido benzoico Ácido 3-hidroxi-4-metoxicinámico Ácido 3,4-dimetoxicinámico Bencil benzoato Benzene etanol β-eudesmol β-bisabolol 2-nonadecanona 2-propen-1-ona 4H-1-benzopiran-4-ona Ácido 2-propanoico Eicosano	Turquía	(Saeed et al., 2016)
5-pentadecilresorcinol 5-(8'Z,11'Z-heptadecadienil)-resorcinol 5-(11'Z-heptadecenil)-resorcinol 5-heptadecilresorcinol	Indonesia	(Saeed et al., 2016)
Ácido 2-hidroxi-6-heptadec-8Z,11Z,14Z-trienilbenzoico Ácido hidroxi-cinámico etil éster Ácido 3-metoxi-cinámico Ácido 3,4-dimetoxi-cinámico Ácido <i>m</i> -hidroxi-cinámico 5,7-dihidroxi-dihidroflavona Tectocrisina Crisina 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona 4H-1-benzopiran-4-ona Pinostrombina Galangina	Turquía	(Eralp et al., 2016)
Ácido benzoico Ácido <i>p</i> -metoxi-cinámico Ácido <i>p</i> -cinámico Ácido 3,4-dimetoxi-cinámico Ácido 4-metoxi-cinámico Ácido caféico 3-metil-3-butenil isoterulato 2-metil-2-butenil-isoterulat-2,6-di- <i>t</i> -butil-4-nitro-fenol 5-(hidroximetil)resorcinol	Irán	(Abdulkhani et al., 2017)

**Cuadro 2.** Compuestos aislados a partir de extractos de propóleo en el período de 2016 a 2017 (continuación).

Nombre del compuesto	Procedencia	Referencia
Ácido clorogénico Ácido cafeico Ácido <i>p</i> -cumarico Ácido 3,5-dicafeoilquínico Ácido 4,5-dicafeoilquínico Aromadendrin-4'-metil éter Ácido 3,4,5-tricaffeoilquínico Kaempferol Ácido 3-prenil-4-hidroxi-cinámico Kaempferide Betuletol Artepilina C Ácido 3-prenil-4-dihidrocinnamoiloxi cinámico Ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromen-6-propenóico	Brasil	Zhang et al., 2017)

#### 2.4.1 Análisis de los propóleos por RMN

La resonancia magnética nuclear (RMN) es otra herramienta frecuentemente utilizada para estudiar estructuras moleculares y analizar mezclas complejas como extractos de hierbas y fluidos biológicos (Forseth et al., 2011); desde su descubrimiento, ha sido ampliamente explotada como un importante método para la investigación en laboratorios analíticos por todo el mundo. Debido a la variedad de información disponible sobre los espectros de RMN y la facilidad con la que se logra la preparación de las muestras a analizar hace de esta técnica espectroscópica una opción bastante atractiva para la evaluación de la calidad de diversos productos. Una de las principales ventajas de esta técnica que le permite resaltar de otros métodos, es su habilidad de proporcionar información estructural y cuantitativa en un rango muy amplio de especies químicas en un solo espectro de RMN (Kwon et al., 2014). Es capaz de aportar información estructural y de composición en poco tiempo y se caracteriza por ser una técnica no destructiva, además que no requiere de tratamientos complejos previo a la obtención del espectro.

Desde hace algunos años la RMN se ha utilizado para el análisis de mezclas de gran complejidad tal como lo son los extractos de propóleo; esta técnica tiene la capacidad de detectar ceras, terpenos y compuestos fenólicos de forma simultánea por lo que se emplea para determinar similitudes y/o diferencias químicas existentes entre distintas muestras de propóleos.

Recientemente, el uso de Resonancia Magnética Nuclear de dos dimensiones, ha despertado interés para utilizarse como método rutinario en el análisis de mezclas complejas (Charlton et al., 2002). Existen dos estrategias principales para analizar mezclas a través de RMN: (a) separar los componentes de la mezcla antes de llevar a cabo el análisis por RMN; y (b) analizar la mezcla sin tratamiento. La primera estrategia se usa cuando el objetivo del trabajo es la caracterización de un compuesto aislado. La segunda estrategia permite obtener una imagen general de la mezcla sin llevar a cabo ningún tratamiento previo en la muestra, exceptuando eventualmente, solubilizar esta en el disolvente adecuado. Una vez que se obtiene el espectro, se requiere de herramientas que proporcionen un pre-tratamiento de las señales y el análisis de los resultados, basados normalmente en técnicas de estadística multivariable (Papotti et al., 2010).

La aplicación de técnicas de RMN para el estudio de muestras de propóleo, resulta en la obtención de espectros bastante complicados que necesitan ser procesados antes de llevar a cabo cálculos espectrales. Para ello, los métodos quimométricos intervienen para realizar análisis en los que se involucran múltiples variables y cuando se requiere obtener información que relacione dichas variables con el comportamiento de las muestras. La quimometría involucra el análisis multivariable mediante modelos matemáticos, la informática y la química analítica y se ha utilizado ampliamente en el estudio de muestras complejas donde la cantidad de variables excede la percepción del hombre. Los analistas hoy en día usan diferentes tipos de técnicas quimométricas para correlacionar grandes cantidades de datos químicos con propiedades moleculares relevantes, una de ellas se conoce como la técnica por análisis de componentes principales o PCA.

### 2.4.2 Análisis de Componentes Principales a extractos de propóleo

El PCA es una técnica multivariante que permite reducir el número de variables originales a un número menor para representar gráficamente la población de muestras e identificar el factor original más significativo (Brereton, 2013). Se ha empleado para clasificar a los propóleos de acuerdo a su origen geográfico o bien, conforme al método de recolección empleado. Por ejemplo, Watson y cols. (2006b) utilizan la RMN en conjunto con el PCA para construir un modelo de clasificación de los propóleos de acuerdo a sus diferentes orígenes geográficos. En este estudio, los autores se basan en la técnica de los cuadrantes que consiste en dividir el espectro en pequeñas regiones diferentes, y posteriormente, las señales que se generan en cada región son integradas y los resultados de las áreas se utilizan como variables espectrales. Dicho modelo es capaz de clasificar las muestras de diferentes partes del mundo.

En la Cuadro 3 se presentan algunas aplicaciones en las que se utiliza el análisis por PCA en muestras de propóleo utilizando diferentes técnicas instrumentales como CG-MS, FTIR y UV-visible.

**Cuadro 3.** Aplicaciones del estudio PCA a extractos de propóleos.

Descripción	Ref.
Aplicó el PCA a muestras de propóleos obtenidas de diferentes orígenes geográficos. Recolectados de Europa, Asia, África, Islas Salomón y Brasil.	(Watson et al., 2006b)
Identificación geográfica de los propóleos mediante CG/EM y PCA.	(Cheng et al., 2013)
Evaluación rápida y efectiva de la capacidad antioxidante de los extractos de propóleos usando el método de blanqueamiento de DPPH con FT-IR y UV-visible y con un mapeo de PCA.	(Moğ et al., 2011)



### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las plantas medicinales, que han constituido la base para procurar la salud en todo el mundo desde tiempos inmemoriales, siguen utilizándose ampliamente y tienen una importancia considerable en el mundo actual. Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en algunas regiones del globo, en los países en vías de desarrollo grandes sectores de la población todavía dependen de los curanderos, plantas medicinales, medicamentos herbolarios y recursos tradicionales para el alivio de sus enfermedades. De tal manera que la OMS estima que 1,500 millones de seres humanos recurren a medicinas y terapias tradicionales para la atención primaria de la salud, estos sin contar a los usuarios de medicamentos obtenidos a partir del procesamiento industrial de las plantas medicinales. El 95% de estas terapias son de origen vegetal. Es más, durante el los últimos años, el interés por las terapias vegetales tradicionales ha aumentado enormemente en los países industrializados, por lo tanto el uso de las plantas medicinales y medicamentos herbolarios se encuentra en plena expansión, reconociéndose el valor clínico de las plantas utilizadas en las prácticas medicas alternativas. Desafortunadamente, en México el porcentaje de especies vegetales medicinales y propóleos estudiados desde el punto de vista farmacológico es relativamente bajo y actualmente se considera que de todas las especies en uso solo se conocen, con criterios de carácter experimental y científico, las propiedades farmacológicas de aproximadamente el 1.5 %. Con base en estos antecedentes, resulta evidente que en la actualidad solo se tiene un conocimiento empírico de la gran mayoría de los productos naturales utilizados en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades, ya que a la fecha no se han hecho estudios sistemáticos tendientes a determinar sus efectos, ni tampoco se han realizado estudios fitoquímicos biodirigidos con miras a la caracterización de sus principios activos. En este contexto surgió la presente propuesta de investigación que tiene como meta principal determinar la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de propóleo. Es importante destacar que los propóleos y geopropóleos mexicanos gozan de reputación folclórica para el tratamiento de

enfermedades relacionadas con el estrés, sin embargo, no existen estudios químicos y farmacológicos previos que permitan validar estos usos. La información generada podrá ser utilizada para clasificar las muestras de propóleo, así como conocer la capacidad antioxidante y antibacteriana de los extractos.

Con base en los antecedentes descritos previamente los objetivos generales del presente proyecto de investigación fueron:

1. Determinar el contenido de fenoles, flavonoides y la capacidad antioxidante de 35 extractos etanólicos de propóleo.
2. Determinar el efecto de los EEPs sobre el crecimiento de bacterias patógenas.

**Objetivos particulares:**

1. Preparar los extractos etanólicos de propóleo
2. Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides totales de los extractos etanólicos.
3. Determinar la capacidad antioxidante de los propóleos utilizando el método de blanqueamiento del radical DPPH.
4. Evaluar el potencial antibacteriano de los extractos etanólicos sobre el crecimiento de bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.
5. Evaluar cada uno de los EEPs utilizando RMN-<sup>1</sup>H (Resonancia Magnética Nuclear).

## **4. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Preparación de los extractos etanólicos**

Las muestras de propóleo (5 g) se extrajeron con etanol y un método de maceración (250 mL) por un periodo de siete días. Posteriormente, el disolvente de los extractos se llevó utilizando un rotaevaporador. Los extractos etanólicos (EEP) se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

### **4.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales**

La determinación de fenoles totales se realizó utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu reportada por Singleton y cols. (1999) con algunas modificaciones. En una placa de 96 pozos, se agregaron 160 µL de H<sub>2</sub>O desionizada, 20 µL de reactivo Folin y 20 µL del extracto (1 mg/mL) y se reposó por 8 minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 10 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y se mantuvo la mezcla de reacción en la oscuridad por 1 hora. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 700 nm.

Se construyó una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración 5 – 100 µg/mL con la finalidad de expresar los resultados en equivalentes de ácido gálico (mg de equivalentes de ácido gálico/g muestra). Cada determinación, tanto del extracto de propóleo como los niveles de concentración de la curva de calibración, se realizó por triplicado y de manera independiente. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones.

### **4.3 Cuantificación de flavonoides totales**

La cuantificación de flavonoides totales se realizó utilizando la técnica descrita por (Marquele et al., 2005). En una placa de 96 pozos se agregaron 100 µL de la muestra y 100 µL de una solución de AlCl<sub>3</sub> al 2%. Se incubó la mezcla por 30 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 420 nm.

Se construyó una curva de calibración de quercetina en un rango de concentración 10 – 60 µg/mL con la finalidad de expresar los resultados en equivalentes de quercetina (mg de equivalentes de quercetina / g muestra).

