



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Potencialización antimicrobiana de dos propóleos
mexicanos para su aplicación en casos de
Medicina Veterinaria**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
D O C T O R A E N C I E N C I A S

P R E S E N T A :

B E T S A B É R O D R Í G U E Z P É R E Z

Director de tesis:
Dr. José Guillermo Penieres Carrillo
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Cuautitlán Izcalli, Edo . de México

Agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

Al CONACyT por la beca proporcionada con número 511917

Académicos:

Dr. José Guillermo Penieres Carrillo

Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez

Dra. Raquel López Arellano

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Dra. Laura G. Espinosa Montaña

MC. Elisa Gutiérrez Hernández

MC. Francisco Rodolfo González Díaz

A todos los que recorrieron este camino a mi lado

Dios, familia, amigos y alumnos

FINANCIAMIENTO

Programa de becas del Consejo Nacional de Tecnología (CONACyT), con el número 511917.

“Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelosis del conejo, el distemper canino y la otitis canina”. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto DGAPA-UNAM IT 200915.

“Síntesis de compuestos híbridos chalcona-diindolilmetano y heterociclo-diindolilmetano y evaluación antifúngica *in vitro*”. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto DGAPA-UNAM IN217118.

“Desarrollo de productos sintéticos y prototipos farmacéuticos a base de propóleo para su aplicación en la salud animal” con número de clave PIAPIC 1632, del Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación de la FES Cuautitlán-UNAM.

“Química Heterocíclica”, con número de clave PIAPIC 14, del Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación de la FES Cuautitlán-UNAM.

LUGARES DE REALIZACIÓN

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 1 y 4. UNAM

- Laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.
- Laboratorio L-121 de la Sección de Química Orgánica. Bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM

- Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos. Bajo la responsabilidad de la Dra. María Margarita Canales Martínez.

RESUMEN

El propóleo es una mezcla compleja de resinas producida por las abejas al recolectar sustancias de la vegetación circundante a la colmena, por lo que su composición química varía en la proporción de sus componentes, como compuestos fenólicos y flavonoides, entre otros, que le confieren actividades como antimicrobiana, antioxidante, cicatrizante, entre otras; por tales motivos, los propóleos son usados en la industria farmacéutica, agrícola, cosmética y alimentaria.

Las chalconas son compuestos distribuidos en la naturaleza y precursores de los flavonoides, su estructura química presenta un anillo aromático en cada extremo de una cadena de tres átomos de carbono con un sistema carbonílico α,β -insaturado, en donde los anillos pueden estar sustituidos o no, por diversos sustituyentes químicos, principalmente grupos hidroxilo, y que de ello depende su actividad antimicrobiana.

En este trabajo de investigación, se evaluó la potencialización de la actividad antimicrobiana de dos propóleos mexicanos, uno con buena actividad antimicrobiana (propóleo del Estado de México, EM) y otro con baja actividad (propóleo del Estado de Guanajuato, G), mediante la adición a ellos de las chalconas sintetizadas: 1,3-difenilprop-2E-en-1-ona (PLCR-1) y dos análogos hidroxisustituidos en los anillos A y B: 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-2) y 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-3), en diferentes proporciones cada una y en combinaciones entre ellas, utilizando la técnica de difusión en disco frente a cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus flavus* (aislamiento de campo). Previamente a la adición de las chalconas a los propóleos, se detectaron, por técnicas cromatográficas, compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto del EM y un aceite esencial en el extracto de G., principalmente. Se observó la potencialización del efecto antimicrobiano de ambos propóleos, con la adición de las tres chalconas, predominando el efecto con la chalcona PLCR-2. Es necesario ampliar la investigación del mecanismo de acción de la relación chalcona:propóleo para validar estos resultados. Finalmente, esta investigación brinda

apoyo al apicultor que utiliza esta resina como materia prima para la elaboración de productos.

Palabras clave: propóleos, chalconas, potencialización, actividad antimicrobiana

ABSTRACT

Propolis is a complex mixture of resins produced by bees by collecting substances from the vegetation surrounding the hive, so its chemical composition varies in the proportion of its components, such as phenolic compounds and flavonoids, among others, that give it activities such as antimicrobial, antioxidant, healing, among others; for these reasons, propolis are used in the pharmaceutical, agricultural, cosmetic and food industries.

Chalcones are compounds distributed in the nature and precursors of flavonoids, its chemical structure has an aromatic ring at each end of a chain of three carbon atoms with a carbonyl system, α,β -unsaturated where the rings may or may not be replaced by various chemical substitutes, mainly hydroxyl groups and that its antimicrobial activity depends on it.

In this research paper, we evaluated the potentialization of the antimicrobial activity of two Mexican propolis, one with good antimicrobial activity (propolis from the state of Mexico, SM) and the other with low activity (propolis from the state of Guanajuato, G). We added chalcones: 1,3-diphenylpropyl-2*E*-1-one (PLCR-1), 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-(2,4,6-trihydroxyphenyl)prop-2*E*-en-1-one (PLCR-2) and 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2*E*-en-1-one (PLCR-3) each at different concentrations and combinations between them, by means of the disc diffusion technique using reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus flavus* (field isolation). Prior to the addition of chalcones to propolis, they were detected, by chromatographic techniques, phenolic compounds and flavonoids in SM extract and an essential oil in G. extract, mainly. The potentialization of the antimicrobial effect of both propolis was observed, with the addition of the three chalcones, predominantly the effect with the chalcona PLCR-2. It is necessary to expand the research of the mechanism of action of the chalcona:propolis relationship to validate these results. Finally, this research supports the beekeeper who uses this resin as a raw material for product processing.

Key words: propolis, chalcones, potentialization, antimicrobial activity

CONTENIDO

1	GENERALIDADES	1
1.1	Propóleo	1
1.1.1	Composición química	2
1.1.2	Actividad biológica	2
1.2	Compuestos fenólicos y flavonoides	3
1.3	Chalconas	6
1.3.1	Biosíntesis y estructura	6
1.3.2	Fuentes naturales de chalconas	8
1.3.3	Síntesis de chalconas	8
1.3.4	Actividad biológica	9
1.4	Microorganismos de importancia en la medicina veterinaria y humana	13
1.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.4.2	<i>Escherichia coli</i>	14
1.4.3	<i>Candida albicans</i>	15
1.4.4	<i>Aspergillus flavus</i>	16
2	JUSTIFICACION	18
3	HIPOTESIS	19
5	DISEÑO EXPERIMENTAL	21
6	MATERIALES Y MÉTODOS	22
a.	Síntesis de chalconas	22
b.	Colecta y recolección de los propóleos en greña	22
c.	Especificaciones físicas del propóleo en greña	22
d.	Especificaciones químicas	23
i.	Obtención de los extractos etanólicos de los propóleos (EEP)	23
ii.	Prueba cualitativa para la detección de fenoles totales	23
iii.	Prueba cualitativa para la detección de flavonoides	23
iv.	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	24
v.	Cuantificación de flavonoides	24
vi.	Índice de oxidación.....	24
vii.	Capacidad antioxidante	24
e.	Caracterización química	25
i.	Análisis por Cromatografía de Gases acoplada Espectrometría de Masas (CG-EM)	25
ii.	Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-DAD)	25
f.	Evaluación de la actividad antimicrobiana	26
i.	Microorganismos.....	26
ii.	Preparación de sensidiscos	26
iii.	Prueba de sensibilidad para bacterias y levaduras.....	27
iv.	Método de inhibición de crecimiento radial para hongos filamentosos	27

g.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de flavonoides puros de marca comercial.....	27
h.	Ensayos de potencialización.....	27
6.9	Análisis estadístico.....	28
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
a.	Síntesis de chalconas.....	28
b.	Recolección y especificaciones físicas de los propóleos.....	30
c.	Composición química.....	31
i.	Prueba cualitativa para la detección de fenoles totales y flavonoides.....	31
ii.	Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides.....	31
iii.	Propiedades antioxidantes.....	32
d.	Caracterización química.....	34
e.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de estándares de flavonoides.....	39
f.	Actividad antibacteriana de los extractos de propóleos.....	39
g.	Actividad antifúngica de los extractos de propóleos.....	41
i.	<i>Candida albicans</i>	41
ii.	<i>Aspergillus flavus</i>	42
h.	Ensayo de potencialización para bacterias.....	42
i.	Ensayo de potencialización para hongos.....	44
8	CONCLUSIONES	48
9	PROSPECTIVAS DEL PROYECTO	49
10	REFERENCIAS	50
11	ARTÍCULO PUBLICADO	61
12	ARTÍCULO ACEPTADO	71
13	ANEXOS	72
1.	Contenido de fenoles: método de Folin-Ciocalteu.....	72
2.	Cuantificación de flavonoides.....	75
3.	Índice de oxidación.....	78
4.	Capacidad antioxidante.....	79

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes químicos identificados en los propóleos.....	3
Cuadro 2. Combinaciones utilizadas entre las chalconas y los extractos etanólicos de propóleos.....	28
Cuadro 3. Especificaciones de las chalconas sintetizadas	30
Cuadro 4. Perfil químico de los extractos etanólicos de propóleos y las chalconas sintetizadas	32
Cuadro 5. Constituyentes del propóleo del Estado de México detectados por Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas	35
Cuadro 6. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos y chalconas	40
Cuadro 7. Actividad antifúngica de extractos de propóleos frente a <i>Candida albicans</i>	41
Cuadro 8. Prueba de inhibición del crecimiento radial de los extractos de propóleos frente a <i>Aspergillus flavus</i>	42
Cuadro 9. Halos de inhibición (mm) mostrados por el efecto inhibitorio de la mezcla de extractos etanólicos y chalconas frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Cuadro 10. Halos de inhibición (mm) mostrados por el efecto inhibitorio de la mezcla de extractos etanólicos y chalconas frente a <i>Escherichia coli</i>	44
Cuadro 11. Actividad antifúngica de extractos de propóleos y potencialización de la actividad con chalconas PLCR-1-3 frente a <i>Candida albicans</i>	45
Cuadro 12. Prueba de potencialización de la actividad de chalconas sintetizadas PLCR 1-3 frente a <i>Aspergillus flavus</i>	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Izquierda: abeja recolectando resinas.....	1
Figura 2. Propóleos en greña.....	2
Figura 3. Ruta metabólica general de los metabolitos secundarios	4
Figura 4. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos.....	5
Figura 5. Estructura de las principales clases de flavonoides.....	6
Figura 6. Biosíntesis del núcleo de chalcona.....	7
Figura 7. Estructura química de una chalcona.....	7
Figura 8. Mecanismo de reacción para la síntesis de chalconas en medio básico.....	8
Figura 9. Mecanismo de reacción para la síntesis de chalconas en medio ácido.....	9
Figura 10. Principales actividades biológicas de las chalconas.....	10
Figura 11. Obtención de sistemas heterocíclicos de 5 (4), 6 (5) y 7 miembros (6) a partir de sistemas carbonílicos α,β -insaturados.....	11
Figura 12. Estructuras químicas y actividades biológicas de algunas chalconas de importancia para la agricultura y la protección de las plantas.....	12
Figura 13. Morfología microscópica y macroscópica de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> y afecciones en humanos y animales.....	14
Figura 14. Morfología microscópica y macroscópica de colonias de <i>Escherichia coli</i> y afecciones en humanos).....	15
Figura 15. Morfología microscópica y macroscópica de colonias de <i>Candida albicans</i> y afecciones en humanos.....	16
Figura 16. Morfología microscópica de <i>Aspergillus flavus</i> y afecciones en semillas y granos por aflatoxinas.....	17
Figura 17. Diseño experimental.....	21
Figura 18. Síntesis general de chalconas PLCR 1-3.....	29
Figura 19. Identificación de fenoles totales (Izquierda) y flavonoides (derecha).....	31
Figura 20. Determinación del índice de oxidación.....	33
Figura 21. Características estructurales de la quercetina para un efecto antioxidante.....	34
Figura 22. Cromatograma del propóleo del Estado de México por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	36
Figura 23. Espectros de absorción UV-Vis de los flavonoides detectados en el propóleo del Estado de México.....	37
Figura 24. Cromatograma del propóleo de Guanajuato por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	38
Figura 25. Curva de calibración de ácido gálico.....	74
Figura 26. Curva de calibración de quercetina.....	77
Figura 27. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (sinónimo 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (DPPH•).....	79

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

HPLC-DAD Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de arreglo de diodos.

RT-PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa

1 GENERALIDADES

1.1 Propóleo

El término propóleo etimológicamente proviene del griego pro –“para o en defensa de” y polis - “ciudad” haciendo referencia a la defensa de la colmena (Bedascarrasbure, 2006). Es una sustancia de composición compleja elaborada por las abejas *Apis mellifera* L., a partir de resinas de la vegetación de alrededor de las colmenas y que las abejas modifican por glucólisis con enzimas de las glándulas de la hipofaringe. Una colonia de abejas *A. mellifera* y otras especies del mismo género, puede recoger anualmente entre 100 y 400 gramos de propóleo, dependiendo de sus necesidades, raza, condiciones climáticas y la disponibilidad de fuentes de materias primas vegetales en un perímetro de uno a dos kilómetros de la colmena (Chil *et al.*, 2002; León, 2012).

Posteriormente, la resina parcialmente digerida, es mezclada con cera y polen que es utilizada en la colmena como material de sellado durante el invierno, agente microbicida y desinfectante, por lo tanto, es el responsable directo de garantizar la asepsia de la colmena, siendo ésta un ambiente prolífero para el desarrollo de microorganismos, debido a sus condiciones de temperatura y humedad (Palomino *et al.*, 2010).

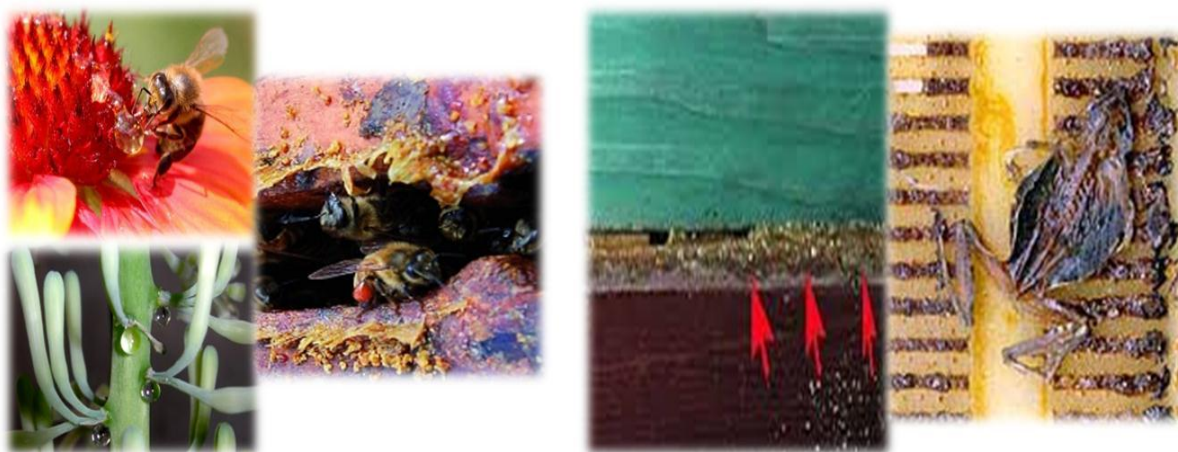


Figura 1. *Izquierda:* abeja recolectando resinas. *Derecha:* usos en la colmena (Rodríguez, 2019)

Las características físicas del propóleo como color, aroma, sabor y consistencia, están relacionadas con la fuente vegetal y clima de la región donde es recolectado. El color puede variar desde rojo, amarillo-rojizo, amarillo oscuro, verde castaño, pardo o negro (Figura 2); presenta un olor resinoso (madera) o balsámico (cera), sabor suave a picante y consistencia a temperatura ambiente maleable o rígida (González, 1997; Kuropatnicki *et al.*, 2013; DOF, 2017).