Cada determinación, tanto del extracto de propóleo como los niveles de concentración de la curva de calibración, se realizó por triplicado y de manera independiente. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones.

#### **4.4 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo del blanqueamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

Se realizó mediante el método descrito por Cheng y cols. (2006). La mezcla de reacción consistió en 0.1 mL de la solución etanólica de DPPH a 0.208 mM y 0.1 mL del extracto de concentración 1 mg/mL o de Trolox (control positivo, 1 mg/mL). La placa con 96 pozos se mantuvo en la oscuridad por 20 minutos y se determinó la absorbancia a 540 nm. El porcentaje de inhibición del DPPH de cada muestra se calculó considerando el porcentaje remanente de DPPH en solución después de transcurrido el tiempo de reacción. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. La ecuación que se utilizó para calcular el % de DPPH neutralizado fue:

$$\%DPPH_{\text{neutralizado}} = 100 - \%DPPH_{\text{remanente}}$$

#### **4.5 Determinación de la capacidad antibacteriana de los extractos sobre bacterias patógenas**

##### **4.5.1 Microorganismos de prueba**

Se utilizaron los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) y *Streptococcus oralis* (ATCC 35037), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa*.

##### **4.5.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Hernández y colaboradores (2012),

utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos. En las microplacas estériles de 96 pozos se adicionaron el medio de cultivo BHI, los compuestos de prueba diluidos en serie y las bacterias a una concentración final de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. Como control positivo se utilizó digluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12 %; como control de esterilidad caldo BHI y como control de disolvente etanol al 25 %. El ensayo se realizó por triplicado y después de incubar a 37 °C por 24 h se estimó espectroscópicamente a 660 nm el crecimiento bacteriano utilizando una lectora de placas. El valor de la CMI fue definido como la concentración mínima del extracto o compuesto de prueba que no permitió el crecimiento de la bacteria a niveles  $<0.05$  a 660 nm después de incubar a 37°C durante 24h.

## **4.6 Análisis de los propóleos por RMN**

### **4.6.1 Preparación de las muestras y equipo de RMN empleado**

Se pesaron 20 mg de cada extracto y se disolvieron en 0.8 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) con 99.9% de deuteración. Se utilizó DMSO- $d_6$  por su alta capacidad disolvente y porque es una molécula aprótica que permite la detección de los protones de los grupos hidroxilo. La disolución se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro. El espectrómetro utilizado fue el Avance III HD 700 MHz equipado con una sonda de detección indirecta de 5-mm z-axial

### **4.7 Procesamiento de los datos**

Se utilizó el software MestReNova y cada espectro de RMN- $^1H$  fue dividido en 0.02 ppm y secciones entre 0.5 ppm y 13.5 ppm. Los espectros procesados se normalizaron al promedio total de la suma de las integrales. Los resultados normalizados formaron parte de una matriz de datos que posteriormente se sometieron a un análisis multivariable.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se analizaron los extractos etanólicos de 35 muestras de propóleos obtenidos de diferentes apiarios mexicanos y así mismo, se analizaron cuatro EEPs obtenidos de otros países (Ecuador y China) con la finalidad de comparar los resultados y observar el efecto existente en la cantidad de compuestos activos presentes en los propóleos de acuerdo a la zona geográfica y la región de donde fueron recolectados. Los resultados de los bioensayos de los extractos etanólicos de propóleo evaluados se reportan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante y capacidad antibacteriana de los EEP de Ciudad de México (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) y China (CHINA) (continuación).

Origen de la muestra	Fecha de recolecta	Método de recolección	Fenoles totales <sup>a</sup>	Flavonoides totales <sup>b</sup>	% DPPH	CMI (µg/mL)				
						<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Ciudad de México</b>										
<b>Tlalpan</b>										
Topilejo 1	Sept-2011	red plástica	112.7	15.7	42.3	128	128	256	>1000	>2000
Topilejo 2	Oct-2011	red plástica	116	24.9	46.1	128	128	256	>1000	>2000
Topilejo 3	Nov-2011	red plástica	106.7	12.6	40.2	32	32	64	>1000	>2000
Topilejo 4	Oct-2011	red plástica	134.1	14.2	52.5	128	128	256	>1000	>2000
Topilejo 5	Oct-2011	red plástica	101.3	13.6	40.8	128	128	256	>1000	>2000
Topilejo 6	Oct-2011	red plástica	106.3	12.1	32.6	128	128	128	>1000	>2000
<b>Xochimilco</b>										
San Luis Tlaxialtemalco 1	Oct-2011	raspado	99.7	22.1	66.8	512	512	512	>1000	>2000
San Luis Tlaxialtemalco 2	Nov-2011	raspado	157.3	15.6	52.9	128	128	256	>1000	>2000
San Luis Tlaxialtemalco 3	Oct-2012	raspado	76.4	14.1	26.6	512	512	1024	>1000	>2000
San Luis Tlaxialtemalco 4	Oct-2013	raspado	175.9	17.1	60.2	64	128	128	>1000	>2000
San Luis Tlaxialtemalco 5	Oct-2013	red plástica	116.4	14.5	54.6	128	128	256	>1000	>2000
San Luis Tlaxialtemalco 6	Nov-2013	red plástica	134.6	13.5	44.6	128	128	256	>1000	>2000

**Cuadro 4.** Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante y capacidad antibacteriana de los EEP de Ciudad de México (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) y China (CHINA) (continuación).

Origen de la muestra	Fecha de recolecta	Método de recolección	Fenoles totales <sup>a</sup>	Flavonoides totales <sup>b</sup>	% DPPH	CMI (µg/mL)				
						<i>S. oralis.</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Milpa Alta</b>										
San Pablo Oztotepec 1	Oct-2011	red plástica	101.3	25.2	59.6	128	128	128	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 2	Oct-2011	raspado	247.3	27.8	84.4	32	32	32	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 3	Nov-2012	red plástica	128.9	12.2	39.6	128	128	256	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 4	Oct-2011	raspado	223.2	34.6	77.5	32	32	64	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 5	Nov-2012	raspado	225.4	32.6	75.6	32	32	64	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 6	Oct-2011	red plástica	135.2	27.5	64	64	64	128	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 7	Oct-2012	raspado	203.8	31.5	81.7	16	16	32	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 8	Oct-2013	red plástica	204.3	16.3	84.8	32	32	64	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 9	Oct-2012	raspado	218.9	22.1	77.5	32	32	32	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 10	Nov-2012	raspado	178.3	16.3	57.5	64	128	128	>1000	>2000
San Pablo Oztotepec 11	Oct-2013	raspado	168.6	16.1	58.8	64	64	128	>1000	>2000
San Antonio Tecomitl 1	Nov-2013	raspado	198.5	23.9	75	32	64	128	>1000	>2000
San Antonio Tecomitl 2	Oct-2011	raspado	215.7	30	51.2	32	64	64	>1000	>2000
San Antonio Tecomitl 3	Oct-2011	red plástica	99.6	10.1	33.8	256	256	512	>1000	>2000



**Cuadro 4.** Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante y capacidad antibacteriana de los EEP de Ciudad de México (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) y China (CHINA) (continuación).

Origen de la muestra	Fecha de recolecta	Método de recolección	Fenoles totales <sup>a</sup>	Flavonoides totales <sup>b</sup>	% DPPH	CMI (µg/mL)				
						<i>S. oralis.</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Milpa Alta</b>										
San Antonio Tecomitl 4	Oct-2013	red plástica	105.3	13.1	43.6	64	64	128	>1000	>2000
San Antonio Tecomitl 5	Oct-2012	red plástica	89.8	10.5	36.5	256	256	512	>1000	>2000
<b>Puebla (PUE)</b>										
Valsequillo 1	Oct-2011	alza de madera	205.6	48.7	80.9	16	32	32	>1000	>2000
Valsequillo 2	Oct-2012	raspado	287.2	56.7	86	16	16	16	>1000	>2000
Cuetzalan	Oct-2011	raspado	24.7	2.3	28.7	1024	1024	2048	>1000	>2000
<b>Oaxaca (OAX)</b>										
Pinotepa Nacional 1	Oct-2011	raspado	38.5	2.1	7.1	2048	2048	2048	>1000	>2000
Pinotepa Nacional 2	Oct-2012	raspado	12	1.3	0	2048	2048	2048	>1000	>2000
<b>Guanajuato (GUAN)</b>										
Silao	Oct-2012	red plástica	87.3	14.2	52.4	256	256	512	>1000	>2000
<b>Tlaxcala (TLAX)</b>										
Tlaxcala	Oct-2011	raspado	23.5	3.1	12.1	512	512	1024	>1000	>2000

**Cuadro 4.** Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante y capacidad antibacteriana de los EEP de Ciudad de México (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) y China (CHINA) (continuación).

Origen de la muestra	Fecha de recolecta	Método de recolección	Fenoles totales <sup>a</sup>	Flavonoides totales <sup>b</sup>	% DPPH	CMI (µg/mL)				
						<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>América del Sur (ECUA)</b>										
Quito/ Ecuador	2011	ND	198.3	20.1	16.3	64	128	128	>1000	>2000
<b>China (CHINA)</b>										
China 1*	2013	ND	221.7	28.3	83.7	64	64	64	>1000	>2000
China 2*	2013	ND	215.6	29.1	7.1	64	64	64	>1000	>2000
China 3*	2012	ND	189.9	27.8	67.8	64	64	128	>1000	>2000
<b>Control Positivo +</b>						0.12	0.12	0.24		

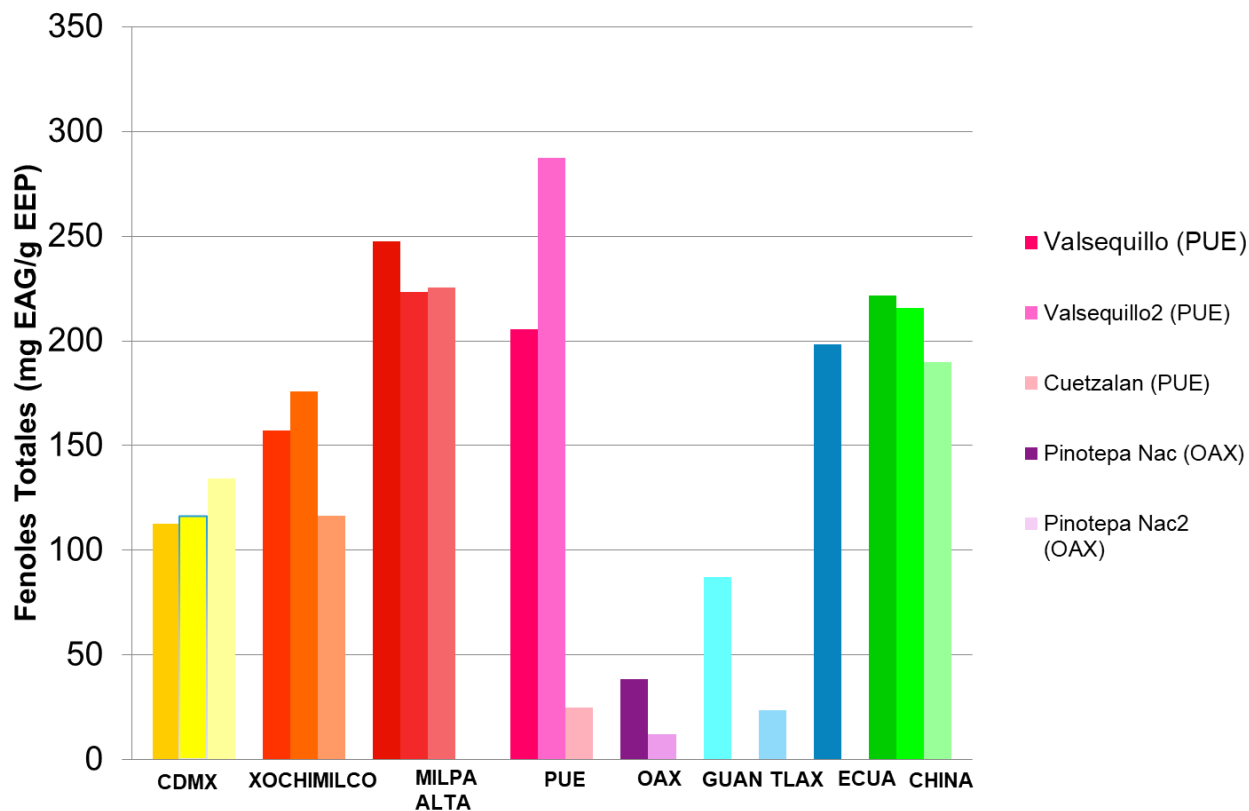
<sup>a</sup> Expresado en mg EAG/ g de EEP; <sup>b</sup> Expresado en mg EQ/g de EEP; Capacidad de atrapamiento del radical DPPH (porcentaje);

\* Comprado en un mercado local de la Ciudad de México; + CHX; ND: no determinado.