Figura 2. Propóleos en greña (Rodríguez, 2019)

1.1.1 Composición química

El progreso de la investigación sobre los propóleos ha permitido identificar compuestos como resinas y bálsamos, cera de abeja, aceites esenciales o volátiles, polen y materiales orgánicos y algunos minerales (Cuadro 1) (Bedascarrasbure, 2006; Alves *et al.*, 2011; Tovalino *et al.*, 2012). La fracción resinosa del propóleo está integrada por compuestos fenólicos y flavonoides, que son muy importantes a nivel terapéutico (Sosa-López *et al.*, 2016).

1.1.2 Actividad biológica

Actualmente, diversos estudios sobre los propóleos han comprobado una amplia gama de actividades biológicas, tanto en humanos como en animales, debida a flavonoides, entre las que destacan: antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral, antioxidante, cicatrizante, antiinflamatoria y antitumoral (Dobrowolski *et al.*, 1991; Miguel *et al.*, 2014, Soto-Vázquez, 2015). Es por ello que esta resina es de interés en el sector de la industria farmacéutica, la cosmética, la alimentaria y el sector agrícola (Matsuka, 2000, Soto-Vázquez, 2015).

La industria farmacéutica tiene mayor interés, ya que buscan nuevas alternativas para desarrollar tratamientos contra enfermedades infecciosas provocadas por la multirresistencia

de los microorganismos frente a los antibióticos o antifúngicos convencionales y encontrar soluciones que ofrezcan alternativas terapéuticas a un bajo costo (Lotti *et al.*, 2010; Hernández-Zarate *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Componentes químicos identificados en los propóleos.

CLASE DE COMPONENTE	COMPUESTOS
Bálsamos (40 a 70 %)	Compuestos fenólicos: fenoles, ácidos fenólicos, ésteres, flavonoides, ácidos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácido benzoico y ésteres
Ceras (20 a 35 %)	Componentes de cera de abejas
Aceites esenciales (7 %)	Monoterpenos y sesquiterpenos
Otros 5 %	Minerales, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, aminos, amidas, trazas de carbohidratos, lactonas, quinonas, esteroides y vitaminas.

(Gimeno, 2004; Bedascarrasbure, 2006; Sforcin y Bankova, 2011; Bogdanov, 2012; Kuropatnicki *et al.*, 2013).

En México, el apicultor recolecta propóleos y los oferta con fines antimicrobianos, por lo que es importante garantizar dicha actividad en relación con su contenido químico, como lo establece la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 “Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento” (DOF, 2017), que establece valores mínimos de aceptación, en donde cuanto mayor sea el porcentaje de estos compuestos, mejor será la actividad biológica del producto y viceversa, es decir, si la actividad biológica es baja o nula, los propóleos serán de baja calidad, teniendo un impacto económico para el productor.

1.2 Compuestos fenólicos y flavonoides

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios que contienen un grupo fenol, estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o

fenilpropanoides (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Existen dos rutas básicas implicadas en su biosíntesis: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido mevalónico (Figura 3) (Sepúlveda *et al.*, 2003).

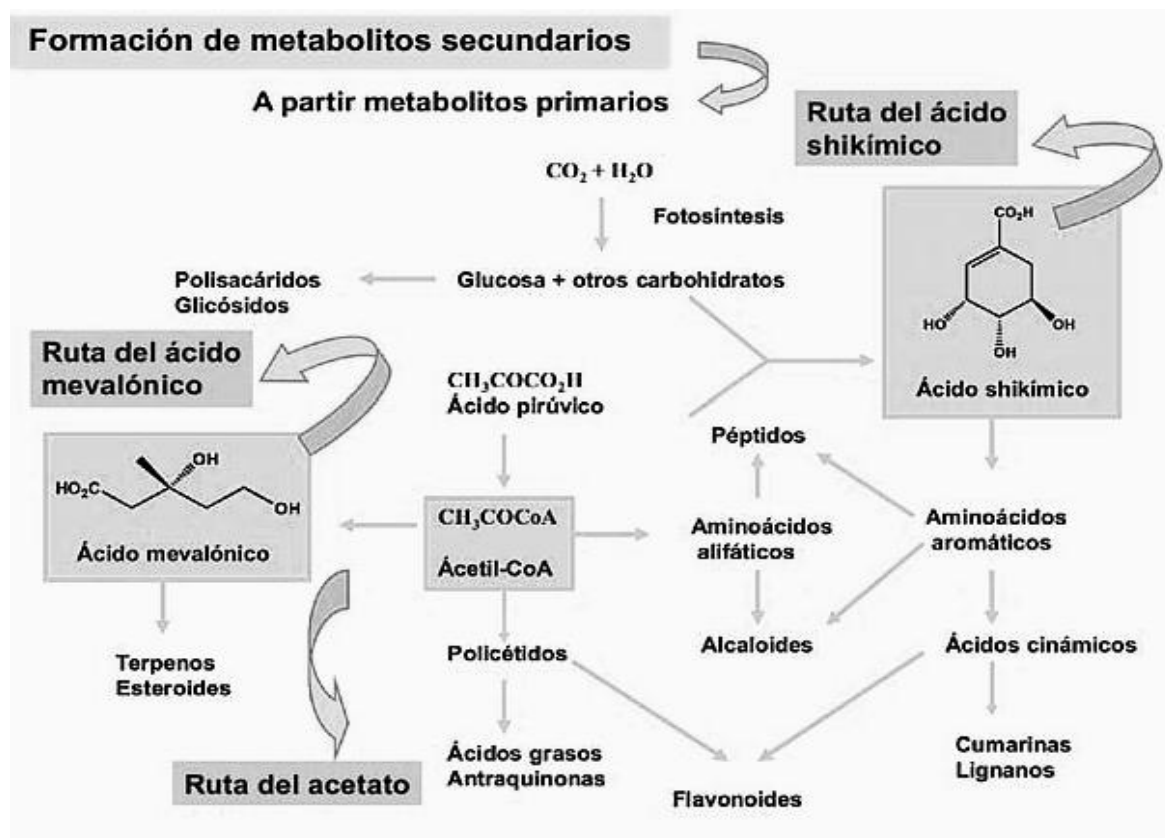


Figura 3. Ruta metabólica general de los metabolitos secundarios (Tomada de Gutiérrez y Estévez, 2009).

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo (OH) unidos a un anillo aromático. Estos compuestos presentan una serie de funciones metabólicas en las plantas, como en el crecimiento y reproducción, en la protección contra patógenos externos y el estrés, contra la radiación ultravioleta y los depredadores, además son responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos (Peñarrieta *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en función de su estructura química básica como fenoles simples (C6), ácidos fenólicos (C6-C1), ácidos fenilacéticos (C6-C2), ácidos cinámicos y cumarinas (C6-C3), flavonoides, chalconas, ligninas, antocianinas y antocianidinas (C15) (Figura 4). Estos compuestos tienen una importante actividad

antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, hipolipidémica e hipoglucemiante (Figuroa-Pérez *et al.*, 2016).

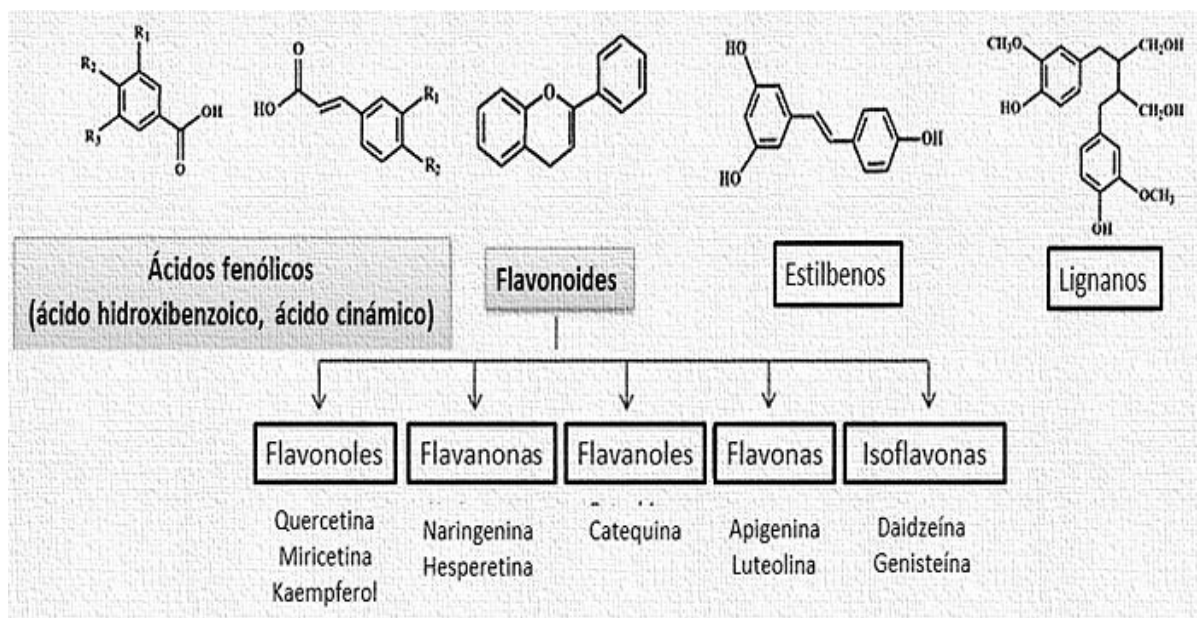


Figura 4. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos (Rodríguez, 2019).

Los flavonoides confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores. Químicamente son compuestos conformados por dos anillos fenilo, A y B, unidos a través de un anillo C de pirano (C6-C3-C6) que al adicionar grupos funcionales adicionales dicha secuencia puede modificarse mediante reordenamiento, alquilación, oxidación y glicosilación, lo que genera diferentes tipos de flavonoides, como se muestra en la Figura 5 (Falcone *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014).

Estos compuestos también presentan características de ser antioxidantes, antimicrobianos, cicatrizantes, antiinflamatorios (Limón *et al.*, 2010; Falcone *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Panché *et al.*, 2016), antiparasitarios, citotóxicos (Peñarrieta *et al.*, 2014) o insecticidas (Morgado *et al.*, 2014).

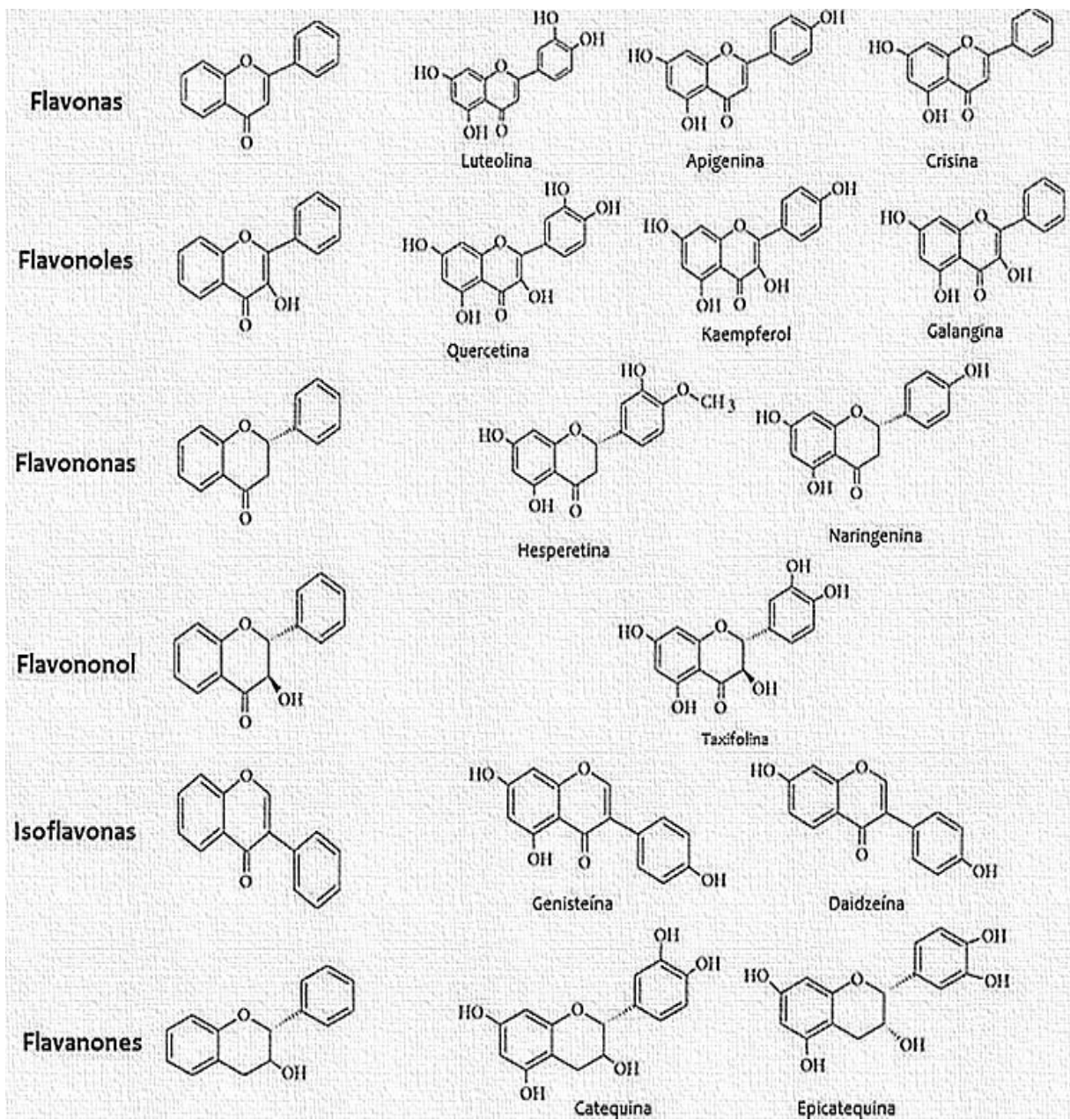


Figura 5. Estructura de las principales clases de flavonoides (Rodríguez, 2019)

1.3 Chalconas

1.3.1 Biosíntesis y estructura

Las chalconas son metabolitos secundarios distribuidas en la naturaleza y precursores en la biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides (Mora, 2011; Blanco *et al.*, 2016; Saprà *et al.*, 2016) y son considerados como un subgrupo de esta familia porque comparten la misma ruta

biosintética, se forman por acción de la enzima chalcona sintasa (CHS) y en una reacción posterior de ciclización catalizada por la enzima chalcona isomerasa (CHI) dan origen a los flavonoides (Figura 6) (Mora, 2011; Peña *et al.*, 2016).