## 5.1 Contenido de fenoles y flavonoides totales

Para la cuantificación de fenoles totales de cada muestra se construyó una curva de calibración de ácido gálico ( $y = 4.10x + 0.0324$ ,  $R^2 = 0.9980$ ) en la que se interpolaron las absorbancias registradas de los extractos de propóleo con la finalidad de expresar los resultados en mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto de propóleo. En la Figura 3 se resume el contenido de fenoles totales de las muestras de propóleos mexicanos determinados por el método de Folin-Ciocalteu; así mismo incluye la cantidad de fenoles totales presentes en muestras de propóleo de Ecuador y China. Estos EEPs se utilizaron con la finalidad de comparar el contenido de fenoles en los propóleos provenientes de regiones no tropicales de Asia y que demostraron actividad biológica, además de que pertenecen al mismo tipo de propóleo y zona geográfica en donde se encuentra México. Otras zonas geográficas que pertenecen a los propóleos denominados como “álamo” son Sudamérica y Asia.

En la Figura 3 se observa que la mayoría de los EEPs analizados presentaron concentraciones de compuestos fenólicos altos destacando al extracto proveniente de Valsequillo (Puebla) con una cantidad de 287.2 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto de propóleo, que incluso, llega a superar en cantidad a las muestras de China y Ecuador. Los propóleos recolectados en Milpa Alta también obtuvieron valores altos en el contenido de fenoles ya que estos se encontraron en un rango de 223.2 mg a 247.3 mg de equivalentes de ácido gálico/g de EEP. Otras muestras, como las recolectadas en los estados de Oaxaca (Pinotepa Nacional) y Tlaxcala fueron las que resultaron con la menor cantidad de fenoles totales con 12 mg y 23.5 mg de equivalentes de ácido gálico/g de EEP, respectivamente.



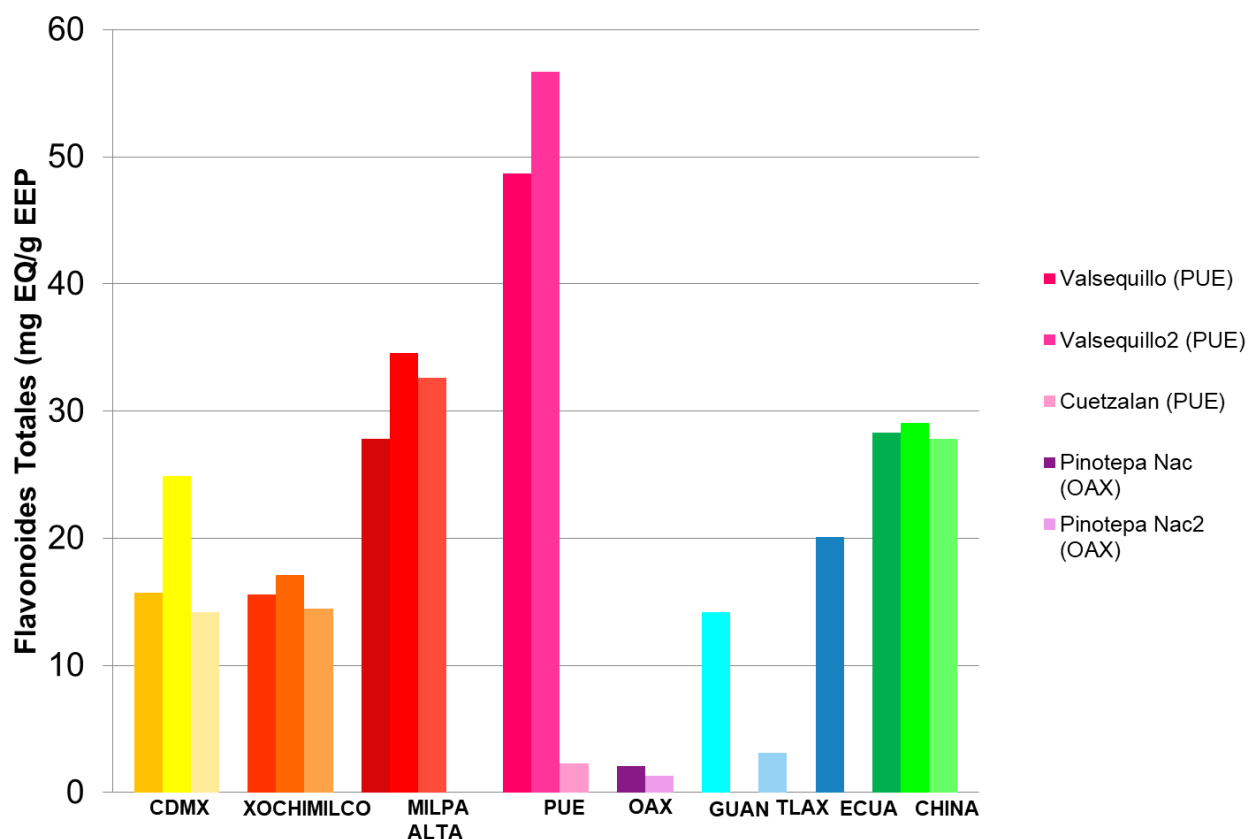
**Figura 3.** Contenido de fenoles totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto de propóleo.

El contenido de fenoles totales que debe contener un propóleo para ser considerado de buena calidad de acuerdo a la recientemente aprobada Norma Mexicana del Propóleo (NOM-003-SAG/GAN-2017) es de no menos de 50 mg EAG/g EEP. De acuerdo con lo antes mencionado, los únicos extractos mexicanos que no se aproximan al criterio mínimo de calidad de la NOM-003-SAG/GAN-2017 son los provenientes de las regiones de Cuetzalan (Puebla), Pinotepa Nacional (Oaxaca) y Tlaxcala.

Los compuestos fenólicos se encuentran extensivamente en el reino vegetal ejercen una acción protectora contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidante ya que naturalmente, dichas moléculas reaccionan con los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno donando un átomo de hidrógeno para lograr obtener un radical libre estable.

Por otra parte, Valencia y cols. (2012) afirman que la presencia de compuestos fenólicos contribuye significativamente en la actividad antioxidante de un extracto de propóleo recolectado en Sonora y que existe una correlación entre el contenido de fenoles totales con la capacidad antioxidante de la resina.

El contenido de flavonoides totales, es otro determinante de gran importancia para medir el potencial antioxidante de las muestras de propóleo. Para la cuantificación de los flavonoides presentes en los extractos etanólicos, se construyó una curva de calibración con quercetina ( $y= 16.33x + 0.1032$ ,  $R^2= 0.9993$ ) en la cual se interpolaron cada una de las absorbancias registradas de las muestras con la finalidad de expresar los resultados en mg de equivalentes de quercetina/g de extracto de propóleo.



**Figura 4.** Contenido de flavonoides totales expresados en mg de equivalentes de quercetina/g de extracto de propóleo.

En la Figura 4 puede apreciarse que los extractos de Valsequillo (Puebla) tuvieron un contenido en flavonoides totales de 56.7 mg de equivalentes de quercetina/g de EEP y 48.7 mg de equivalentes de quercetina / g de EEP. Esta tendencia es similar a la observada para los fenoles totales para estas mismas muestras. Así mismo superaron la cantidad de flavonoides presentes en muestras de China y Ecuador. De igual manera, los propóleos de Pinotepa Nacional (Oaxaca) obtuvieron la menor cantidad de flavonoides con 2.1 y 1.3 mg de equivalentes de quercetina/g de EEP. En cuanto a la cantidad de flavonoides establecida por la Norma Mexicana de propóleo, el contenido mínimo de flavonoides totales debe ser no menos de 5 mg de equivalentes de quercetina/g de EEP. Las muestras de Cuetzalan (Puebla), Pinotepa Nacional (Oaxaca) y Tlaxcala tuvieron un contenido de fenoles y flavonoides totales por debajo de lo establecido en la Norma Mexicana de Propóleo.

Actualmente, existe un gran interés en los flavonoides debido a que se les han descrito numerosas actividades farmacológicas. También se ha reportado, su capacidad para depurar a los radicales libres y específicamente se ha encontrado que moléculas como la quercetina y la galangina son los flavonoides que poseen la mejor capacidad antioxidante.

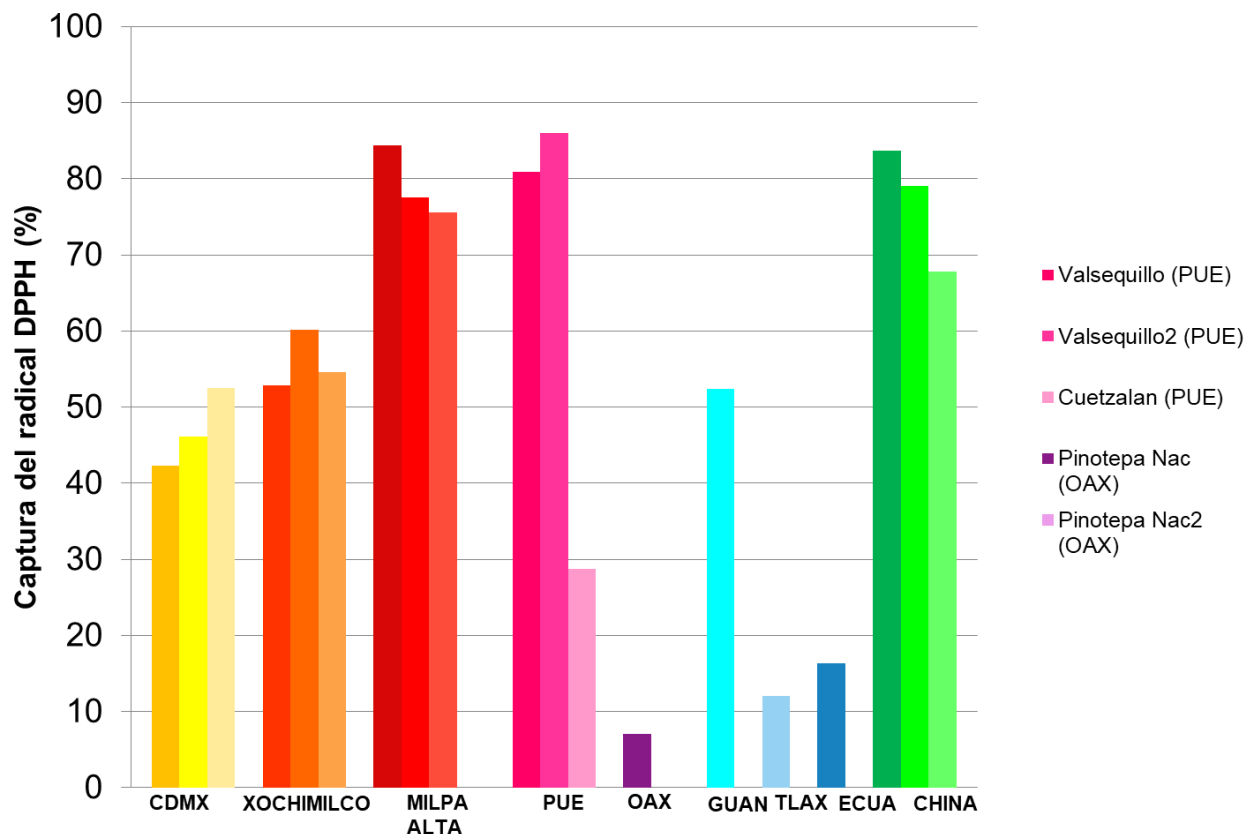
Los resultados encontrados en este proyecto indican que los extractos con mayor contenido de fenoles presentaron también un mayor contenido en flavonoides totales. Las concentraciones de estos compuestos fenólicos variaron considerablemente entre las muestras. Por ejemplo, los EEPs de Oaxaca tuvieron menor cantidad de fenoles y flavonoides que los EEPs de Puebla. La diferencia en la composición química encontrada en los propóleos estudiados se puede explicar por la diferencia existente en los orígenes genéticos de las abejas, su grado de africanización y su habilidad para recolectar resinas de las plantas. Los resultados descritos previamente son congruentes con lo descrito por Naugraheni y colaboradores (2016) quienes afirman que la variación en la composición del propóleo se debe principalmente a las plantas de dónde las abejas obtienen las resinas, así como de la flora circundante a la colmena.

## 5.2 Evaluación de la actividad antioxidante

La oxidación es un proceso complicado que implica la participación de diversos mecanismos. Por ello, no existe un solo método que permita la correcta evaluación de la capacidad antioxidante total de un compuesto. El método debe ser elegido en consideración a lo que quiere ser evaluado (Yang et al., 2011); por lo que para este trabajo se optó por elegir el ensayo de neutralización del radical DPPH. La actividad antioxidante o la capacidad de atrapamiento del radical libre DPPH se obtiene a partir del porcentaje de decoloración basado en métodos espectrofotométricos. La habilidad de neutralización del DPPH se calcula como el porcentaje de atrapamiento de DPPH o bien como el porcentaje de decoloración. Dicho ensayo mide el potencial de donar un radical H de una muestra y se define como la concentración (del antioxidante o compuesto de prueba) que se requiere para reducir la cantidad de DPPH en un 50% de su concentración original (Roginsky et al., 2005; Habsah et al., 2010).

La sustancia de referencia que se utilizó para comparar y cuantificar la capacidad antioxidante de los EEPs fue el ácido (+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (Trolox®).

En la Figura 5, se observa que la capacidad de atrapamiento del radical DPPH por los extractos fue muy diferente. Los extractos analizados que tuvieron los resultados más promisorios fueron los recolectados en Valsequillo (Puebla) con porcentajes de atrapamiento del radical DPPH de 80.9 % y 86.0 %, y Milpa Alta con valores que oscilaron entre 75.6 % a 84.4 %. El contenido de antioxidantes es mayor al encontrado en las muestras de China y Ecuador.



**Figura 5.** Capacidad antioxidante de los extractos de propóleo estudiados.

Analizando globalmente los resultados del ensayo de actividad antioxidante en conjunto con el contenido de fenoles y flavonoides totales, puede deducirse que aquellos extractos etanólicos de propóleo con mayor contenido de compuestos fenólicos mostraron la mejor actividad antioxidante. Esta tendencia puede confirmarse con un estudio reportado por Machado y colaboradores (2016) donde se afirma que al analizar los ensayos efectuados de la actividad antioxidante en sus muestras, la fracción estudiada que resultó con mayor actividad fue aquella que presentó la mayor cantidad flavonoides. Por otra parte, Veiga y colaboradores (2017), reportan el potencial del propóleo Chino y el propóleo de América del Sur como los productos más efectivos por su elevada cantidad de polifenoles, compuestos considerados como los principales componentes bio-activos del propóleo.



Por otra parte, Kumazawa y colaboradores (2004) también evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* propóleos proveniente de varias regiones del mundo utilizando la técnica de atrapamiento del radical DPPH. Los autores encontraron que los propóleos de Argentina y China, ejercieron una potente actividad antioxidante como consecuencia del contenido total de polifenoles y flavonoides presentes en las muestras.

Tomando en consideración los resultados obtenidos, podría valorarse la posibilidad de incorporar los extractos pertenecientes a la región de Valsequillo (Puebla) y Milpa Alta como componentes bioactivos de preparaciones terapéuticas, ya que a partir de lo demostrado anteriormente, puede comprobarse su efectiva acción ante la presencia de radicales libres, hecho que podría aprovecharse para evitar y prevenir enfermedades relacionadas con el daño celular ocasionado por el estrés oxidante.

### **5.3 Determinación de la capacidad antibacteriana del propóleo sobre bacterias patógenas**

Se evaluó el efecto de los extractos etanólicos de propóleo sobre el crecimiento de bacterias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Pseudomona aeruginosa*). Los resultados de la actividad de los EEP sobre el crecimiento de las bacterias se reportan en concentración mínima inhibitoria (CMI) en  $\mu\text{g/mL}$  y se detallan en el Cuadro 4. La actividad de los extractos sobre el crecimiento de las bacterias utilizadas tuvo un rango de actividad pobre (CMIs 1000-2000  $\mu\text{g/mL}$ ), baja actividad (CMIs 250-1000  $\mu\text{g/mL}$ ), moderada actividad (CMIs 64-125  $\mu\text{g/mL}$ ) y excelente actividad (CMIs 16-32  $\mu\text{g/mL}$ ). De acuerdo con Ríos et al., 2005, un extracto etanólico de propóleo puede considerarse potencialmente activo si su actividad (CMI) se encuentra por debajo de los 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Los extractos que mostraron mayor potencial para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, y *Streptococcus oralis*) fueron los EEPs de Valsequillo (Puebla) con valores de CMIs de 16  $\mu\text{g/mL}$ . Los propóleos de Milpa Alta también fueron activos contra estas

mismas bacterias con CMI de 32 µg/mL mientras que el propóleo de Pinotepa Nacional (Oaxaca), Cuetzalan (Puebla) y Tlaxcala no ejercieron actividad antimicrobiana; ya que resultaron CMI con valores entre los 1000 y 2000 µg/mL. Es interesante mencionar que ninguno de los EEPs probados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a pesar de que, por ejemplo, los propóleos de Valsequillo, Puebla hayan tenido actividad sobre las bacterias del grupo viridans. A partir de los estudios realizados puede corroborarse que los propóleos mexicanos presentan mejor capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram-positivas y que podrían considerarse inactivos frente a bacterias Gram-negativas ya que no lograron inhibir su crecimiento. Silva y cols. (2012) describen la pobre actividad de los propóleos mexicanos frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* con CMI reportadas de 590 a 1720 µg/mL y 1560 a 2810 µg/mL, respectivamente. Así mismo, los resultados obtenidos concuerdan con diversos estudios publicados en los que se prueba la potente actividad antimicrobiana de los propóleos frente a bacterias Gram-positivas y su deficiente capacidad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas (Tivieron et al., 2016). También los grupos de investigación de Mavri (2012) y Siripatrawan (2013) demostraron mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas en comparación a las Gram-negativas. Seidel y cols. (2008) comparan la actividad antimicrobiana de EEP tropicales, subtropicales y de zonas templadas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y encontraron que existe mayor efectividad de los propóleos en estas zonas frente a bacterias Gram-positivas.

Por el contrario, en otras regiones se ha encontrado gran potencial en el propóleo para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas. Esto es el caso de EEPs provenientes de Brasil y Bolivia; según Lopez y cols. (2015) encontraron que los propóleos de esa región resultan ser mucho más activos contra bacterias Gram-negativas con valores de CMI que van entre 25 a 500 µg/mL. A pesar de ello, estas evidencias no pueden ser comparadas con los resultados obtenidos en este trabajo ya que los propóleos de Brasil y Bolivia no se encuentran en la misma zona templada en la que se agrupan los propóleos de México.

La eficacia de los propóleos de provocar daño a sólo un cierto grupo de bacterias puede deberse a las diferencias en la composición química de las paredes celulares de cada grupo de bacterias. La pared celular en las Gram-negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared de las Gram-positivas está formada solamente por una única estructura. Esta diferencia contribuye significativamente en la susceptibilidad de este grupo de bacterias a la acción de los principios activos del propóleo. Varios autores han estudiado la relación entre la composición química del propóleo y sus propiedades biológicas. Así como sucede con los estudios relacionados con la capacidad antioxidante, se ha reportado que la actividad antimicrobiana depende de la presencia de ciertas moléculas específicas en el propóleo tal flavonoides, ácidos fenólicos y otros. (Stephanovic et al., 2003) relacionan la actividad inhibitoria de los EEPs frente a diversas cepas bacterianas con la presencia de flavonoides en los extractos como la galangina, pinocembrina, quercetina y el éster fenilético del ácido caféico (CAPE).

El mecanismo de acción por el cual actúan eficientemente dichos compuestos del propóleo se ha estudiado desde años atrás. Speciale y cols. (2006) afirman que compuestos presentes en los EEPs como la quercetina, la galangina, la pinocembrina, el ácido caféico, el ácido benzoico, y el ácido cinámico, probablemente ejercen su acción a nivel de membrana celular, provocando daño funcional como estructural y generando la muerte del microorganismo. Yoshimi y cols. (2007) concuerdan con lo mencionado anteriormente por Gatto et al., 2002 ya que mencionan en su publicación que la actividad antibacteriana de los propóleos se asocia a la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, compuestos aromáticos y ésteres y aporta la idea de que también podría deberse por un efecto sinérgico entre todos estos compuestos.