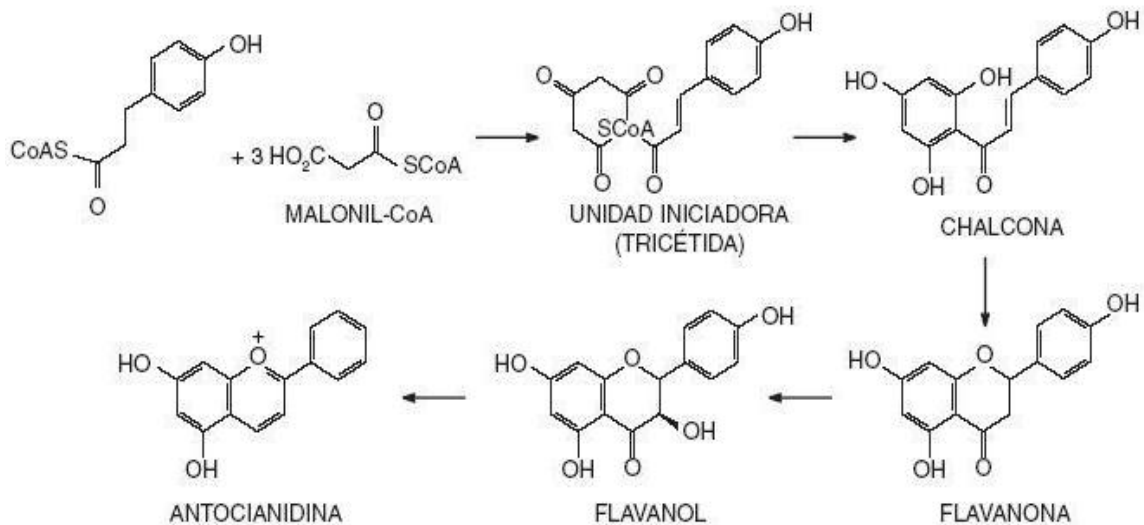


Figura 6. Biosíntesis del núcleo de chalcona (Tomada de Tenorio *et al.*, 2006).

La estructura de la chalcona se caracteriza por la presencia de un anillo aromático en cada extremo de una cadena de 3 átomos de carbono con insaturación α,β a un grupo cetona (1,3-difenil-2*E*-propen-1-ona) según la IUPAC (Figura 7), difieren de todos los demás flavonoides por la ausencia del anillo C (Peña *et al.*, 2016). En este sistema carbonílico, la presencia y posiciones de los sus sustituyentes químicos, determinan el amplio rango de su actividad biológica como son antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral, anticancerígena, antiinflamatoria, entre otras, considerándose compuestos con importantes potencialidades terapéuticas (Singh y Kumar, 2014; Mahapatra y Bharti, 2016; Díaz-Tielas, *et al.*, 2016; Blanco *et al.*, 2016).

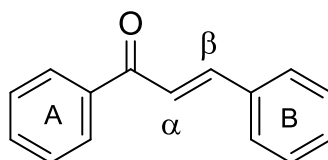


Figura 7. Estructura química de una chalcona (Tomada de Insuasty-Obando, 2016).

1.3.2 Fuentes naturales de chalconas

Las chalconas están ampliamente distribuidas en la naturaleza (frutas, verduras, especias, té y alimentos a base de soya) y sus derivados 2'-hidroxi juegan un papel importante en la síntesis y biosíntesis de flavonoides como precursores y productos (Sapra *et al.*, 2016), es por ello que desempeñan un importante papel ecológico en la vegetación, al participar como moléculas de señalización en las simbiosis planta-microorganismos. Están presentes como pigmentos en las flores que tienen un papel importante en la polinización (Díaz-Tielas, *et al.*, 2016).

Estos compuestos tienen efectos muy importantes en la bioquímica y fisiología de las plantas, en donde actúan como antioxidantes, inhibidores enzimáticos, precursores de sustancias tóxicas, formación de pigmentos y filtros solares. También están involucrados en mecanismos de fotosensibilización y de transferencia de energía, regulando así las reacciones de crecimiento, de control de la respiración, la fotosíntesis, la morfogénesis, la determinación sexual y la defensa contra infecciones (Tenorio *et al.*, 2006).

1.3.3 Síntesis de chalconas

Las chalconas se pueden obtener en el laboratorio a partir de síntesis química, mediante la condensación de Claisen-Schmidt, siendo éste uno de los métodos que más se han estudiado y utilizado (Velarde y González, 1995) entre un compuesto de tipo acetofenona con un aldehído aromático adecuado (Peña *et al.*, 2016), por catálisis con una base (Figura 8) o con un ácido (Figura 9), seguido de una deshidratación para producir chalconas.

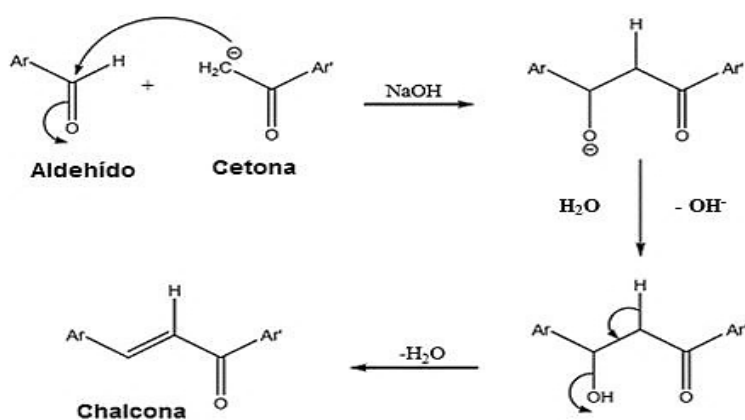


Figura 8. Mecanismo de reacción para la síntesis de chalconas en medio básico (Tomada de Chetana *et al.*, 2009)

La principal forma de obtención de chalconas es utilizando la reacción de Claisen-Schmidt y aunque este método es el más común, se han encontrado reportes de varias modificaciones al mismo, con el objetivo de obtener resultados de mayor rendimiento en tiempo más cortos e implementando tecnologías más limpias aplicando métodos de sustitución, isomerización y ciclación oxidante, así como la utilización de equipos como el ultrasonido (Ramírez *et al.*, 2012).

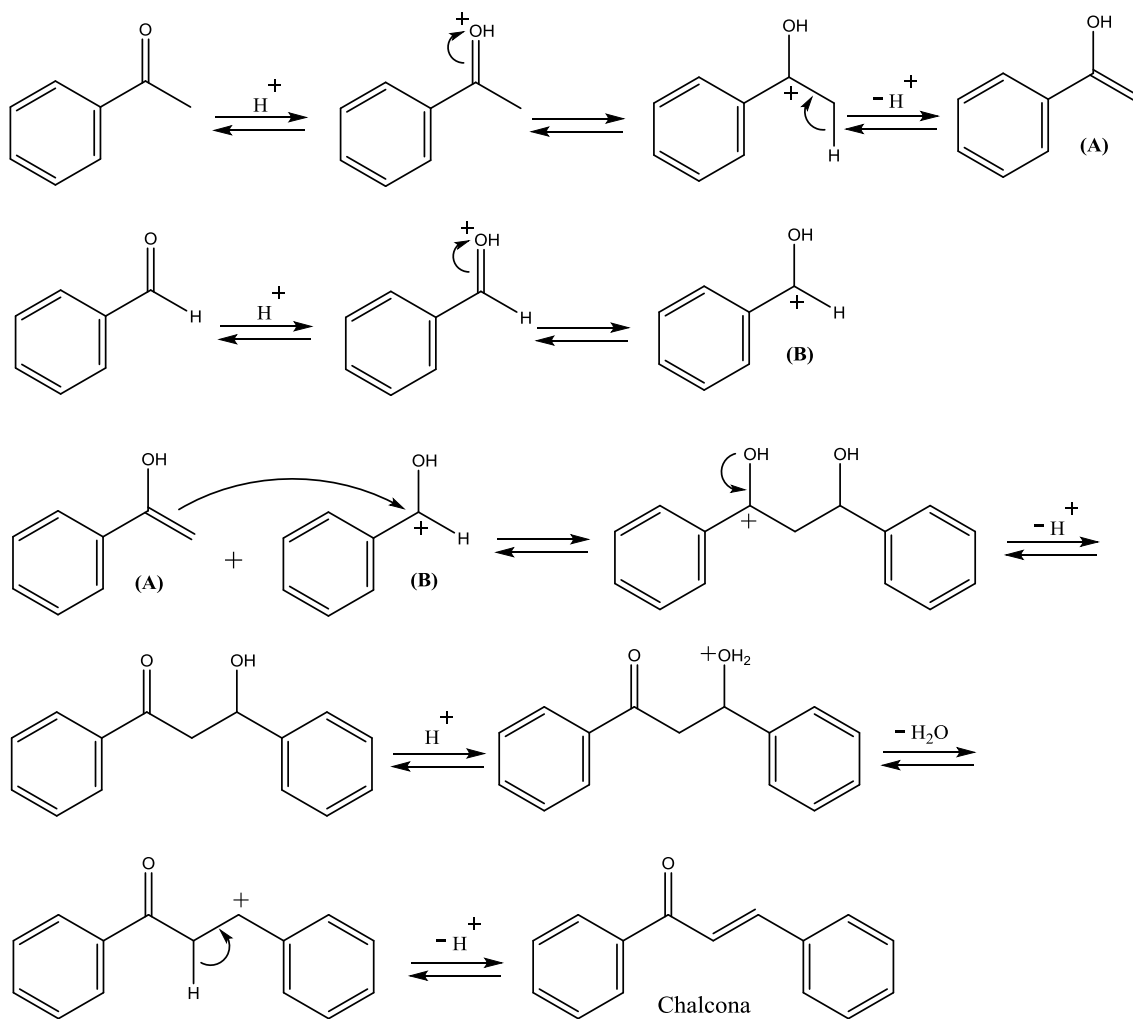


Figura 9. Mecanismo de reacción para la síntesis de chalconas en medio ácido (Tomada de Chetana *et al.*, 2009).

1.3.4 Actividad biológica

Las chalconas han ganado el interés de muchos investigadores debido a su probada actividad biológica como se muestra en la Figura 10 (Debarshi y Sanjay, 2016; Peña *et al.*, 2016). Por ello se considera que estos compuestos presentan importantes potencialidades terapéuticas.

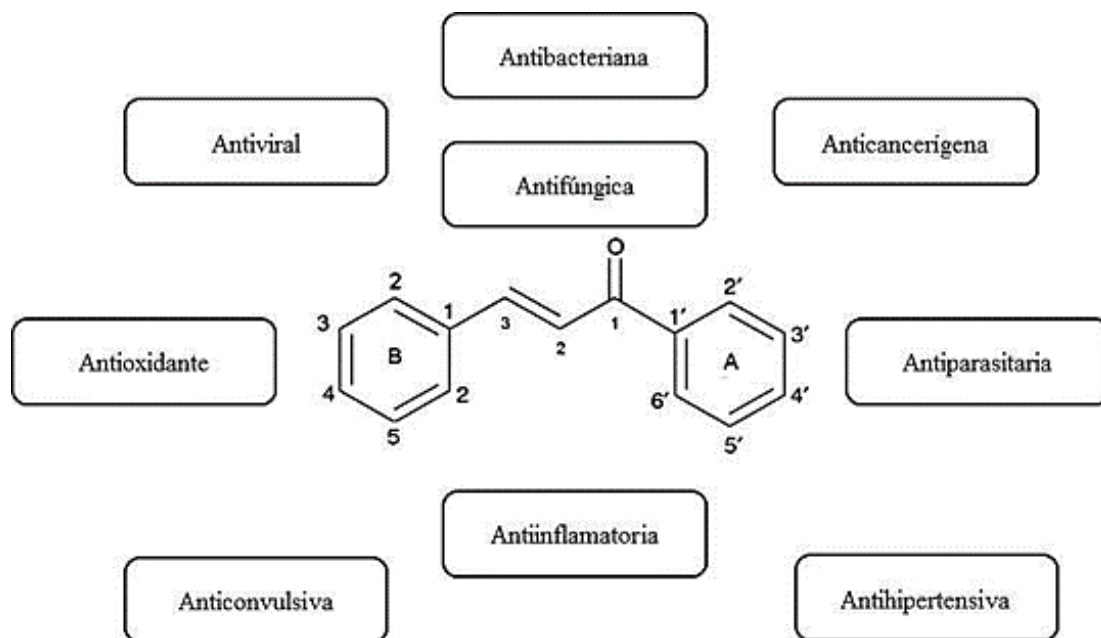


Figura 10. Principales actividades biológicas de las chalconas (Rodríguez, 2019).

El amplio rango de actividad biológica de las chalconas depende del doble enlace α,β característico y la presencia y posiciones de los grupos hidroxilo (o sus sustituyentes químicos) (Peña *et al.*, 2016; Díaz-Tielas, *et al.*, 2016). Además presentan gran reactividad por la presencia de dos centros electrofílicos, los cuales pueden actuar como una sola unidad o de manera independiente, lo que permite para estos sistemas el ataque de nucleófilos y la posibilidad de sufrir una adición 1,2-(adición directa) o 1,4-(adición conjugada) (Insuasty-Obando, 2016).

El doble enlace conjugado produce la deslocalización de electrones π que reduce su carácter nucleofílico y lo convierte en un producto intermedio para la síntesis de diversos sistemas heterocíclicos como pirazolinas, oxazolinas, tiazinas, oxazinas y pirimidinas, entre otros, con la formación en la mayoría de casos de un solo producto y la obtención de sistemas parcialmente hidrogenados, a diferencia del caso de los compuestos 1,3-dicarbonílicos en donde se pueden obtener mezclas de productos, en muchos casos difíciles de separar por su similitud en propiedades (Figura 11) (Singh y Kumar, 2014; Díaz-Tielas, *et al.*, 2016; Sapra *et al.*, 2016).

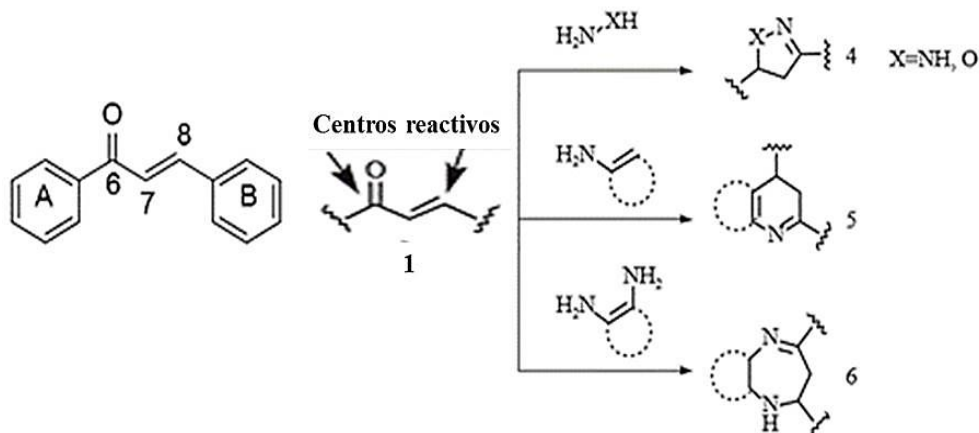


Figura 11. Obtención de sistemas heterocíclicos de 5 (4), 6 (5) y 7 miembros (6) a partir de sistemas carbonílicos α,β -insaturados (Tomada y modificada de Insuasty-Obando, 2016).

Existen reportes que demuestran la potencial actividad antiinflamatoria de chalconas sintéticas, que inhiben la liberación de los mediadores químicos de neutrófilos y macrófagos, actúan sobre la producción del óxido nítrico y algunas de ellas intervienen sobre la respuesta inflamatoria actuando como inhibidores de la enzima 2-ciclooxigenasa (Chaván *et al.*, 2016; Insuasty-Obando, 2016); la Licochalcona A, un producto natural aislado de las raíces de la planta *Glycyrrhiza inflata*, ha presentado una potente actividad frente al parásito de la malaria y *Leishmania* sp., tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* actividad contra las plagas (Díaz-Tielas, *et al.*, 2016), para el control de malezas y actividades bactericidas, antifúngicas, antihelmínticas, insecticidas, antivirales y fitotóxicas (Figura 12).