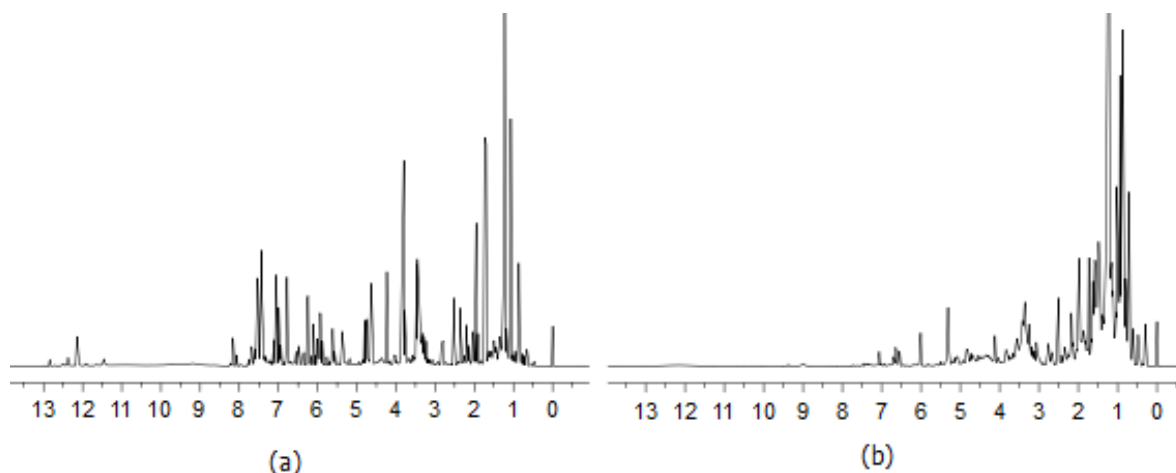
Muy pocas investigaciones se han llevado a cabo para comprobar específicamente el mecanismo y el efecto inhibitorio de los propóleos contra las bacterias. Bryan y cols. (2016) demuestran por medio de imágenes realizadas por microscopía electrónica el daño generado por los EEPs en distintas cepas. A través de dichas imágenes se comprueba que el mecanismo de acción de este

producto se asocia más a un daño funcional que estructural y que efectivamente la acción antibacteriana se atribuye por un efecto sinérgico entre los diversos compuestos activos presentes en los propóleos. Ellos observaron que una vez que la bacteria se encuentra en contacto con los EEPs, los componentes activos se unen específicamente a la membrana celular provocándole daño, resultando en la catastrófica lisis celular y eventualmente en la muerte de la bacteria.

#### 5.4 Análisis de los propóleos por RMN $^1\text{H}$

La resonancia magnética nuclear representa un método simple mediante el cual se puede obtener información global de diversas muestras complejas. En cuanto al análisis de los propóleos por esta técnica pueden detectarse ceras, terpenos y compuestos fenólicos simultáneamente, así como obtener las “huellas dactilares” de los extractos.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se registraron para cada muestra y, a manera de ejemplo, se seleccionaron dos espectros que se muestran en la Figura 6. Mientras el espectro de la Figura 6(a) corresponde a un extracto etanólico con buena actividad sobre el crecimiento bacteriano y antioxidante, el de la Figura 6(b) es el que se obtuvo para un extracto con una bajas actividades antioxidantes y antibacterianas; el contenido de fenoles y flavonoides totales también fue bajo.



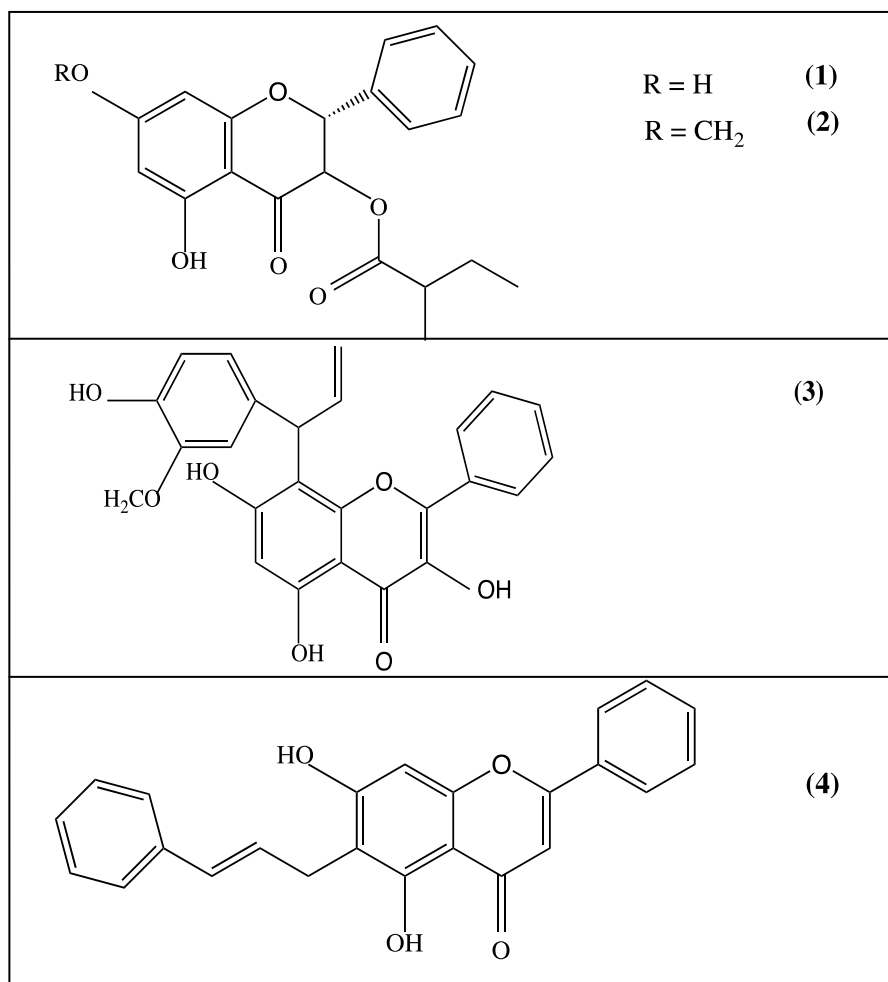
**Figura 6.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 700-MHz de 40 mg de propóleo disueltos en 0.6 mL de  $\text{DMSO}-d_6$  conteniendo TMS como referencia. (a) extracto de Puebla, Valsequillo 1 y (b) extracto de Puebla, Cuetzalan (Rivero et al., 2017).

En el espectro de la Figura 6(a) se puede observar claramente la presencia de señales simples en  $\delta$  12.0 ppm que pueden atribuirse a un enlace de hidrógeno intramolecular entre los grupos  $-\text{OH}$  que se encuentran frecuentemente presentes en el anillo A de los flavonoides y el  $=\text{O}$  de cetona del anillo C de la molécula. Los protones aromáticos de estos fenoles se observan en desplazamientos químicos entre 6.0 y 8.0 ppm. Por otra parte, las señales con desplazamientos 6.0 y 5.0 ppm pueden asignarse a los protones vinílicos del anillo C de las flavonas presentes en el extracto. Los protones del sistema ABX del anillo C de las flavanonas se encuentran en desplazamientos químicos de 5.0 a 2.5 ppm. El singulete con un desplazamiento químico cercano a 4.0 ppm puede ser atribuido a un metilo de los metoxilos aromáticos frecuentemente observados en los flavonoides. En el espectro de la Figura 6(b) se observa que la mayor parte de las señales se encuentran en el rango de desplazamientos químicos de 2.0 a 0.5 ppm. Estas señales pueden ser asignables a los protones de ceras y ácidos grasos lineales cuyas contribuciones a las propiedades antibacterianas y antioxidantes pueden ser consideradas menos relevantes. Estos resultados son consistentes con los descritos por Kasote y cols. (2017). Obtuvieron espectros de RMN  $^1\text{H}$  de diversos extractos de propóleos en regiones de la India y observaron en los espectros la existencia de señales en la región 3.5 a 6.0 y 5.5 a 8.0 ppm correspondientes a azúcares y fenoles, respectivamente. Adicionalmente visualizaron la presencia de terpenos y esteroides por picos resultantes en los desplazamientos químicos de 0.5 a 3.0 ppm.

En 2012 Bertelli y cols. reportaron regiones espectrales de propóleos europeos por picos encontrados en las regiones de 4.50 a 8.25 ppm relacionados principalmente a compuestos aromáticos. De igual manera, señales en desplazamientos químicos entre 8.24 a 13.0 ppm asociados a protones presentes en grupos carbonilos y carboxílicos.

Se ha encontrado que los constituyentes predominantes en propóleos de zonas templadas son los flavonoides sin sustituyentes en su anillo B tales como la pinocembrina, pinobanksina, la galangina y la crisina. En la Figura 7 se presentan las estructuras de los principales flavonoides presentes en propóleos de origen

templado. Compuestos como 3-(2-metil)butirato de pinobanksina (1), 3-isobutirato de pinobanksina de propóleos en Uruguay, el 3-O-prenil-7-metil-pinobanksina, 8-C-2-fenil-alilo y la galangina (3) de propóleos mexicanos, el éster feniletílico del ácido caféico (CAPE) de propóleos europeos, el 3-O-[(S)-2-metil-butirol] de pinobanksina (2) y el 6-cinamil-crisina (4) de propóleos chinos son algunos ejemplos de flavonoides sin sustitución en el anillo B característicos de los propóleos templados de las especies *Populus* (Salatino et al., 2011).



**Figura 7.** Principales flavonoides presentes en propóleos de zonas templadas (tomado de Salatino et al., 2011).

## 5.5 Análisis de los propóleos por PCA

A través de la técnica por análisis de componentes principales (PCA) es posible analizar las diferencias o similitudes existentes en los propóleos de acuerdo a su composición química. Los datos espectrales obtenidos se sometieron a un análisis multivariable con la finalidad de estudiar las variaciones entre el espectro modelo, correlacionar la intensidad relativa y la posición de las señales en el espectro de RMN para tener actividad antioxidante determinada por DPPH, flavonoides y fenoles totales y la actividad antibacteriana.

Mediante el análisis de PCA es posible enfatizar la variación y mostrar los patrones más fuertes de asociación de los datos. Se utiliza frecuentemente para explorar y visualizar con mayor facilidad los datos arrojados después de someter alguna muestra a un método espectroscópico como la RMN  $^1\text{H}$ .

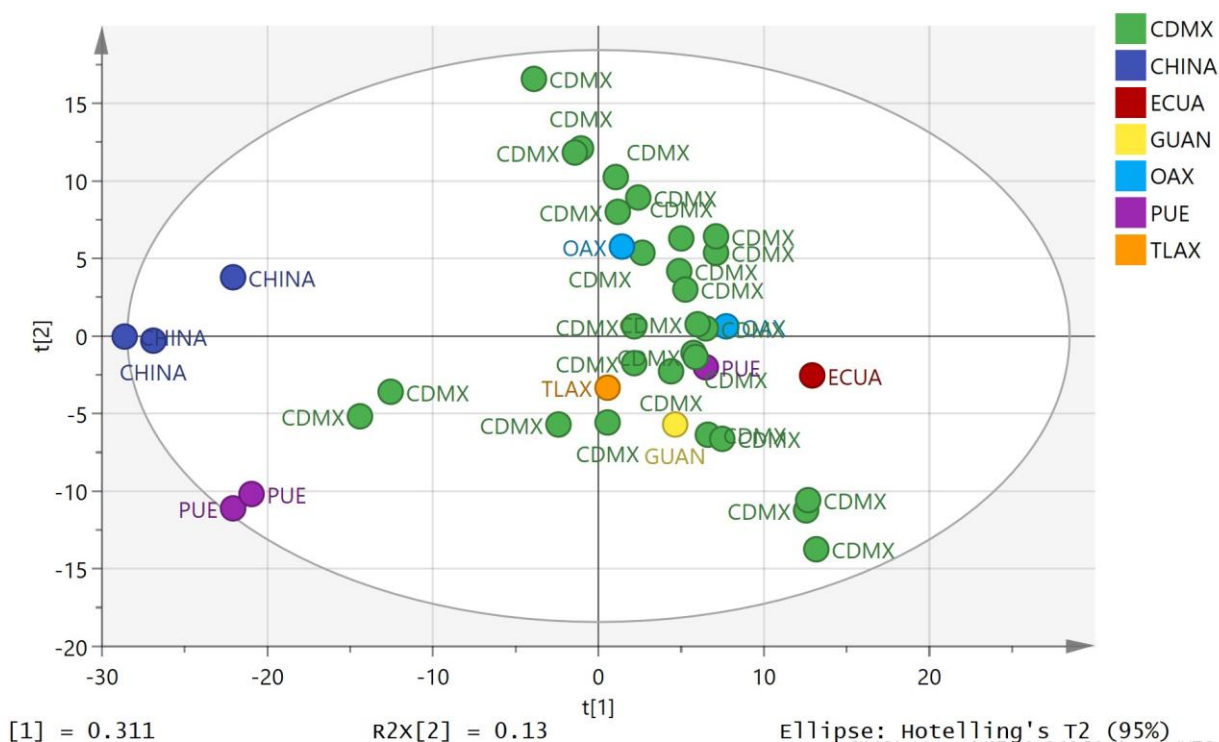
Se examina la estructura básica de las variables y se define un nuevo sistema de coordenadas. Las variables originales son combinadas linealmente en una nueva, llamada componente principal, y en esta misma forma la dimensionalidad (como por ejemplo) la complejidad de los datos es reducida.

El análisis de PCA de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  del propóleo mostraron que con seis componentes un 73.3% de las variaciones espectrales fueron explicadas ( $R^2X(\text{cum})$ ). Esta es una medida de la cantidad de información contenida dentro del modelo que permite explicar la dispersión observada cuando se comparan espectros de diferentes muestras. El porcentaje de variación predicho por este modelo de acuerdo con la evaluación cruzada alcanzó el 48.7% ( $Q^2X(\text{cum})$ ). La validación cruzada es utilizada para estimar que tan correcto es el modelo de predicción en la práctica. En la Figura 8 se observa que aunque algunas muestras se encontraron muy cercanas a los límites del elipse del 95 % del intervalo de confianza para la prueba  $T^2$  de Hotelling, no se presentaron realmente valores atípicos en los datos. También se observó que algunas muestras tienen una distancia de los valores del modelo (DModX) ligeramente por encima del valor crítico; sin embargo, se decidió incluirlos en tratamientos adicionales.

DModX es la distancia de una observación en el grupo de datos con la de los datos del modelo, la cual es proporcional a la desviación estándar residual (RSD)

de la observación X. Curiosamente estos valores corresponden a valores que son de lugares fuera de la Ciudad de México (Puebla) e incluso de fuera del país (China).

Un vistazo rápido de la distribución de las muestras de acuerdo con las similitudes espectrales indicaron una clara tendencia de las muestras a agruparse de acuerdo a su cercanía del apiario o apiarios a los que pertenecían.



**Figura 8.** Gráfica de  $t_2$  vs.  $t_1$  del análisis de PCA de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de propóleos etiquetados de acuerdo a su origen Ciudad de México (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) y China (CHINA) (tomado de Rivero et al., 2017).



## 6. CONCLUSIONES

Se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales de muestras de propóleos recolectadas en diversos estados de la República Mexicana, así como de extractos de China y Ecuador, encontrándose que los valores más altos se presentan en propóleos recolectados en la zona de Valsequillo, Puebla con un contenido de fenoles totales igual a 287.2 mg EAG/ g EEP y de flavonoides totales de 56.7 mg EQ/ g EEP. Dichos extractos resultaron mucho más activos que incluso aquellos provenientes de China y Ecuador. La mayoría de los extractos estudiados cumplieron con el criterio mínimo de calidad en cuanto al contenido de fenoles y flavonoides totales descrito por la norma NOM-003-SAG/GAN-2017 exceptuando a las muestras de Cuetzalan (Puebla), Pinotepa Nacional (Oaxaca) y Tlaxcala.

Los extractos presentaron en general buena capacidad antioxidante *in vitro*, siendo nuevamente los propóleos de Valsequillo, Puebla los de mayor actividad. Dicha actividad pudo corroborar que la capacidad antioxidante de los propóleos se relaciona proporcionalmente con el contenido de fenoles y flavonoides presentes en los extractos.

Así mismo, los propóleos de Valsequillo, Puebla tuvieron mayor capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, y *Streptococcus oralis*) con CMI de 16 µg/mL; mientras que los extractos de Pinotepa Nacional (Oaxaca), Cuetzalan (Puebla) y Tlaxcala no inhibieron el crecimiento bacteriano y sus CMI estuvieron en un rango de 1000 hasta 2000 µg/mL. Ninguno de los EEPs probados inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ni de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) por lo que podría considerarse que los propóleos mexicanos, chinos y ecuatorianos son inactivos frente a este grupo de bacterias.

Finalmente, el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante *in vitro*, y antibacteriana se relacionaron cuantitativamente mediante la técnica de RMN-<sup>1</sup>H. Se efectuó un análisis preliminar por PCA para caracterizar las muestras e identificar posibles valores atípicos. Los resultados indicaron una tendencia por las muestras a agruparse o aproximarse en caso de pertenecer al mismo sitio de recolección.

## **7. PERSPECTIVAS**

Determinar la capacidad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas de los propóleos que resultaron ser más efectivos a concentraciones mayores a las utilizadas en este trabajo.

Fracccionar los extractos de propóleo mayormente activos para obtener los compuestos minoritarios y continuar con su estudio químico.

.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Esmaeeli, H., (2017). Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/polylactic acid composites coated with ethanolic extract of propolis. *Polym. Compos.* **38**, pp. 13-19.

Andrich G, Fiorentini R, Consiglieri A., (1987). Characteristics of some examples of propolis from the Ligurian coast. *Cittá Api.* **28**, pp. 30-31, 34-35, 37-38.

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B.J., da Silva Cunha, I.B., Eberlin, M.N., I Falcao, S., Isla, M.I., Moreno, M.I.N., Papotti, G., (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apiculture Research.* pp. 1-49.

Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, G.L., Plessi, M., (2012). <sup>1</sup>H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochem. Anal.* **23**, pp. 260-266.

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

Brereton, T.G., (2002). Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley&Sons.

Bryan, J., Redden, P., Traba, C., (2016). The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **62**, pp. 192-198.

Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., (2017). The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. *Nat. Prod. Res.* **31**, pp. 1318-1324.

Burdock, G.A., (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.* **36**, pp. 347-363.

Charlton, A. J., Farrington, W. H. H., & Brereton, P. (2002). Application of <sup>1</sup>H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: Quality control and authenticity of instant coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, pp. 3098-3103.

Cheng, H., Qin, Z.H., Guo, X.F., Hu, X.S., Wu, J.H., (2013). Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, **51**, pp. 813-822.

Cheng, Z., Moore, J., Yu, L., (2006). High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging capacity Assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**, pp. 7429-7436.

Eralp, A.A., Akca, G., Topcu, F.T., Macit, E., Pikdoken, L., Ozgen, I.S., (2016). The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: an *in vitro* study. *BioMed Res Int.*, 3627463/3627461-3627463/3627468.

Farré, R., Frassetto, I., Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, **1**, pp. 21-43.

Forseth, R., & Schroeder, F. C. (2011). NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. *Current Opinion in Chemical Biology*, **15**, pp. 38-47.

Gatto, M.T., Falcocchio, S., Grippa, E., Mazzanti, G., Batinnelli, L., Nicolosi, G., Lambusta, D., Saso, L., (2002). Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C163-O-acyl-esters. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, pp. 269-272.

Ghisalberti, E.L. (1979) Propolis: a review, *Bee World*, **60**, pp. 59-84.

Habsah, M., Amran M., Mackeen, N.M., Lajis, N.H., Kikuzaki, H., Nakatani, N., Rahman, A.A., Ali, A.M., (2010). Screening of extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *J Ethnopharm.* **72**, pp. 403-410.

Hernandez, J., Goycoolea, F., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Moreno, L., Velasquez, E., Astiazaran, H., Lugo, E., Velasquez, C.,

(2012). Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cáncer cell lines, *Planta Medica*, **73**, pp. 1469-1474.

Kasote, D.M., Pawar, M.V., Bhatia, R.S., Nandre, V.S., Gundu, S.S., Jagtap. S.D., Kulkarni, M.V., (2017). HPLC, NMR based chemical profiling and biological characterisation of Indian propolis. *Fitoterapia*, **122**, pp. 52-60.

Kumazawa, S., Yoneda, M., Nakayama, T., (2004). Constituents in Brazilian propolis and its plant of origin. *Foods Food Ingredients J.Jpn.* **209**, pp. 132-140.

Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W., (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM2013, 964149.

Kwon, Y.-K., Bong, Y.-S., Lee, K.-S., G.-S., (2014). An integrated analysis for determining the geographical origin of medicinal herbs using ICP-AES/ICP-MS and <sup>1</sup>H NMR analysis. *Food Chemistry*, **161**, pp. 168-175.

Lei, Y., Zhuang, H.-l., Bi, Y.-f., Dai, Y., (2012). Study on two HPLC analysis methods for propolis. *Yunnan Minzu Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, **21**, pp. 13-17.

Lopez, B.G., Schmdt, E.M., Eberlin, M.N., Sawaya, A.C., (2014). Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, **146**, pp. 174-180.

Machado BAS., Barreto, GA., Costa, AS., Costa, SS., Silva, RPD., Silva, DF., (2016). Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from Green propolis using carbón dioxide and etanol as co-solvent. *PLoS ONE*. **10(8)**.

Marquele, F.D., Di Mambro, V.M., Georgetti, S.R., Casagrande, R., Valim, Y.M.L., Fonseca, M.J.V., (2005). Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, pp. 455-462.

Martens, H., Naes, T., (1989). *Multivariate Calibration*. Wiley, Chicester.

**Mavri, A., Abramovic, H., Polak, T., Bertoncelej, J., Jamnik, p., Smole Mozina, S., Jersek, B., (2012).** Chemical Properties and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Slovenian Propolis. *Chem. Biodiversity*, **9**, pp. 1545-1558.

**Moreno, M.I., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., (2000).** Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacology*, **71**, pp. 109-114.

**Moț, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R., Sarbu, C., (2011).** Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**, pp. 516-522.

**Nam, S.-H., Choi, Y.-R., Jang, S.-O., Shim, Y.-S., Han, G.-S., (2016).** Antimicrobial activity of propolis on different oral bacteria. *Indian J. Sci. Technol.* **9**, 89174/89171-89174/89174.

**Nina, N., Lima, B., Feresin, G.E., Gimenez, A., Salamanca Capusiri, E., Schmed-Hirschmann, G., (2016).** Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. *Lett. Appl. Microbiol.* **62**, pp. 290-296.

**Norma mexicana para el propóleo (NOM-003-SAG/GAN-2017).**

**Nugraheni, Z.V., Zetra, Y., Trianita, A.M., Syahputra, M.Y., Firmany, A.R., (2016).** Antioxidant activity in natural beehive's (*Apis mellifera*) bioactive compound from Malang, Indonesia. *AIP Conf. Pro.* 1729, 020053/020051-020053/020054.

**Papotti, G., Bertelli, D., Plessi, M., Rossi, M.C., (2010).** Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. *Int. J. Food Sci. Technol.* **45**, pp. 1610-1618.

**Ríos, JL., Recio, MC., (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **100**, pp. 80-84.

**Rivera, Y.N., Rodríguez, C.M., Nieto, Y.O., Jimenez, E.M., Ibarra, B.M., Canales, M.M., Rodríguez, M.M., (2018).** Hypoglycaemic and antioxidant effects of propolis

of Chihuahua in a model of experimental diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. **2018**, 10 Pp.