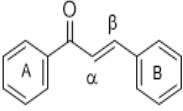
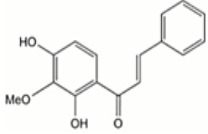
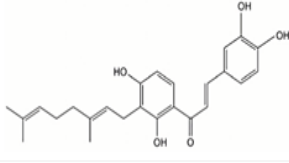
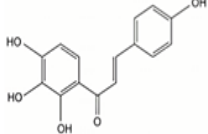
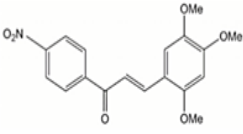
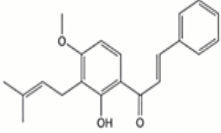
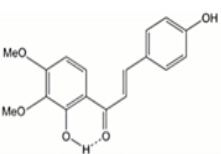
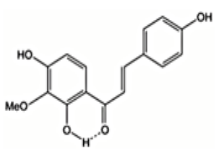
Estructura	Nombre químico	Actividad
	1,3-Difenilprop-2E-en-1-ona	Fungicida, Nematicida, Fitotóxico
	2',4'-Dihidroxi-3'-metoxichalcona	Fungicida
	2',3,4,4'-Tetrahidroxi-3'-geranilchalcona	Fungicida
	2',3',4',4'-Tetrahidroxichalcona	Antiviral
	1-(4'-Nitrofenil)-3-(2,4,5-trimetoxifenil)prop-2E-en-1-ona	Nematicida
	1-[2-Hidroxi-4-metoxi-3-(3-metilbut-2-enil)fenil]-3-fenilprop-2E-en-1-ona	Insecticida
	2',4'-Dihidroxi-3',4'-dimetoxichalcona	Fitotóxico
	2',4',4'-Trihidroxi-3'-metoxichalcona	Fitotóxico

Figura 12. Estructuras químicas y actividades biológicas de algunas chalconas de importancia para la agricultura y la protección de las plantas (Tomado y modificado de Díaz-Tielas, *et al.*, 2016).

1.4 Microorganismos de importancia en la medicina veterinaria y humana

1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias Gram positivas, agrupados como células únicas en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (Cervantes *et al.*, 2014). A la fecha, se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus* (Zendejas *et al.*, 2014). Es uno de los microorganismos que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones hospitalarias y comunitarias, siendo uno de los patógenos nosocomiales de mayor importancia (Cervantes *et al.*, 2014) que provocan lesiones superficiales como abscesos de piel e infecciones de heridas, infecciones sistémicas como bacteremia, endocarditis, meningitis, neumonías o síndromes tóxicos como la intoxicación alimentaria (Lozano *et al.*, 2013).

A las cepas de *S. aureus* que presentan resistencia a los betalactámicos se les ha denominado resistentes a meticilina, o SARM. En México, los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* variaron entre un 5 a 70% en los últimos años. La gran mayoría de los SARM no solo son resistentes a los β -lactámicos, sino también a múltiples antibióticos como vancomicina, oxacilina, la eritromicina, rifamicina y ciprofloxacino.

El propóleo es tenido ya en la actualidad como un antimicrobiano innegable, especialmente en contra de *S. aureus*, cuyos mecanismos de acción incluyen debilitamiento de la pared celular, inhibición de la síntesis proteica e inhibición en el proceso de replicación y expresión genética (Lozano *et al.*, 2013).

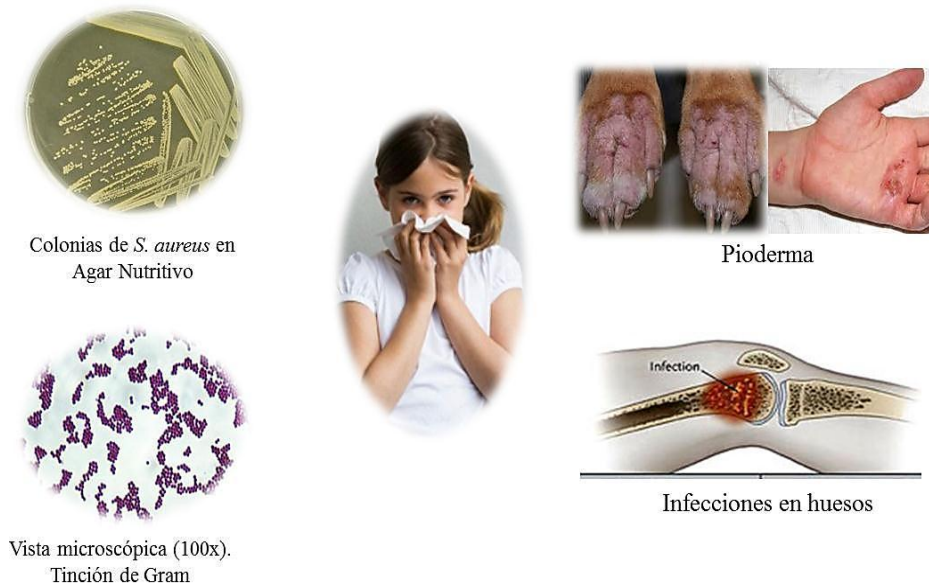


Figura 13. Morfología microscópica y macroscópica de colonias de *Staphylococcus aureus* y afecciones en humanos y animales (Rodríguez, 2019)

1.4.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria en forma de bacilo Gram negativo que coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Rodríguez, 2002).

Es causante de problemas gastrointestinales con producción de diarreas en cerdos, bovinos, ovinos, caprinos y equinos. Se considera patógeno oportunista en infecciones de vías urinarias y respiratorias, mastitis, onfalitis y otros procesos infecciosos. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea, se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC).

En los últimos años se ha observado la aparición, cada vez más frecuente, de *E. coli*, productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que confieren resistencia a las

cefalosporinas. Estas bacterias son frecuentemente resistentes también a antibióticos no betalactámicos, lo que plantea un importante problema clínico (Yaque *et al.*, 2005).

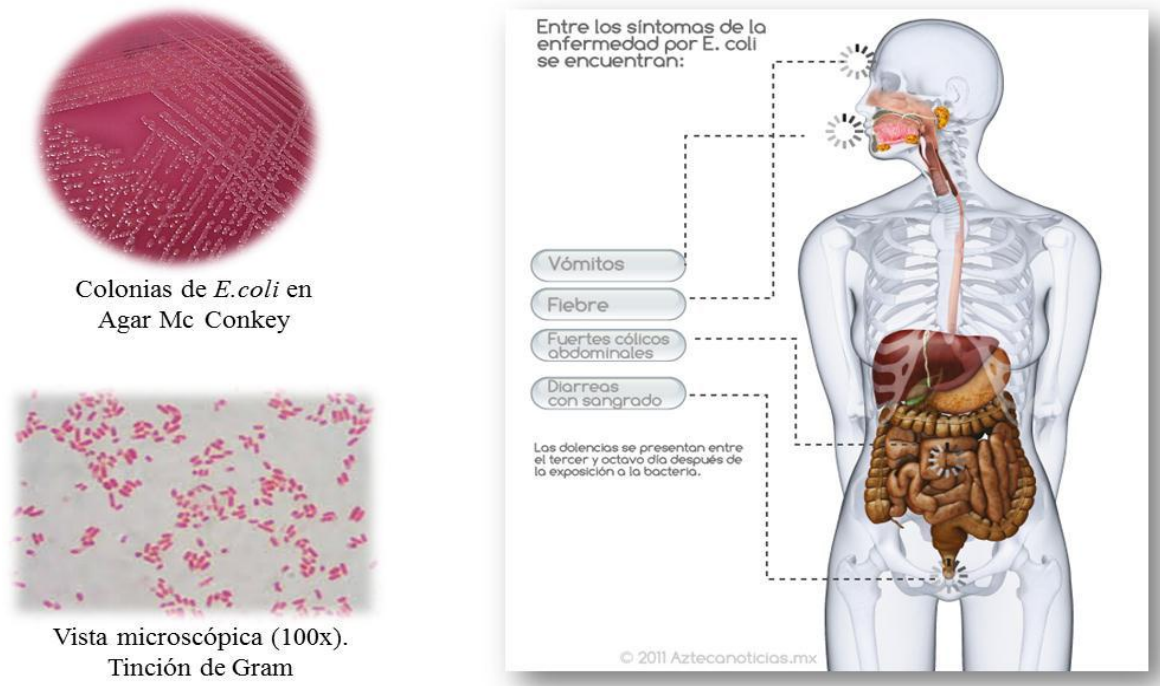


Figura 14. Morfología microscópica y macroscópica de colonias de *Escherichia coli* y afecciones en humanos (Rodríguez, 2019).

1.4.3 *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo levaduriforme saprófito, es parte de la flora normal microbiana endógena, razón que justifica la creencia de que las infecciones por este patógeno son de origen endógeno (Rippton, 2003). El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofita, mientras que, en forma de hongo filamentososo, se comporta como un parásito patógeno produciendo sintomatología en el huésped.

La levadura está presente en la mayoría de los humanos y animales como un microorganismo comensal ubicuo, se encuentra normalmente en piel, estómago, colon, vagina, recto y cavidad oral. A pesar de ello, pacientes inmunocomprometidos puede convertirse en un patógeno que causa infecciones locales o sistémicas (Espina *et al.*, 2005) provocando candidosis o candidiasis. Cualquier tejido puede ser afectado, por lo que se

presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente. Las candidosis de mucosas y piel son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas.

El empleo frecuente de compuestos azólicos ha dado origen a infecciones recurrentes por la resistencia de esta levadura a diferentes antimicóticos como el clotrimazol, el econazol y el fluconazol. Se ha mencionado que el extracto etanólico de propóleos podría ser usado como medicina alternativa en el tratamiento de las candidosis en pacientes VIH positivos, siendo tan efectivo como la nistatina y superando a otros antifúngicos utilizados tradicionalmente (Quintero-Mora *et al.*, 2008).

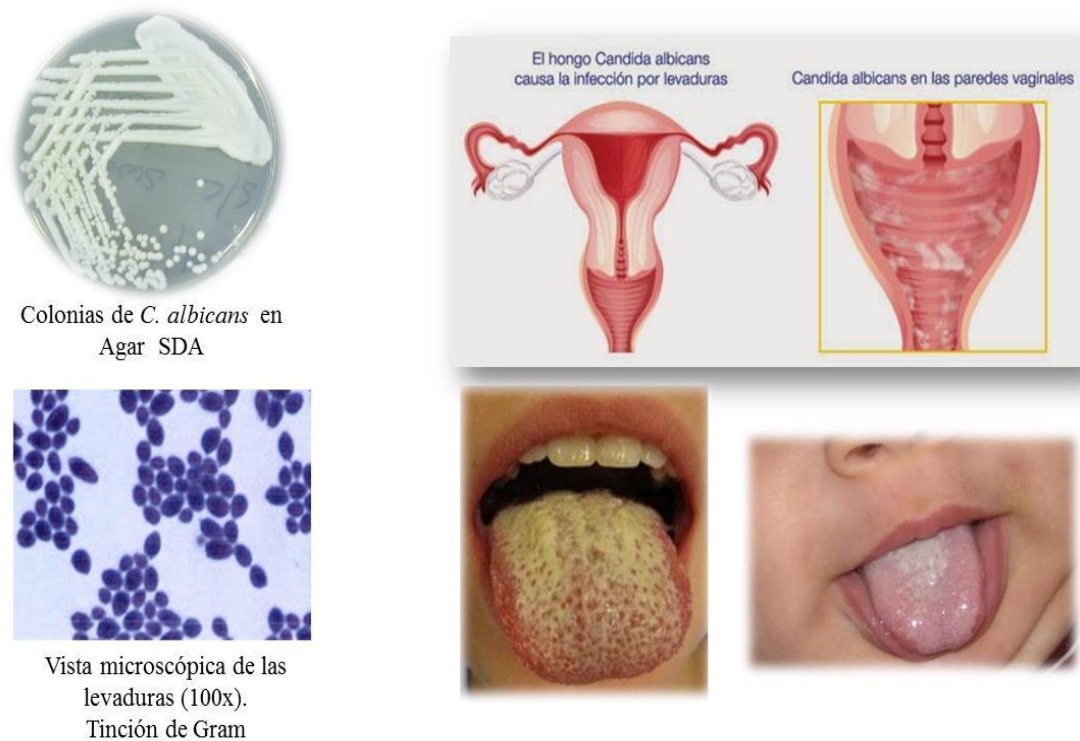


Figura 15. Morfología microscópica y macroscópica de colonias de *Candida albicans* y afecciones en humanos (Rodríguez, 2019).

1.4.4 *Aspergillus flavus*

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el ser humano y animales se encuentran expuestos constantemente a su inhalación (Abarca, 2000).

Las aspergilosis más frecuentes son pulmonar, diseminada, cutánea, ótica, oftálmica y estados de hipersensibilidad inmunológica (alergias) causadas por: *A. fumigatus* (75-65%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (1,5-3%) y *A. terreus* (2-3%) (Díaz y López, 2004).

El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas, son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente. La interacción de dichos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas (Martínez, 2013).

En el caso de las personas que manejan granos (maíz, centeno, trigo, alimento de aves) están sujetas a inhalar grandes cantidades de esporas o conidios, ya que las especies de *A. flavus* y *A. parasiticus* que saprofitan en estos productos (Bonifaz, 2012). El efecto toxígeno de las aflatoxinas producidas por *Aspergillus* varía desde los carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos, hasta la producción de desórdenes hormonales o inmunosupresores, lo que a su vez depende de la aflatoxina, dosis, tiempo de exposición u organismo expuesto (Martínez, 2013).

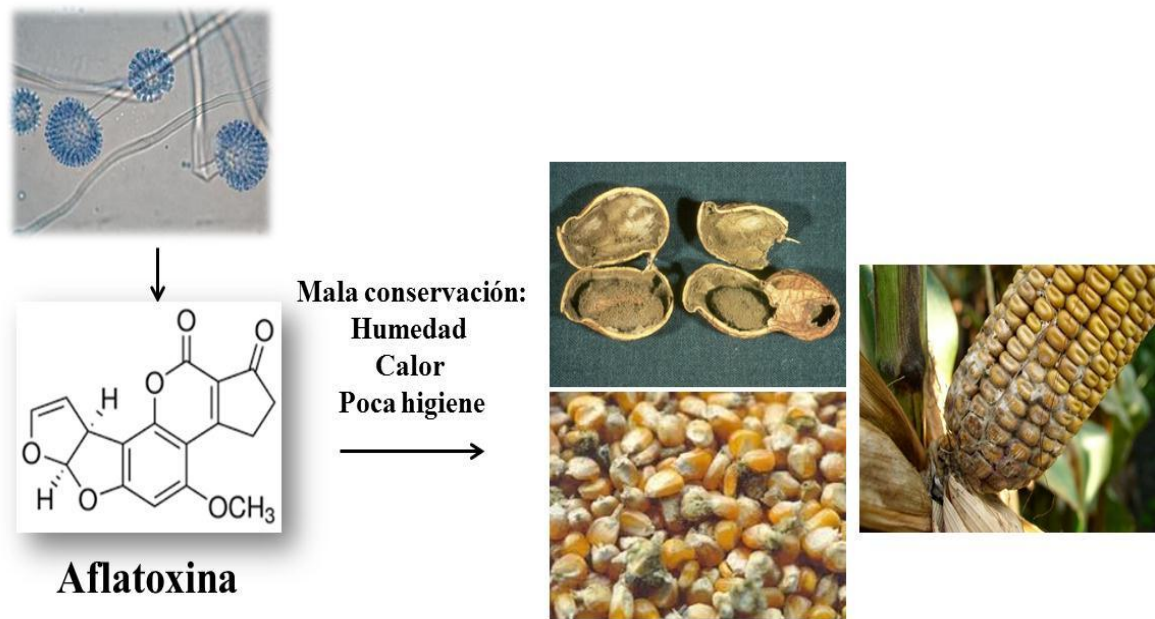


Figura 16. Morfología microscópica de *Aspergillus flavus* y afecciones en semillas y granos por aflatoxinas (Rodríguez, 2019)

2 JUSTIFICACION

La apicultura tiene una gran importancia socioeconómica y ecológica a nivel nacional, ya que es considerada como una de las principales actividades pecuarias ganadoras de divisas, considerando que el stock de colmenas que se estima, es de 2.7 millones de unidades y una producción nacional estimada en 7 toneladas al año de propóleo, con un valor comercial de 3.5 millones de pesos.