Rivero Cruz, J., Rodríguez de San Miguel E., Robles Obregón S., Hernández Espino C., Rivero Cruz B., Pedraza Chaverri J., Esturau Escofet N. (2017) Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis. *Molecules*, **22**, pp. 1184.

Roginsky V, Lissi EA., (2005). Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* **92 (2)**, pp. 235-254.

Saeed, F., Ahmad, R.S., Arshad, M.U., Niaz, B., Batool, R., Naz, R., Ansar Rasul Suleria, H., (2016). Propolis to Curb Lifestyle Related Disorders: An overview. *Int. J. Food Prop.* **19**, pp. 420-437.

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

SAGARPA (2010) Situación actual y perspectiva de la apicultura en México, *Claridades Agropecuarias*, **199**, pp. 33-39.

Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., Fearnley, J., (2008). Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy research*, **22**, pp. 1256-1263.

Shabbir, A., Rashid, M., Tipu, H.N., (2016). Propolis, a Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens. *Cureus*, **8**, pp. 682.

Silva, R.P.D., Machado, B.A.S., Barreto, G.D.A., Costa, S.S., Andrade, L.N., Amaral, R.G., Carvalho, A.A., Padilha, F.F., Barbosa, J.D.V., Umsza-Guez, M.A., (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PloS one* **12**, e0172585/0172581-e0172585/0172518.



Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, **299**, pp. 152-178.

Siripatrawan, U., Vitthayakitti, W., Sanguandeeikul, R., (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**, pp. 22-27.

Speciale, A., Costanzo, R., Puglisi, S., Musumeci, R., Catania, M.R., Caccamo, F., Iannace, L., (2006). Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, beta-lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. *J. Chemother. (Firenze, Italy)* **18**. Pp. 164-171.

Steinmann, D., & Ganzera, M. (2011). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55**, pp. 744-757.

Stephanovic, S., Antic, N., Dakic, I., Svabic-Vlahovic, M., (2003). In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological research*, **158**, pp. 353-357.

Tivieron A.P, Rosalen P.L, Franchin M. Lacerda R.C.C, Bueno-Silva B, Benso. (2016). Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. *Journal. Pone*, **11**.

Tolba, M.F., Omar, H.A., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Naim, A.B., Abdel-Rehman, S.Z., (2016) Caffeic Acid Phenethyl Ester: A review of its antioxidant activity, protective effects against Ischemia-reperfusion Injury and drug adverse reactions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, pp. 2183-2190.

Ueda, T., Inden, M., Shirai, K., Sekine, S.-I., Masaki, Y., Kurita, H., Hozumi, I., Ichihara, K., Inuzuka, T., (2017) The effects of Brazilian Green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *SCI Rep*, **7**, pp. 2882.

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 (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, **131**, pp. 645-651.

Veiga, R, S., et al. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of Green propolis and *Baccharis dracunculifolia*DC. *J.Appl. Microbiol.* **122(4)**, pp. 911-920.

Wali, A.F., Mushtaq, A., Rehman, M.U., Akbar, S., Masoodi, M.H., (2016). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of propolis from Kashmir Himalaya region. *Free Radicals Antioxid.* **6**, pp. 51-57.

Watson, D.G., Peyfoon, E., Zheng, L., Lu, D., Seidel, V., Johnston, B., Parkinson, J.A., Fearnley, J., (2006a). Application of principal components analysis to <sup>1</sup>H NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochemical Analysis*, **17**, pp. 323-331.

Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X., (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, **16**, pp. 3444-3455.

Yoshimi, N., Masamitsu, S., Satoshi, M. and Hideaki, H. (2007). Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci*, **80**, pp. 370-377.

Zhang, C.-P., Shen, X.-G., Chen, J.-W., Jiang, X.-S., Hu, F.-L., Wang, K., (2017). Artepillin C, is it a good marker for quality control of Brazilian Green propolis? *Natural product research*, pp. 1-4.

Zingue, S., Tchatchou, J., Njamien, D., Nde, C.B.M., Clyne, C., Michel, T., Fernandez, X., Ndiniteh, D.T., D., Adamou, M., Fohouo, F.-N.T., (2017). Ethanol-extracted Cameroonian propolis exerts estrogenic effects and alleviates hot flushes in ovariectomized Wistar rats. *BMC complementary and alternative medicine*, **17**, pp. 65.

## 9. ANEXO



# Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis

J. Fausto Rivero-Cruz <sup>1</sup>, Eduardo Rodríguez de San Miguel <sup>1</sup>, Sergio Robles-Obregón <sup>1</sup>, Circe C. Hernández-Espino <sup>2</sup>, Blanca E. Rivero-Cruz <sup>1</sup>, José Pedraza-Chaverri <sup>1</sup> and Nuria Esturau-Escofet <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> 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.)

<sup>2</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Cd. Mexico, Mexico; chernandeze@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  $^1\text{H}$ -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<sup>t</sup>-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 <sup>1</sup>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<sub>3</sub> 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 <sup>a</sup>	Total Flavonoids <sup>b</sup>	% DPPH <sup>c</sup>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
						<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>
<b>Mexico City (CDMX)</b>								
<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

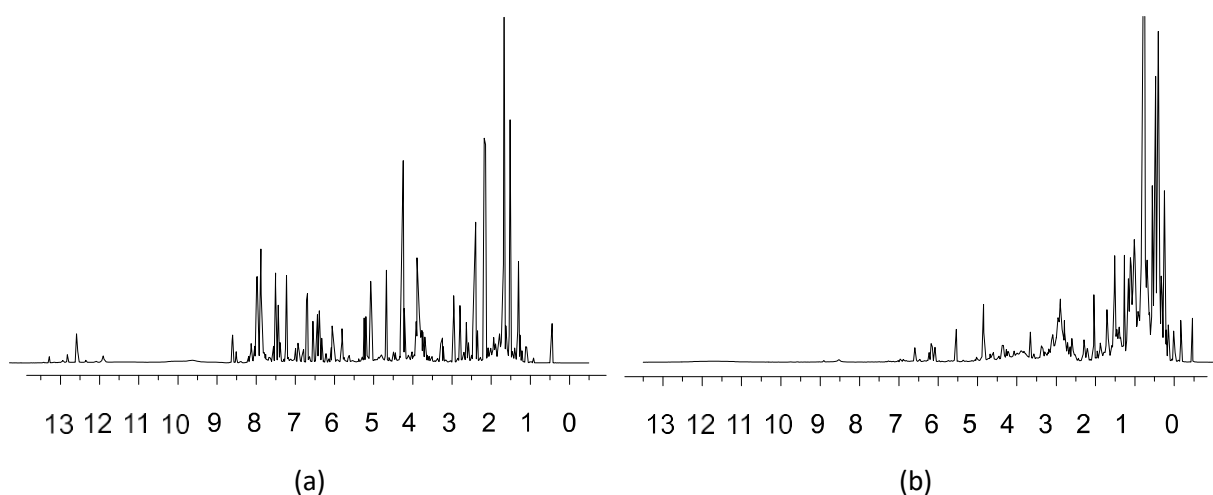
Table 1. Cont.

	Date of	Harvesting	Total Phenols <sup>a</sup>	Total <sup>b</sup>	% DPPH <sup>c</sup>	MIC ( $\mu$ g/mL)		
	Harvesting	Method		Flavonoids		<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>
<b>Puebla (PUE)</b>								
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
<b>Oaxaca (OAX)</b>								
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
<b>Guanajuato (GUAN)</b>								
Silao	October 2012	plastic nets	87.3	14.2	52.4	256	256	512
<b>Tlaxcala (TLAX)</b>								
Tlaxcala	October 2011	scraping	23.5	3.1	12.1	512	512	1024
<b>South America (ECUA)</b>								
Quito/Ecuador	2011		198.3	20.1	16.3	64	128	128
<b>China (CHINA)</b>								
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
<b>Positive control <sup>†</sup></b>						0.12	0.12	0.24

<sup>a</sup> Expressed in mg GAE/g EEP; <sup>b</sup> Expressed in mg QE/g EEP; <sup>c</sup> DPPH radical scavenging activity (percent); \* Purchased in a local market in Mexico City; <sup>†</sup> 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  $\delta$  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  $\delta$  6.0 ppm and 8.0 ppm. The signals between  $\delta$  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  $\delta$  5.0 ppm and 2.5 ppm. The singlet nearby  $\delta$  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  $\delta$  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

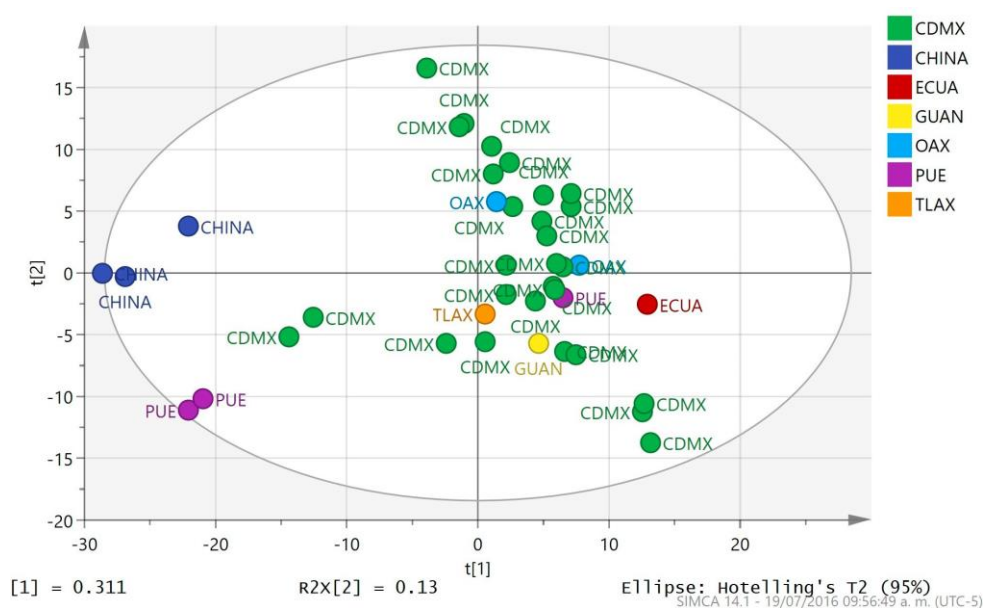
The obtained spectral data were submitted to multivariate analysis; first, to study the variations among the sample spectra, and second, to correlate the relative intensity and position of NMR resonance peaks to antioxidant activity determined by DPPH, the total phenolic and flavonoid contents, and the 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 linearly 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  $M = \text{number of y-variables}$  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.

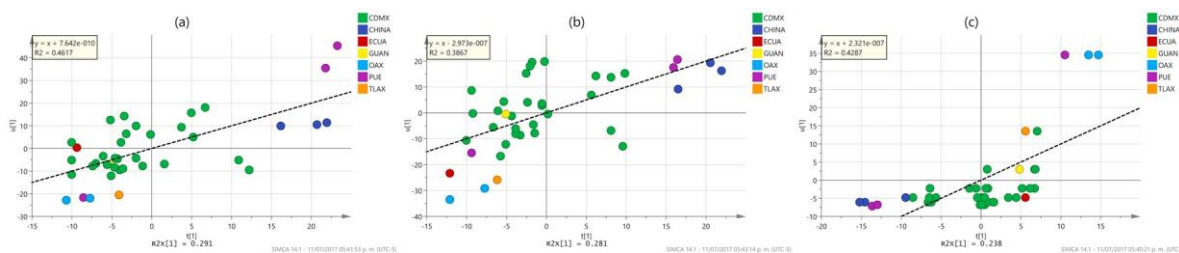
**Table 2.** Results of the PLS and OPLS modeling of propolis samples.