Por ello, los antecedentes de este proyecto son el establecimiento de las pruebas necesarias para determinar la actividad biológica de los propóleos mexicanos, encontrando propóleos de baja actividad biológica y que impactan a la económica del apicultor, pues él realiza la producción y recolección para elaborar productos con fines terapéuticos.

Por eso, se consideró importante potencializar la actividad de este producto apícola, pues la producción de propóleos podría brindar al apicultor alternativas económicas por sus propiedades biológicas incrementadas, que podrían proporcionar grandes beneficios en la salud animal, la inocuidad alimentaria y fomentar la creación de nuevos nichos en el mercado nacional al implementar los propóleos como materia prima.

Con base a lo establecido por la Comisión Federal de Mejora Regulatoria (COFEMER), referente a la evaluación de propóleos siguiendo la normativa mexicana, se permitirá al productor, utilizando métodos estandarizados de producción y contemplando análisis de laboratorio, comercializar su propóleo a un precio similar al mercado internacional, aproximado a los \$2,000 pesos por kilogramo, ya que el precio actual oscila entre los \$500 y \$800 por kilogramo.

3 HIPOTESIS

El propóleo presenta actividad antimicrobiana en relación a la concentración de flavonoides, por lo que si se añaden precursores biosintéticos de flavonoides, como chalconas (también consideradas como flavonoides) sintetizadas, en concentraciones definidas a propóleos que presenten baja actividad antimicrobiana, se podrá potencializar su efecto en actividad biológica.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Potencializar la actividad antimicrobiana de dos propóleos mexicanos con la adición de chalconas sintéticas para su aplicación en casos de Medicina Veterinaria, evaluándolos frente a agentes etiológicos más comunes en Medicina Veterinaria.

4.2 Objetivos particulares

1. Desarrollar la síntesis de chalconas mediante la condensación de Claisen–Schmidt.
2. Recolectar muestras de propóleos en apiarios del Estado de México y Guanajuato.
3. Determinar las especificaciones químicas de los extractos de propóleos (EEP).
4. Realizar estudios de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y de cromatografía de líquidos de alta resolución de los extractos de propóleos.
5. Evaluar la actividad antimicrobiana de flavonoides puros de marca comercial contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*.
6. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de propóleos naturales, las chalconas sintetizadas y de extractos etanólicos adicionados con chalconas frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL

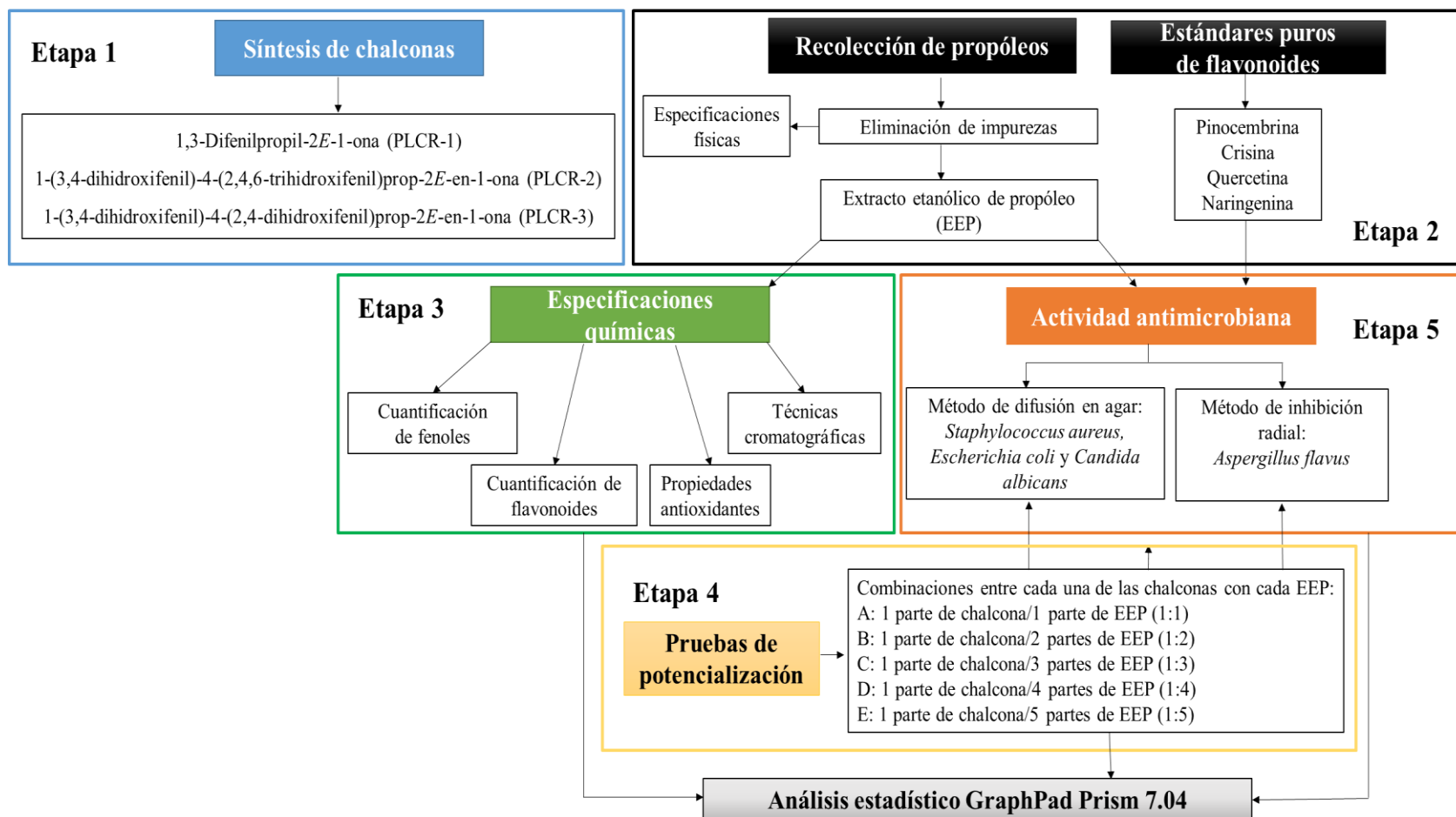


Figura 17. Diseño experimental

6 MATERIALES Y MÉTODOS

a. Síntesis de chalconas

Los reactivos y solventes utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich México y se emplearon sin ninguna purificación previa. Para la síntesis de chalconas, se realizó la reacción de condensación de Claisen-Schmidt entre el benzaldehído y la acetofenona correspondientes, a una concentración de 0.01 M, respectivamente. La mezcla se colocó en un matraz bola de 250 mL de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Posteriormente, se agregó gota a gota sobre la mezcla de reacción, 10 mL de una solución de NaOH (0.1 M) por un lapso de 30 min, manteniendo la temperatura de reacción entre 20 °C y 25 °C, utilizando un baño de hielo. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante por 5 h y a continuación se neutralizó con HCl 0.1 N, se dejó enfriar hasta la formación de un precipitado. El precipitado fue filtrado por gravedad y se dejó secar a temperatura ambiente. El producto principal fue purificado utilizando cromatografía en columna (sílica gel y hexano:acetato de etilo en proporción de 8:2) para la obtención de las chalconas puras (Chetana *et al.*, 2009; Hormaza *et al.*, 2009).

b. Colecta y recolección de los propóleos en greña

Se obtuvieron dos propóleos en greña o en bruto de la cosecha de verano (septiembre de 2015). Un propóleo proveniente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Estado de México) con localización geográfica al norte 19°41' y al oeste 99°11', con altura de 2260 msnm y recolectado utilizando mallas plásticas. El otro propóleo corresponde al municipio de San José Iturbide, Guanajuato con coordenadas al norte 21°07' y al oeste 100°32', con altura de 2100 msnm y recolectado por el método de raspado. A las muestras se les eliminaron las impurezas visibles, previo a la evaluación de las especificaciones físicas.

c. Especificaciones físicas del propóleo en greña

Las muestras se acondicionaron eliminando las impurezas visibles que acompañan al propóleo, tales como virutas de madera, restos de abejas, pinturas, vegetales, entre otros, previo a las pruebas organolépticas. La evaluación del color se realizó mediante la observación de la muestra empleando un microscopio estereoscópico para diferenciar las

tonalidades predominantes presentes en la misma. La descripción del aroma fue por la detección de dos tipos: olor a madera (resinoso) o a cera (balsámico). El sabor se identificó como dulce, amargo, picante o insípido. La consistencia se evaluó al tocar la muestra con los dedos, describiéndola como maleable o rígida (Lozina *et al.*, 2010; DOF, 2017).

d. Especificaciones químicas

i. Obtención de los extractos etanólicos de los propóleos (EEP)

Este procedimiento se realizó en el Laboratorio L-121 de Química Orgánica en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.

Se pesaron 50 g de la muestra en una balanza granataria y se colocaron en 150 mL de alcohol etílico al 70 %, se sometió a extracción en un ultrasonicador por 2 ciclos de 30 min, se filtró al vacío y el extracto se concentró utilizando un rotovapor, dejándolo a sequedad utilizando una bomba de vacío. El extracto se envasó en un recipiente color ámbar, para protegerlo de la luz y se refrigeró a 4 °C hasta su utilización (Trusheva *et al.*, 2007; DOF, 2017).

ii. Prueba cualitativa para la detección de fenoles totales

La mayor parte de los fenoles dan disoluciones coloreadas (azul, verde, violeta, entre otros). Si el color es amarillo débil (mismo que el reactivo), la reacción se considera negativa. Algunos fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinona. Los ácidos, a excepción de los fenólicos, no dan la reacción aunque algunos dan disoluciones o precipitados de color amarillento.

Así, se pesaron 200 mg de cada EEP y se colocaron en un tubo con 1 mL de etanol al 70 %, y se mezcló perfectamente. Se agregó 1 gota de cloruro férrico hexahidratado al 1% ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y se observó el desarrollo de color (DOF, 2017).

iii. Prueba cualitativa para la detección de flavonoides

Para el aislamiento de flavonoides se recurre a la extracción con solventes de polaridad creciente o directamente con álcali. Se pesaron 200 mg de EEP y se colocaron en un tubo con 1 mL de etanol al 70 %, se mezcló perfectamente y se agregó una gota de hidróxido de sodio al 20 % (NaOH) y se observó el desarrollo de color (DOF, 2017).

iv. Cuantificación de compuestos fenólicos

La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por el ensayo de Folin-Ciocalteu. Los reactivos y solventes utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Las muestras a evaluar se prepararon a una concentración de 0.05 mg/mL. Para la determinación se construyó una curva de calibración de 6.25 a 200 µg/mL empleando al ácido gálico como estándar (Sigma-Aldrich). El procedimiento se describe en el Anexo 1. El contenido de compuestos fenólicos se expresó en porcentaje (%) (DOF, 2017).

v. Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó por el método colorimétrico del cloruro de aluminio (AlCl₃). Los reactivos y solventes utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Para llevar a cabo esta determinación, se realizó una curva de calibración de 1 a 90 µg/mL utilizando quercetina como estándar de referencia. El procedimiento realizado se describe en el Anexo 2. El contenido de flavonoides se expresó en porcentaje (%) (DOF, 2017).

vi. Índice de oxidación

Una determinación rápida de la actividad antioxidante de los propóleos, es el índice de oxidación para detectar la presencia de compuestos de naturaleza fenólica, o con grupos funcionales oxidables (Delgado et al., 2015), al utilizar permanganato de potasio (KMnO₄) como agente oxidante de color violeta intenso, que se vuelve incoloro al reducirse el catión Mn⁷⁺ a Mn⁴⁺ en una solución ácida (Solomons, 2012; Skoog, 2015; Palomino *et al.*, 2010). El índice de oxidación se determinó de acuerdo a la normatividad mexicana (2017) y se describe en el Anexo 3.

vii. Capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante media (CA₅₀) de cada propóleo, se utilizó el método de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (también llamado 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (DPPH•). Las concentraciones a evaluar fueron de 1 a 250 µg/mL a partir de una concentración inicial de 1 mg/mL. Como control negativo se utilizó metanol y como control positivo, quercetina a las mismas condiciones que los EEP. El procedimiento se describe en el Anexo 4. Se calculó el porcentaje de reducción mediante la siguiente fórmula:

$$(\text{Absorbancia del DPPH}\bullet) / (\text{Absorbancia de la mezcla (DPPH}\bullet + \text{EEP)}) \times 100$$

La baja absorbancia de la mezcla de reacción indica alta actividad antioxidante (Barrón-Yáñez *et al.*, 2011; DOF, 2017).

e. Caracterización química

i. Análisis por Cromatografía de Gases acoplada Espectrometría de Masas (CG-EM)

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Bajo la responsabilidad de la Dra. María Margarita Canales Martínez.

El análisis cromatográfico de los extractos etanólicos fue realizado en un cromatógrafo de gases (6850) acoplado a un espectrómetro de masas (modelo 5975C, Agilent Technologies®, Pennsylvania, USA). La columna capilar fue una HP-5MS (30 m x 0.25 mm) y grosor de película de 0.25 mm (J&C Scientific, Agilent Technologies®, Pennsylvania, USA). Como gas acarreador se utilizó helio. El tipo de inyección fue en modo Split y el volumen de inyección de 1 µL. Las condiciones de separación utilizadas fueron al inicio una temperatura de 70 °C por 2 min con 2 incrementos de rampa. El primero de 20 °C por min hasta alcanzar los 230 °C; el segundo fue de 8 °C por minuto hasta llegar a los 280 °C manteniéndose por 5 min. El tiempo total de análisis fue 21.25 min. El rango de masa detectado fue de 35 a 750 *m/z*, la muestra fue ionizada por impacto electrónico a 70 eV y la temperatura alcanzada por la fuente de ionización fue de 230 °C. La identificación de los compuestos fue llevada a cabo por comparación con la biblioteca de la base de datos NIST versión 8.0 (Rivera *et al.*, 2017).

ii. Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-DAD)

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la responsabilidad de la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Se utilizaron 30 µL del extracto de propóleos, el extracto se inyectó a una concentración de 3 mg/mL en un equipo de HPLC Hewlett-Packard HP modelo 1100 (Hewlett-Packard, Wilmington DE, EE. UU.) con un detector de matriz de diodos (DAD) 1100 operado con ChemStation A0903 con los siguientes parámetros: separación isocrática usando una fase móvil, metanol:acetonitrilo:agua (25:25:50) acidificada con ácido fórmico (1%) durante 60

min, columna Discovery C-18 (250 × 4.6 mm) a 269 bar de presión y un rango de temperatura de 22 a 23 °C, velocidad de flujo de 1 mL/min, matriz de detectores de diodos con ajuste del detector a 260 nm, y escaneo completo de 200-400 nm. Los constituyentes se identificaron con base a una comparación del tiempo de retención y el espectro UV con los de los estándares (Rivera *et al.*, 2018).

f. Evaluación de la actividad antimicrobiana

i. Microorganismos

Los microorganismos utilizados fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

- **Bacteria Gram positiva:** *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- **Bacteria Gram negativa:** *Escherichia coli* (ATCC 8739)
- **Hongo levaduriforme:** *Candida albicans* (ATCC 10231)
- **Hongo filamentoso:** *Aspergillus flavus* (Aislamiento de campo)

ii. Preparación de sensidiscos

Las muestras a evaluar son los extractos de propóleos, las chalconas sintetizadas y la mezcla de ambas en diferentes proporciones para las pruebas de potencialización. La preparación de los sensidiscos con las muestras a evaluar se realizó de la siguiente manera: se impregnaron discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro (Whatman No. 5) con 6 mg de muestra/10 µL de etanol al 70 %, dejándose secar durante 24 h. Se utilizaron como testigos negativos, discos de papel de filtro impregnados con 10 µL de etanol al 70%. Como testigos positivos para las bacterias se utilizaron Multidiscos® combinados (Biorad) con 12 antibióticos: Amikacina (30 µg/disco), Ampicilina (10 µg/disco), Cefalotina (30 µg/disco), Ceftriaxona (30 µg/disco), Cloranfenicol (30 µg/disco), Dicloxacilina (1 µg/disco), Enoxacina (10 µg/disco), Eritromicina (15 µg/disco), Gentamicina (10 µg/disco), Netilmicina (30 µg/disco), Penicilina (tipo no especificado) (10 U/disco) y Trimetropin-Sulfametoxazol (25 µg/disco). Como testigo positivo para *C. albicans*, se utilizó ketoconazol de 50 µg (Bio-Rad catálogo 62866), unidisco de antifúngico comercial (CLSI/M44-A2, 2009; Londoño, 2010; DOF, 2017).

iii. Prueba de sensibilidad para bacterias y levaduras

El análisis cualitativo de la actividad sobre bacterias y la levadura se realizó por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer). La suspensión de los microorganismos se preparó de la siguiente manera: se tomó una asada de las colonias a evaluar y se sumergió en caldo Mueller-Hinton (MH) (Bioxon) para las bacterias y caldo Sabouraud (Bioxon) para la levadura. Las muestras se incubaron a 37 °C por 24 h para las bacterias y a 37 °C por 48 h para la levadura. Se ajustó la densidad del inóculo al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland, ajustando la turbidez entre 0.08 y 0.12 a 625 nm con un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (CLSI/M44-A2, 2009; CLSI/M26-A, 2009; Londoño *et al.*, 2010).

iv. Método de inhibición de crecimiento radial para hongos filamentosos

Se sembraron los hongos en placas de Agar SDA y se incubaron a 28 °C hasta que el desarrollo se apreció en toda la superficie del agar. Se tomó un inóculo de 5 mm de diámetro del hongo y se resembró, colocando los discos impregnados con 16 mg de EEP/disco y 8 mg de chalcona/disco. Se incubaron a 28 °C por 72 h, hasta que la superficie del agar estuvo cubierta por el micelio. Se observó la formación de zonas de inhibición con formas de media luna. Como testigo negativo se emplearon discos impregnados con etanol 70% y como testigo positivo, un undisco de voriconazol de 1 µg/disco (Bio-Rad catálogo 62803) (CLSI/M44-A2, 2009; Londoño, 2010; DOF, 2017).

g. Evaluación de la actividad antimicrobiana de flavonoides puros de marca comercial

Se adquirieron estándares puros de flavonoides marca Sigma Aldrich: Quercetina (No. de catálogo Q4915), Naringenina (No. de catálogo N5893), Pinocembrina (No. de catálogo N5893) y Crisina (No. de catálogo N5893). Se impregnaron discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro (Whatman No. 5) con 2, 4, 8 y 16 mg/10 µL de cada uno de los flavonoides y posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana.

h. Ensayos de potencialización

Se realizaron los ensayos de potencialización después de evaluar la actividad antimicrobiana de manera individual, de los EEP y de las chalconas. Se realizaron modificaciones a las metodologías utilizadas para los ensayos de evaluación de sinergia entre EEP y antimicrobianos (Mirzoeva *et al.*, 1997; Stepanović, *et al.*, 2003). Se prepararon diferentes concentraciones de EEP de 1 a 5 mg/mL y una concentración de 1 mg/mL para cada

chalcona. Se realizaron los cálculos químicos necesarios para tener cada una de las siguientes combinaciones entre cada una de las chalcona con cada EEP, como se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Combinaciones utilizadas entre las chalconas y los extractos etanólicos de propóleos.

Combinación	Proporción	mg chalcona	mg EEP
A	1:1	1	1
B	1:2	1	2
C	1:3	1	3
D	1:4	1	4
E	1:5	1	5

Se impregnaron discos estériles con 10 μ L de cada combinación y se realizó el procedimiento para evaluar la actividad antifúngica como se describió con anterioridad.

Teniendo los sistemas preparados, se procedió a realizar las pruebas de sensibilidad cualitativas, impregnando discos estériles con 10 μ L de cada combinación y se evaluó la potencialización de la actividad antimicrobiana.

6.9 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de Análisis de varianza (ANOVA), empleando un nivel de significancia de $P < 0.05$, utilizando el Programa Estadístico GraphPad Prism 7.04.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Síntesis de chalconas

Las tres chalconas sintetizadas mediante la reacción de condensación de Claisen-Schmidt fueron: 1,3-difenilprop-2*E*-en-1-ona (PLCR-1) y dos análogos hidroxisustituidos en los anillos A y B: 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil)prop-2*E*-en-1-ona (PLCR-2) y 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2*E*-en-1-ona (PLCR-3), las estructuras se

muestran en la Figura 18. El punto de fusión experimental sin corregir de cada chalcona y los indicados en la literatura se muestran en el Cuadro 3. Los porcentajes de rendimiento fueron satisfactorios con un valor promedio de 85% (Cuadro 3), lo que es de gran importancia, debido a que se utilizan catalizadores selectivos y que no afectan al medio ambiente, además de ser métodos más rápidos y eficientes (Ramírez *et al.*, 2012).

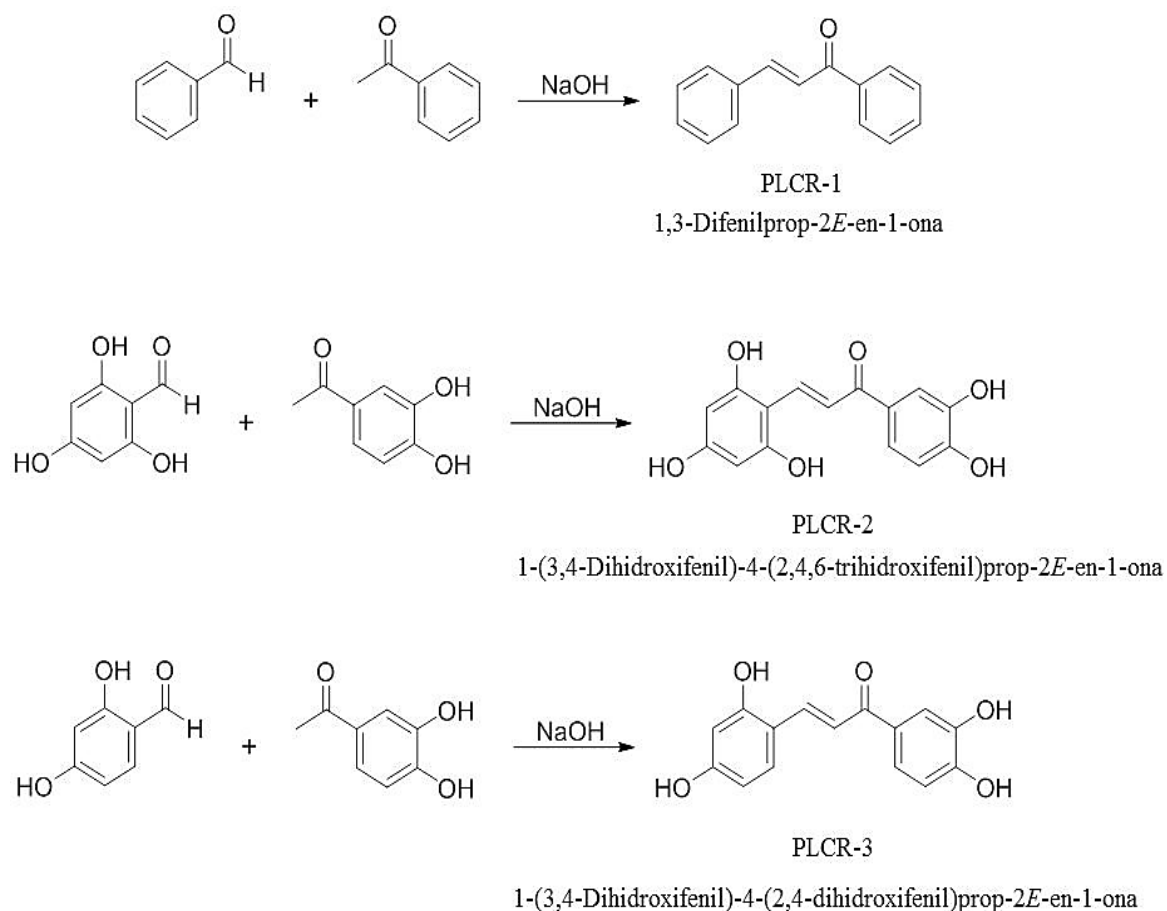
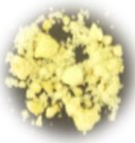

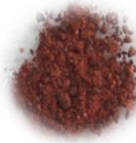


Figura 18. Síntesis general de chalconas PLCR 1-3

Cuadro 3. Especificaciones de las chalconas sintetizadas

	PLCR-1	PLCR-2	PLCR-3
Aspecto	Cristales amarillos	Polvo café	Polvo rojo
			
Peso obtenido (g)	13	5	6.74
Rendimiento (%)	88	71	96
Punto de fusión no corregido (°C)	47	100	230
Punto de fusión publicado (°C)	55 – 57	Estos datos no se encuentran reportados en la base de datos del sistema SciFinder, considerando que son compuestos nuevos.	

b. Recolección y especificaciones físicas de los propóleos

El propóleo del Estado de México (EM) proveniente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se produjo utilizando mallas plásticas, lo que evita la manipulación de la resina y garantiza que su composición química no se afecte (DOF, 2017). El propóleo de San José Iturbide, Guanajuato (G) fue recolectado por el método de raspado. Bucio *et al.*, (2016) estudiaron la producción de propóleo en campo utilizando el método de raspado y concluyen que esta técnica, disminuye la producción y afecta la calidad del producto.

Las características físicas de los propóleos están relacionadas con la fuente vegetal de donde las abejas recolectan la resina. El color que prevaleció en ambas muestras fue marrón con tintes verdes y se percibió un sabor amargo; el aroma del propóleo del EM fue balsámico, relacionado con la presencia de aceites esenciales de *Eucalyptus* sp. y *Pinus* sp. (Londoño, 2010; Sosa-López *et al.*, 2017). Para la muestra G, el aroma fue resinoso (olor a madera) por los aceites esenciales del mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), principal especie establecida en la proximidad del apiario (García-Andrade *et al.*, 2013).

c. Composición química

i. Prueba cualitativa para la detección de fenoles totales y flavonoides

Las pruebas cualitativas para la detección de fenoles totales y flavonoides en los propóleos, indicaron la presencia de estos metabolitos mayoritariamente en el EEP del EM, al observar una tonalidad de color negro para fenoles y una precipitación color anaranjado-amarillento para flavonoides. Para el EEP de G, las tonalidades fueron con menor intensidad para ambos metabolitos (Figura 19).

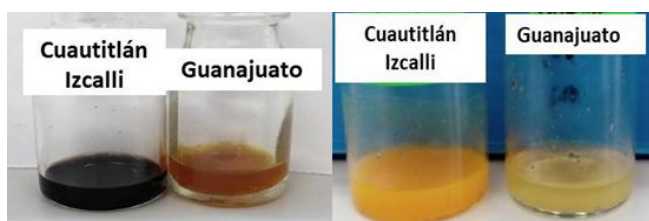


Figura 19. Identificación de fenoles totales (*Izquierda*) y flavonoides (*derecha*). (Rodríguez, 2019)

ii. Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides

La cuantificación de estos metabolitos en el propóleo, es un parámetro importante que determina la calidad de su actividad biológica; por ello, la norma mexicana de calidad de propóleo, NOM-003-SAG/GAN-2017, establece valores mínimos de aceptación, superior al 5% para compuestos fenólicos y al 0.5% para flavonoides.

Los resultados de estas valoraciones se muestran en el Cuadro 4, en donde se observa que ambos propóleos cumplen los requisitos de la norma. Las diferencias de las cantidades de fenoles y flavonoides en el propóleo están determinadas por la flora circundante al apiario, los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas, técnica de recolección o factores climatológicos (Soto-Vázquez, 2015).

Cuadro 4. Perfil químico de los extractos etanólicos de propóleos y las chalconas sintetizadas

Muestra	% Fenoles	% Flavonoides	Índice de oxidación (segundos)	Capacidad antioxidante media (CA₅₀) (µg/mL)
EEP Edo. de México	12.9 ± 0.0008	5.4 ± 0.0008	100.3 ± 2.08	1.7 ± 0.08
EEP Guanajuato	7.5 ± 0.002	1.8 ± 0.74	193.7 ± 9.5	2.4 ± 0.54
Chalcona PLCR-1	4.1	2.6 ± 0.005	294.7 ± 6.03	284 ± 13.0
Chalcona PLCR-2	56.8	2.7 ± 0.008	122.3 ± 5.57	39.1 ± 4.30
Chalcona PLCR-3	69.5	1.7 ± 0.017	223.0 ± 7.55	121.0 ± 4.4
				Quercetina: 2.7 ± 1.54
Parámetros de la NOM	Mínimo 5%	Mínimo 0.5%	Máximo 22 s	Hasta 100 µg/mL

*Los valores representan la media de tres repeticiones ± desviación estándar

iii. Propiedades antioxidantes

Por otro lado, la cantidad de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del propóleo están relacionadas entre sí. Una determinación rápida de esta actividad, es el índice de oxidación para detectar la presencia de compuestos de naturaleza fenólica, o con grupos funcionales oxidables (Delgado *et al.*, 2015) al utilizar permanganato de potasio (KMnO₄) como agente oxidante de color violeta intenso, que se vuelve incoloro al reducirse

el catión Mn^{7+} a Mn^{4+} en una solución ácida (Figura 20) (Solomons, 2012; Skoog, 2015; Palomino *et al.*, 2010). Los resultados muestran que ninguna muestra cumple con lo establecido en la norma de calidad mexicana (mínimo 22 s), al obtener tiempos con rangos de 100 a 193 s, observando diferencias significativas entre los propóleos.