Property	Number of Latent Variables	Regression Equation <sup>a</sup>	$R^2$	$R^2X$ (cum)	$R^2Y$ (cum)	$Q^2$ (cum)	RMSEC	RMSECV
<b>PLS</b>								
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
<b>OPLS</b>								
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

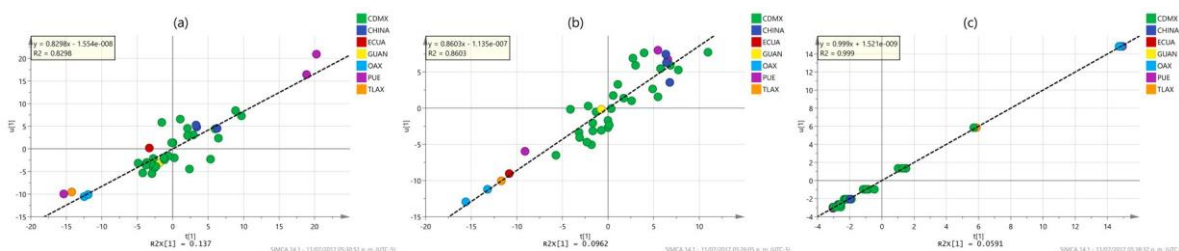
<sup>a</sup> observed vs. predicted values.

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 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.



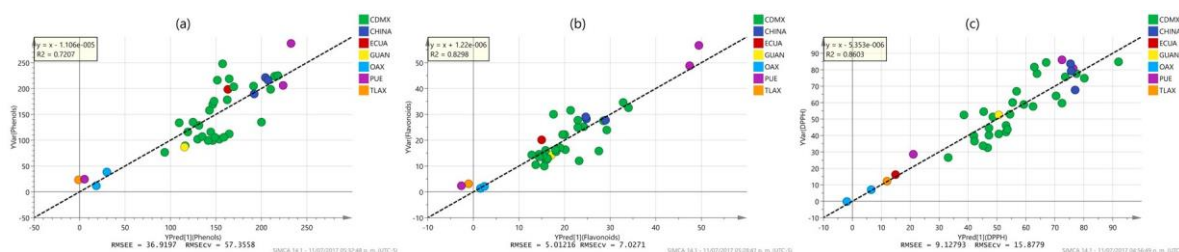
**Figure 3.** Inner relationship plots for the X-scores (u-data) and Y-scores (t data) between the first latent variables of the PLS models for (a) flavonoid content; (b) antioxidant (DPPH) content; and (c) antimicrobial *S. mutants* MIC activity, labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), 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.



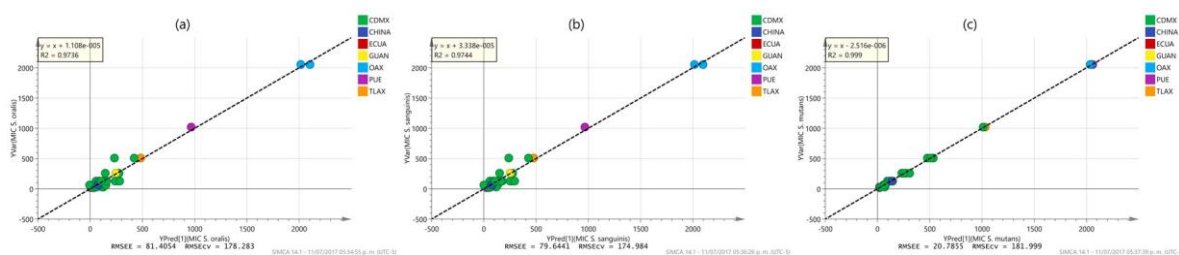
**Figure 4.** Inner relationship plots for the X-scores (u-data) and Y-scores (t data) between the first latent variables of the OPLS models for (a) flavonoid content; (b) antioxidant (DPPH) content; and (c) antimicrobial *S. mutants* MIC activity, labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), 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).

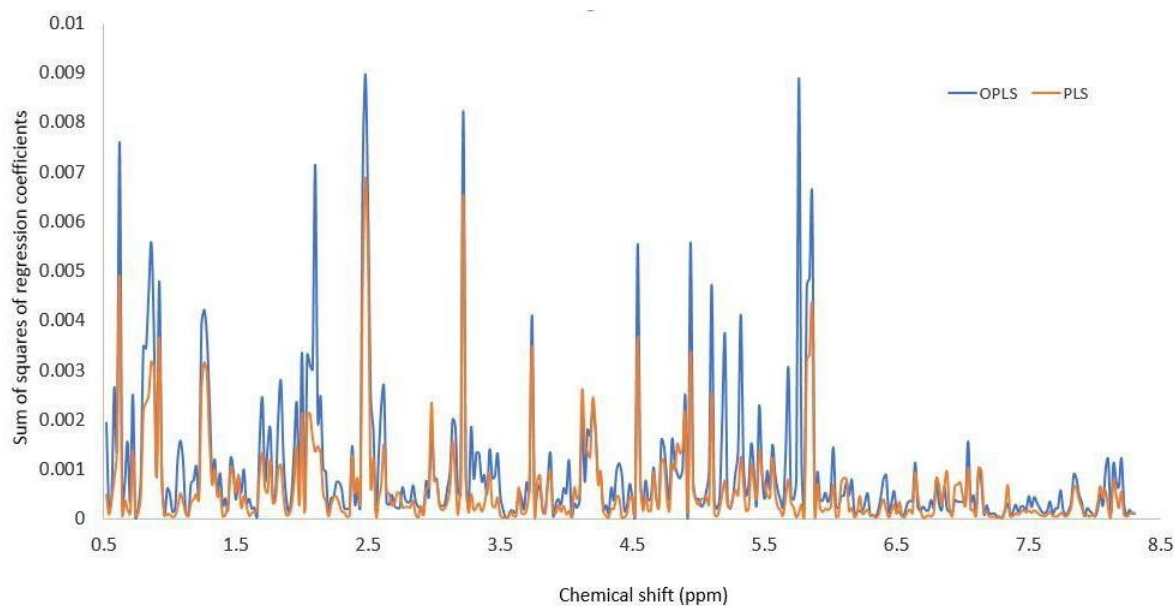


**Figure 6.** OPLS model observed vs. predicted antimicrobial MIC activity (a) *S. oralis*; (b) *S. sanguinis*, and (c) *S. mutans*, plot of propolis samples labeled according to their origin: Mexico City (CDMX), Puebla (PUE), Oaxaca (OAX), Guanajuato (GUAN), Tlaxcala (TLAX), Ecuador (ECUA) and China (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> )
<b>PLS</b>						
LD	0.37 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	0.35 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	0.40%	0.51 µg mL <sup>-1</sup>	0.51 µg mL <sup>-1</sup>	0.53 µg mL <sup>-1</sup>
LC	1.12 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	1.08 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	1.21%	1.55 µg mL <sup>-1</sup>	1.55 µg mL <sup>-1</sup>	1.61 µg mL <sup>-1</sup>
Evaluated linearity	12–287.20 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	1.30–56.70 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	0.40–86%	16–2048 µg mL <sup>-1</sup>	16–2048 µg mL <sup>-1</sup>	16–2048 µg mL <sup>-1</sup>
Sens	39.93 g EEP mg GAE <sup>-1</sup>	41.39 g EEP mg QE <sup>-1</sup>	36.80% <sup>-1</sup>	25.23 mL µg <sup>-1</sup>	25.27 mL µg <sup>-1</sup>	25.89 mL µg <sup>-1</sup>
Sel	0.87	0.87	0.86	0.79	0.79	0.79
γ	8.94 g EEP mg GAE <sup>-1</sup>	9.28 g EEP mg QE <sup>-1</sup>	8.28% <sup>-1</sup>	6.45 mL µg <sup>-1</sup>	6.46 mL µg <sup>-1</sup>	6.19 mL µg <sup>-1</sup>
γ <sup>-1</sup>	0.11 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	0.11 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	0.12%	0.15 µg mL <sup>-1</sup>	0.15 µg mL <sup>-1</sup>	0.16 µg mL <sup>-1</sup>
<b>OPLS</b>						
LD	0.45 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	0.39 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	0.49%	0.67 µg mL <sup>-1</sup>	0.66 µg mL <sup>-1</sup>	0.66 µg mL <sup>-1</sup>
LC	1.38 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	1.20 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	1.50%	2.03 µg mL <sup>-1</sup>	1.86 µg mL <sup>-1</sup>	1.99 µg mL <sup>-1</sup>
Evaluated linearity	12–287.20 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	1.30–56.70 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	0.40–86%	16–2048 µg mL <sup>-1</sup>	16–2048 µg mL <sup>-1</sup>	16–2048 µg mL <sup>-1</sup>
Sens	40.34 g EEP mg GAE <sup>-1</sup>	45.12 g EEP mg QE <sup>-1</sup>	37.76% <sup>-1</sup>	28.92 mL µg <sup>-1</sup>	29.13 mL µg <sup>-1</sup>	29.59 mL µg <sup>-1</sup>
Sel	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
γ	7.24 g EEP mg GAE <sup>-1</sup>	8.35 g EEP mg QE <sup>-1</sup>	6.66% <sup>-1</sup>	4.92 mL µg <sup>-1</sup>	4.95 mL µg <sup>-1</sup>	5.03 mL µg <sup>-1</sup>
γ <sup>-1</sup>	0.14 mg GAE g EEP <sup>-1</sup>	0.12 mg QE g EEP <sup>-1</sup>	0.15%	0.20 µg mL <sup>-1</sup>	0.20 µg mL <sup>-1</sup>	0.20 µg mL <sup>-1</sup>



**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  $\text{AlCl}_3$  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  $\text{NaNO}_2$  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  $\mu\text{L}$ ) and Folin-Ciocalteu reagent (80  $\mu\text{L}$ ) were mixed well during 5 min and 7.5% sodium carbonate solution (80  $\mu\text{L}$ ) 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  $\mu\text{L}$ ) was mixed with aluminum chloride solution (2% in methanol, 100  $\mu\text{L}$ ). 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  $5 \times 10^5$  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<sub>660</sub> 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<sub>660</sub> nm. As a positive control, chlorhexidine gluconate (CHX) was used.

### 3.8. NMR Experiments

All <sup>1</sup>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 <sup>1</sup>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 <sup>1</sup>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 DMSO-*d*<sub>6</sub> containing 0.03% TMS.

### 3.9. Data Processing for Multivariate Analysis

Using the software MestReNova each one-dimensional <sup>1</sup>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*<sup>2</sup><sub>X</sub> (cum), the proportion of the variance of the response variable that is explained by the model, *R*<sup>2</sup><sub>Y</sub> (cum), and the predictive ability parameter, *Q*<sup>2</sup> (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:

$$NAS_j = (x_j \cdot b) \cdot (b^T \cdot b)^{-1} \cdot b^T$$

where  $x_j$  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  $y_i$  and  $\hat{y}_i$  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 ( $\gamma$ ).** Defined by the ratio between sensitivity and instrumental noise,  $\delta x$ , 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,  $\gamma^{-1}$ , 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 ( $\beta$ ) and false positives ( $\alpha$ ) 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  $^1\text{H-NMR}$  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  $^1\text{H NMR}$  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.; Gođevac, 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.; Kuhn, 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. Marquetele, 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/>)