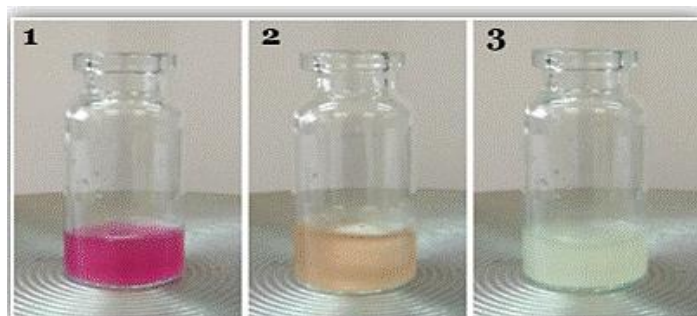


Figura 20. Determinación del índice de oxidación. 1) Color del permanganato de potasio al adicionar a las muestras de propóleos. 2) Decoloración parcial. 3) Decoloración total.

Para la capacidad antioxidante (CA_{50}), se emplea el radical DPPH• monitoreando su reducción por un antioxidante con la disminución en la absorbancia y cambio de coloración de morado a amarillo. Los resultados de la capacidad antioxidante de las muestras cumplen los requisitos de la norma de calidad con valores por debajo de los 100 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica la presencia de compuestos antioxidantes.

En los últimos años, diversas investigaciones han destacado al propóleo como un antioxidante de origen natural, para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades de origen oxidativo (Farré *et al.*, 2004) como aterosclerosis (Fang *et al.*, 2013), cáncer (Hernández *et al.*, 2007), diabetes mellitus (Rivera *et al.*, 2017), hipertensión arterial y daño renal (Teles *et al.*, 2015), enfermedades hepáticas (Elejalde, 2001), por su capacidad de inhibir radicales libres y por quelación de iones metálicos (Geckil, *et al.*, 2005).

La cantidad de flavonoides con grupos hidroxilo en los anillos A y B presentes en el propóleo del EM, está relacionada con una mayor capacidad antioxidante como lo indican Zavaleta *et al.*, (2005), contrario al propóleo G que al no contener una cantidad superior de flavonoides, tiene menor actividad antioxidante. De las chalconas sintetizadas, la chalcona PLCR-2, presentó una mejor actividad antioxidante por sus características estructurales similares a la quercetina (por presentar mayor número de grupos hidroxilo en los anillos A y C) y tuvo el mayor efecto antioxidante (Cuadro 4). La presencia de hidroxilos adicionales y

la hidrogenación del doble enlace en las chalconas han demostrado actividad potente como antioxidantes como lo reporta Mora (2011).

La quercetina es uno de los flavonoides con mayor potencial antioxidante, que le permiten tener una acción inhibitoria contra los radicales hidroxilo y superóxido, principales inductores de la peroxidación de lípidos, y sus principales dotes estructurales se atribuyen a la presencia en el anillo B de la estructura catecol u *orto*-dihidroxi; la presencia de un doble enlace en la posición 2,3 en el anillo C y la presencia de un grupo hidroxilo en las posiciones 3 y 5 son relevantes (Limón *et al.*, 2010; Quiñones, 2012; Vargas *et al.*, 2014), Figura 21.

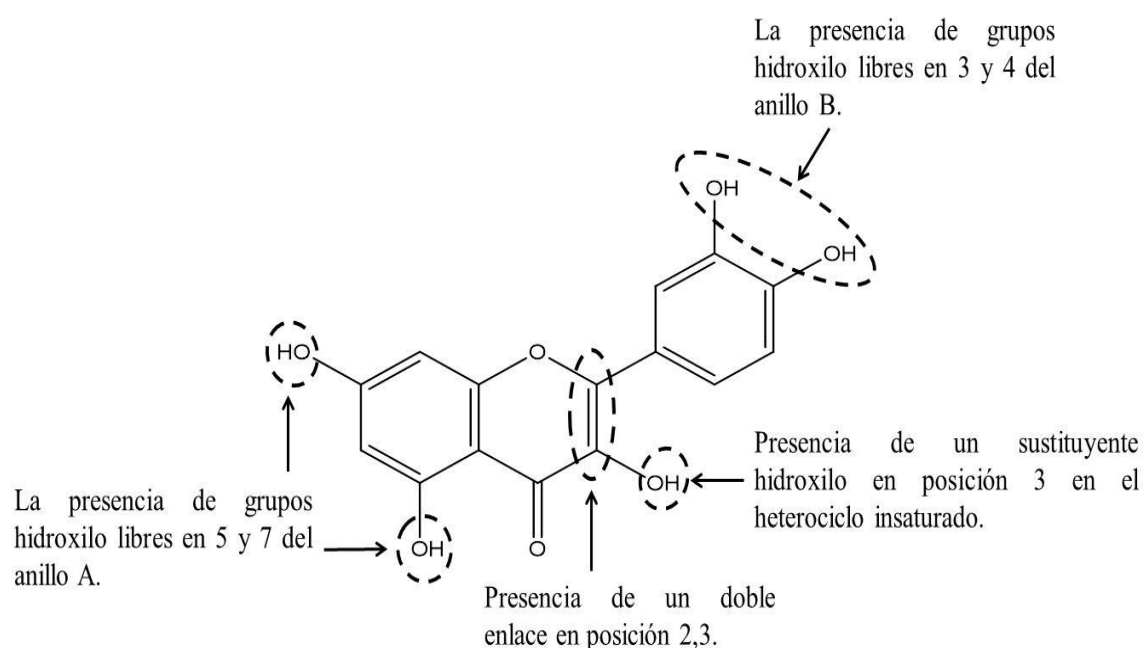


Figura 21. Características estructurales de la quercetina para ejercer un efecto antioxidante (Tomada y modificada de Martínez, 2005)

d. Caracterización química

Las técnicas cromatográficas permitieron la detección de flavonoides como la pinocembrina, el kaempferol, la crisina y la quercetina en el propóleo del EM (Cuadro 5, Figuras 22 y 23), compuestos identificados también por González-Búrquez *et al.*, (2018) en un propóleo recolectado en Octubre del 2014 del mismo apiario y que han sido detectados en muestras provenientes de álamos (Lugo *et al.*, 2006); también se identificaron ácidos alifáticos (palmítico y oleico) que se encuentran presentes en las ceras (Vargas *et al.*, 2014).

En el propóleo del Estado de México se detectó mayoritariamente a la pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona) flavonoide que ha sido aislado de *Pinus* sp y *Eucalyptus* sp y que presenta actividades biológicas como actividad antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, entre otros (Rasul *et al.*, 2013).

Se han realizado varios estudios de cromatografía a propóleos del mismo apiario del Estado de México, detectando pinocembrina en diferentes porcentajes con base a la fecha de la cosecha (Londoño, 2010; Rodríguez, 2015; González-Búrquez *et al.*, 2018; Flores, 2016). Lugo-Sepúlveda *et al.*, (2009) reportó la presencia de pinocembrina en propóleos de Sonora que han sido estudiados por su gran poder anticancerígeno al tener un gran potencial antioxidante, siendo la principal fuente botánica la Yerba blanca (*Encelia farinosa*).

Cuadro 5. Constituyentes del propóleo del Estado de México detectados por Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas

Pico	TR (minutos)	% Abundancia	Compuesto propuesto por la base de datos
1	23.707	5.539	Ácido palmítico
2	25.094	2.983	2-Nonadecanona
3	25.801	3.529	Ácido oleico
4	29.594	68.094	Pinocembrina

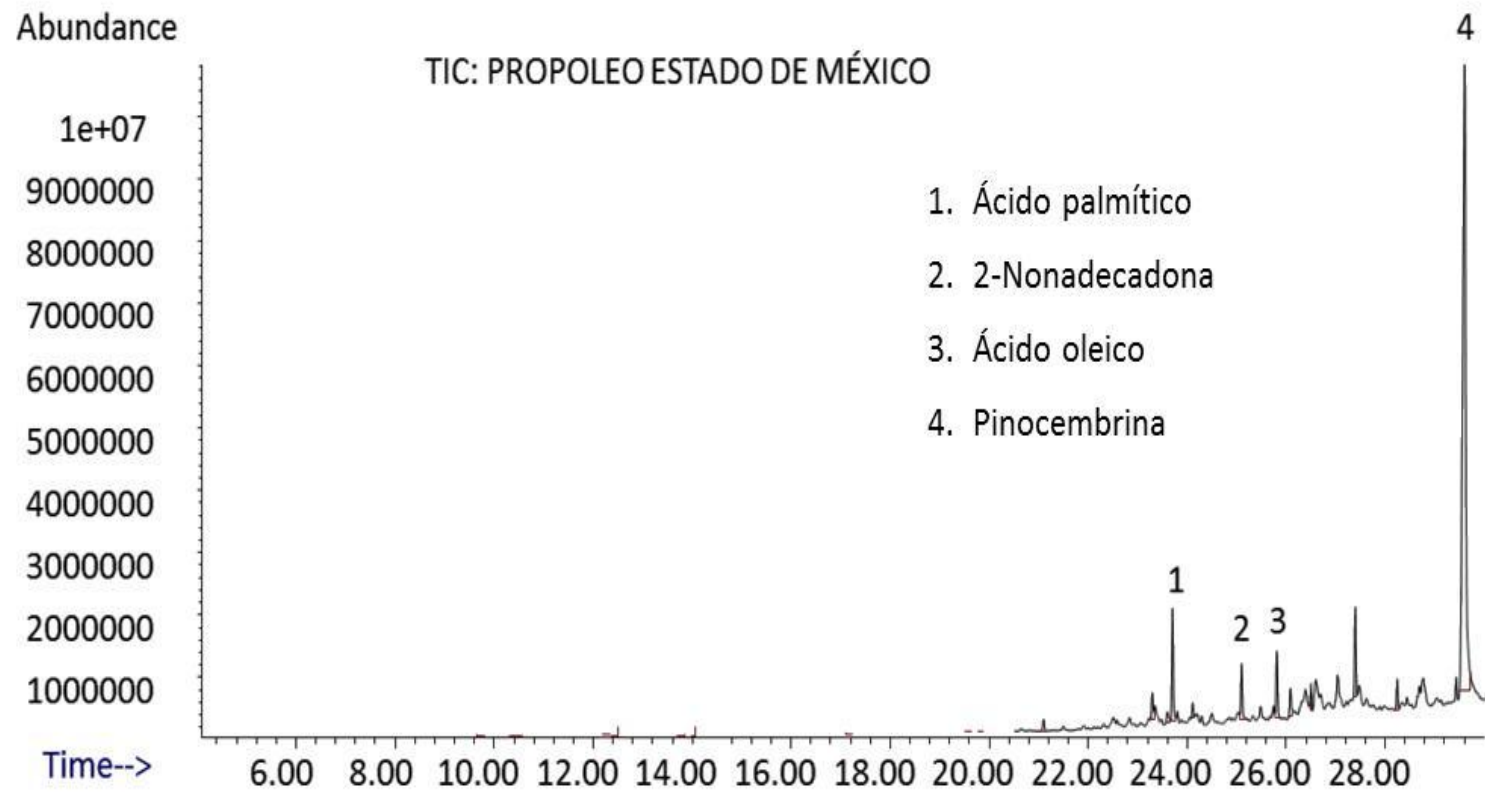


Figura 22. Cromatograma del propóleo del Estado de México por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

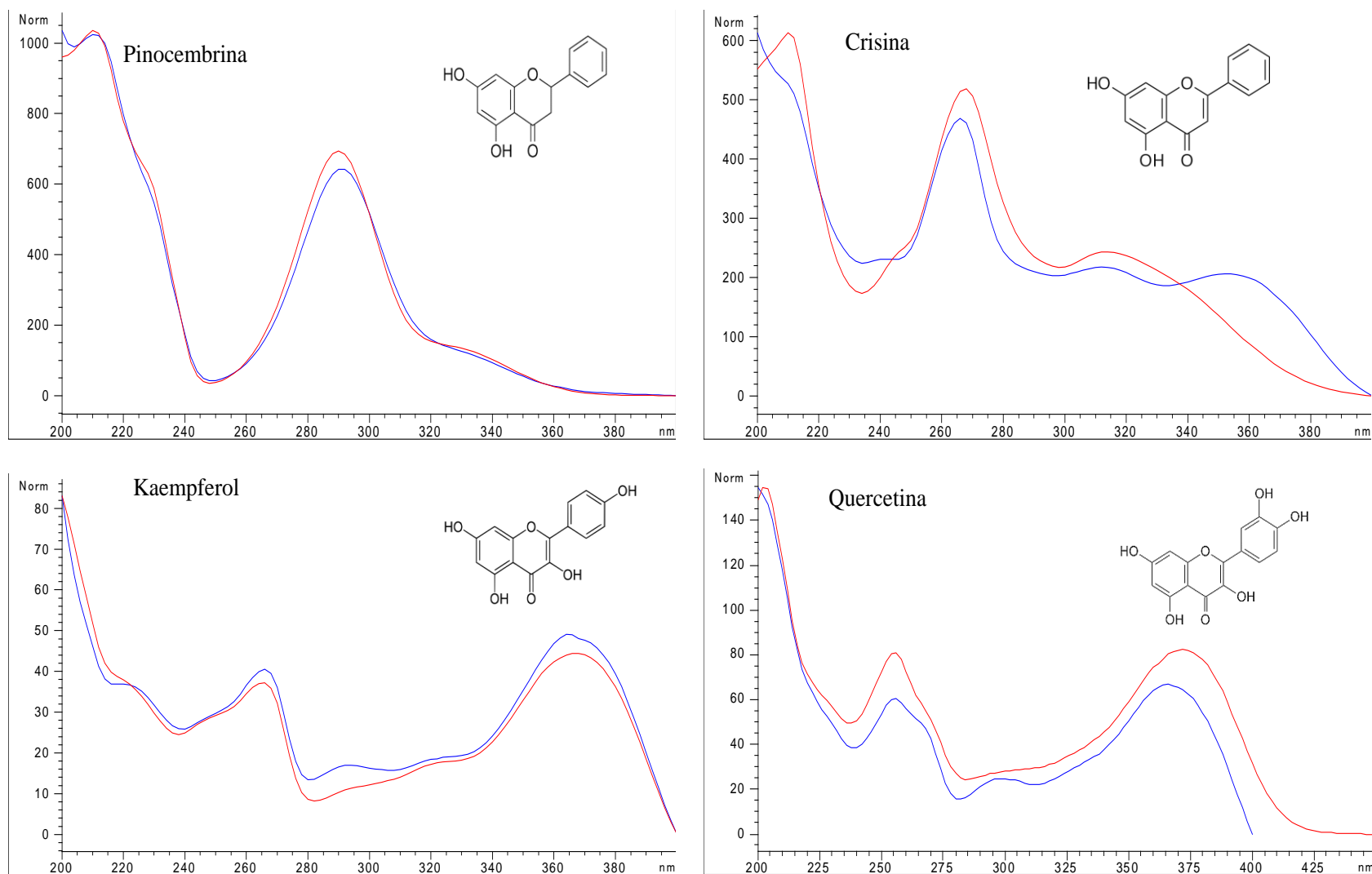


Figura 23. Espectros de absorción UV-Vis de los flavonoides detectados en el propóleo del Estado de México por HPLC-DAD y estructuras químicas entre 200 y 425 nm. Línea roja: el espectro de absorción del estándar, línea azul: espectro de la muestra

Para el propóleo de Guanajuato, la técnica de CG-EM apoyó a la identificación de constituyentes de un aceite esencial, (*E*)- α -Damascona, observando la ausencia de flavonoides (Figura 24). En la técnica de HPLC-DAD no hubo coincidencias entre lo detectado y la base de datos del equipo.

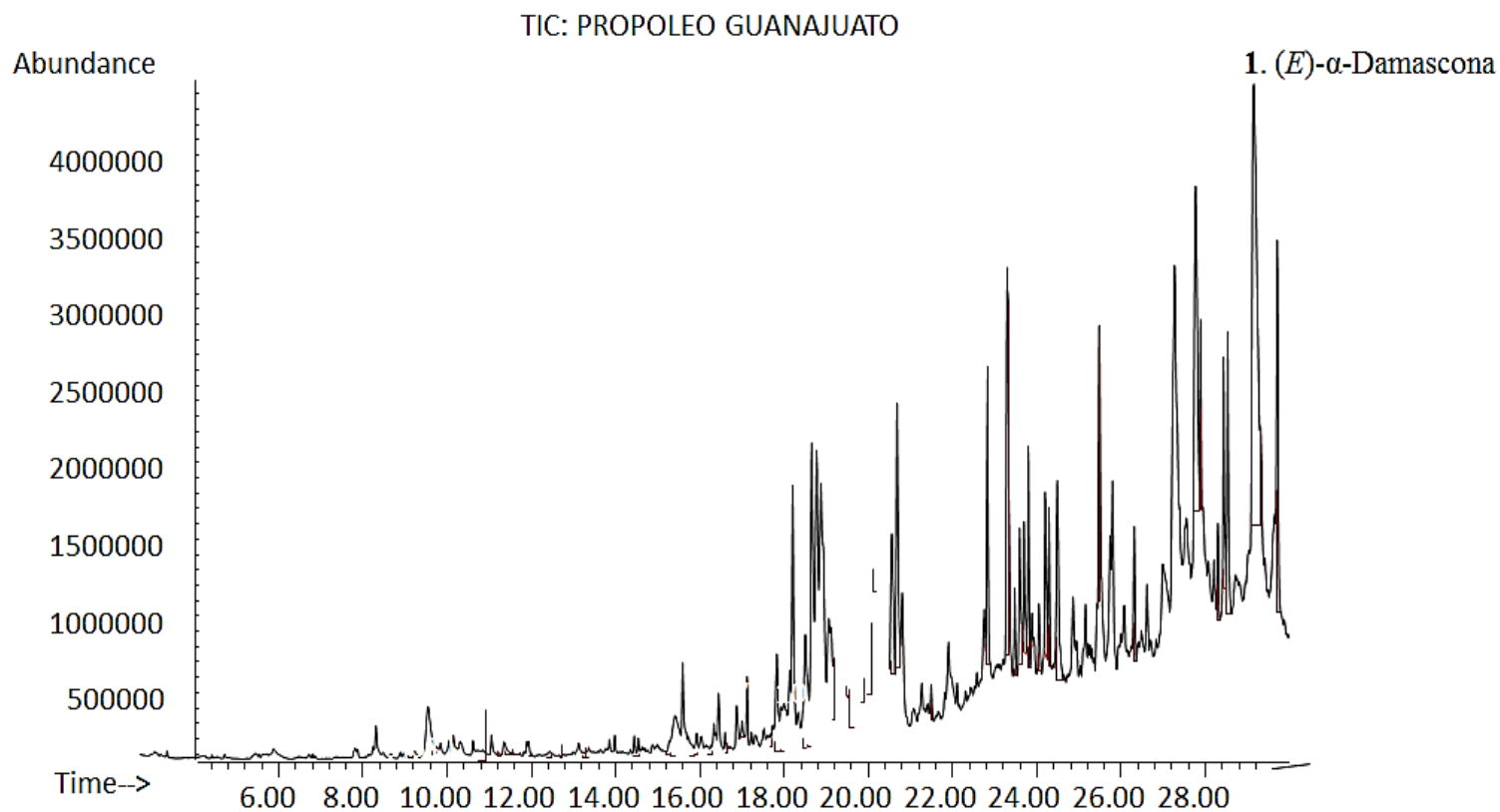


Figura 24. Cromatograma del propóleo de Guanajuato por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

e. Evaluación de la actividad antimicrobiana de estándares de flavonoides

Los flavonoides puros de marca comercial, quercetina, pinocembrina, crisina y naringenina, no presentaron efecto antibacteriano ni antifúngico, al probarlos de manera individual y en mezcla en las cantidades utilizadas.

Investigaciones realizadas sobre la acción antimicrobiana de sustancias individuales aisladas del propóleo, muestran que un solo componente no tiene mayor actividad que el total del extracto, sugiriendo sinergismo entre los compuestos flavonoides y terpenos, condicionado por su excepcional riqueza en principios activos naturales, que superan los 150 constituyentes (Lozina *et al.*, 2005; Peña, 2008; Álvarez, 2012).

f. Actividad antibacteriana de los extractos de propóleos

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana, de los extractos de propóleos de forma individual, se muestran en el Cuadro 6. Se observa diferencia significativa entre los halos de inhibición de los testigos positivos y las muestras estudiadas.

Los propóleos muestran diferente actividad antimicrobiana y es atribuido a la compleja composición de la resina, como lo mencionan Hegazi *et al.* (2014), pues se observa que ambos extractos de propóleos inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, sin presentar actividad sobre *E. coli*.

Los resultados concuerdan a lo reportados por Sagdic *et al.*, (2007) y Akca *et al.*, (2016) observando la sensibilidad de las bacterias Gram positivas y resistencia de las bacterias Gram negativas frente a los extractos de propóleo. El mecanismo de acción de los propóleos ha sido explicado por estudios del efecto bacteriostático y bactericida de flavonoides, ácido caféico, ácido benzoico y ácido cinámico, principalmente, sobre la estructura bacteriana por la alteración en los canales iónicos a consecuencia de reacciones de fosforilación y desfosforilación, disminuyendo la motilidad bacteriana, factor importante en la virulencia, y que ha sido demostrado por Mirzoeva *et al.*, (1997) y Farnesi *et al.*, (2009).

Por otro lado, las chalconas PLCR-2 y PLCR-3, de forma individual, presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ambas bacterias, siendo más efectiva la PLCR-2.

En el caso de las chalconas, se tienen resultados que apoyan lo descrito por Wang *et al.* (2018), el grupo carbonilo α,β -insaturado, la posición y la cantidad de los grupos hidroxilo que presentan los anillos aromáticos, son factores importantes provocan también alteración en la estructura de bacterias como *S. aureus* (Mora, 2011), *E. coli* y *P. vulgaris* (Desai *et al.*, 2003).

Cuadro 6. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos y chalconas

Halos de inhibición (mm)		
Sustancias evaluadas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
Amikacina (30 µg)	9.8 ± 0.8 ^a	17.0 ± 0.6 ^a
Ampicilina (10 µg)	0.0	0.0
Cefalotina (30 µg)	0.0	0.0
Ceftriaxona (30 µg)	0.0	25.0 ± 1.0 ^b
Cloranfenicol (30 µg)	12.0 ± 0.6 ^b	28.0 ± 0.6 ^b
Dicloxacilina (1 µg)	8.5 ± 0.5 ^c	0.0
Enoxacina (10 µg)	0.0	0.0
Eritromicina (15 µg)	0.0	0.0
Gentamicina (10 µg)	10.0 ± 0.6 ^d	14.0 ± 1.0 ^c
Netilmicina (30 µg)	0.0	18.0 ± 0.6 ^{a,d}
Penicilina (10 U)**	0.0	0.0
Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 µg)	0.0	30.0 ± 0.6 ^b
Etanol al 70%	0.0	0.0
EEP Estado de México	12.0 ± 0.0 ^b	0.0
EEP Guanajuato	12.0 ± 0.6 ^b	0.0
PLCR-1	0.0	0.0
PLCR-2	14.3 ± 0.6 ^c	12.0 ± 0.6 ^d
PLCR-3	9.7 ± 0.6 ^a	10.0 ± 0.6 ^f

* Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3. (p < 0.05); ** No se especifica el tipo de Penicilina.

g. Actividad antifúngica de los extractos de propóleos

i. *Candida albicans*

Los resultados de la actividad antifúngica de las muestras estudiadas, se muestran en el Cuadro 7. El ketoconazol es un antifúngico que inhibe la ruta biosintética del ergosterol, componente lipídico de la membrana fúngica y probado clínicamente (Tapia, 2005), se observó la sensibilidad de la levadura frente a este fármaco.

Los EEP no inhibieron el crecimiento de la cepa de referencia, pero existen estudios previos que indican que propóleos obtenidos del mismo apiario en distintas épocas, presentan efecto fungicida y fungistático en cepas de referencia y muestras de aislamientos clínicos de *C. albicans* (Quintero-Mora *et al.*, 2008), por lo que es necesaria una evaluación utilizando este tipo de muestras para corroborar los resultados. La levadura presentó sensibilidad frente a las tres chalconas, sin diferencias significativas entre los halos de inhibición. Se ha reportado que la actividad antifúngica de las chalconas es por factores como la presencia del grupo carbonilo α,β -insaturado; la posición y la cantidad de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos A y B (Kulkarni *et al.*, 2009) y la sustitución de la cetona y el doble enlace C=C (enona) que se une al grupo tiol de las glicoproteínas de la pared fúngica, provocando la inhibición en la síntesis de 1,3- β -D-glucano y de la glutatión-S-transferasa (Guerrero, 2016; Lopez *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2009).

Cuadro 7. Actividad antifúngica de extractos de propóleos frente a *Candida albicans*

	Halo de inhibición (mm)
Ketoconazol	24 \pm 1.0 ^a
Alcohol etílico al 70 %	0.0
EEP Estado de México	0.0
EEP Guanajuato	0.0
PLCR-1	12.0 \pm 1.0 ^b
PLCR-2	9.3 \pm 1.5 ^b
PLCR-3	11.3 \pm 0.6 ^b

*Cada valor es la media \pm desviación estándar, n = 3. (p < 0.05)

ii. *Aspergillus flavus*

Los resultados de la actividad antifúngica frente a este hongo se muestran en el Cuadro 8. Se observó la sensibilidad del hongo frente al voriconazol, antifúngico triazólico de segunda generación, utilizado para mejorar el pronóstico de las aspergilosis invasoras (Tapia, 2005) y también presentó a sensibilidad a la chalcona PLCR-2.

Cuadro 8. Prueba de inhibición del crecimiento radial de los extractos de propóleos frente a *Aspergillus flavus*

	Halo de inhibición (mm)
Voriconazol (1 µg)	18 ^a
Alcohol etílico al 70 %	0.0
EEP Estado de México	0.0
EEP Guanajuato	0.0
PLCR-1	0.0
PLCR-2	10 ^b
PLCR-3	0.0

*Cada valor es la media \pm desviación estándar, n = 3. (p < 0.05).

h. Ensayo de potencialización para bacterias

Los resultados de la evaluación de la potencialización de la actividad antibacteriana para *S. aureus*, se muestran en el Cuadro 9, resaltando en gris los mejores resultados obtenidos. Los resultados de los testigos negativos y positivos se muestran en el Cuadro 5. El efecto del extracto del EM sobre *S. aureus* se potencializó al adicionar las chalconas hidroxisustituidas, siendo más efectiva la PLCR-3 en proporción 1:1 y 1:5, al presentar un halo de inhibición de 14 mm, superior al obtenido por el extracto de 12 mm y por la chalcona de manera individual, 9.7 mm.

El efecto del EEP de G sobre esta bacteria, se presentó al adicionar la PLCR-3 en proporción 1:1, con un incremento en el diámetro del halo de inhibición (14 mm).

Cuadro 9. Halos de inhibición (mm) mostrados por el efecto inhibitorio de la mezcla de extractos etanólicos y chalconas frente a *Staphylococcus aureus*

EEP	Chalcona	EEP + Chalcona				
EEP EM 12.0 ± 0.0		EEP EM + PLCR-1				
	PLCR-1	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0 ± 1.0
		EEP EM + PLCR-2				
	PLCR-2	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	14.3 ± 0.6	9.7 ± 0.6 ^a	11.0 ± 1.0 ^a	0.0	0.0	10.0 ± 0.0 ^a
		EEP EM + PLCR-3				
	PLCR-3	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	9.7 ± 0.6	13.7 ± 1.2 ^a	7.3 ± 0.6 ^b	10 ± 0.0 ^c	10 ± 0.0 ^c	14.0 ± 1.0 ^a
EEP G 12.0 ±0.6		EEP G + PLCR-1				
	PLCR-1	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	0.0	0.0	0.0	0.0	9.7 ± 0.6 ^a	9.3 ± 0.6 ^a
		EEP G + PLCR-2				
	PLCR-2	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	12.0 ± 0.6	11.3 ± 1.2 ^a	0.0	0.0	0.0	7.0 ± 1.0 ^b
		EEP G + PLCR-3				
	PLCR-3	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	10 ± 0.6	14.0 ± 1.0 ^a	7.3 ± 0.6 ^b	8.0 ± 0.0 ^b	11.3 ± 0.6 ^c	11.0 ± 1.0 ^c

* Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3.

En el caso de la muestra del EM frente a *E. coli*, se presentan halos de inhibición con la adición de las chalconas hidroxisustituidas, pero no que son superiores al que presentan las chalconas de manera individual, presentándose un posible efecto antagónico.

No se presentó potencialización con el propóleo G frente a *E. coli*, únicamente se presentó un halo de inhibición en la mezcla EEP G + PLCR-2 en proporción 1:1, sin diferencia significativa al halo generado por la chalcona, como se observa en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Halos de inhibición (mm) mostrados por el efecto inhibitorio de la mezcla de extractos etanólicos y chalconas frente a *Escherichia coli*

EEP	Chalcona	EEP + Chalcona				
EEP EM 0.0		EEP EM + PLCR-2				
	PLCR-2	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	14.3 ± 0.6	10.3 ± 0.6 ^a	9.3 ± 0.6 ^a	0.0	9.7 ± 0.6 ^a	0.0
		EEP EM + PLCR-3				
	PLCR-3	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	9.7 ± 0.6	0.0	8.7 ± 0.6	0.0	0.0	0.0
EEP G 0.0		EEP G + PLCR-2				
	PLCR-2	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
	12.0 ± 0.6	12.3 ± 0.6	0.0	0.0	0.0	0.0

* Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3; (p < 0.05)

i. Ensayo de potencialización para hongos

Candida albicans.

La evaluación de la potencialización de la actividad antifúngica para la levadura se muestra en el Cuadro 11. Los resultados de los testigos negativos y positivos se muestran en el Cuadro 7. La muestra del EM puede presentar o no, el efecto inhibitorio en el crecimiento de *C. albicans* con base a la chalcona adicionada y la proporción evaluada; sin embargo, la adición de la chalcona PLCR-2 en proporción 1:5, provocó un mayor halo de inhibición (15.7 mm) que el halo de inhibición de la chalcona por sí sola (9.3 mm), considerando que el efecto no es particularmente por la chalcona ya que se encuentra en menor proporción.

La mezcla del EEP G con la chalcona PLCR-3 presentó un antagonismo en todas las proporciones observando el crecimiento de la levadura. Con la PLCR-1, no existió diferencia significativa entre el diámetro de los halos de inhibición (7.0 mm) de las

proporciones evaluadas, pero sí, con el halo de inhibición de la chalcona (12 mm). La adición de la chalcona PLCR-2 en la proporción 1:1 presentó mejor actividad antifúngica con un halo de inhibición mayor (12.3 mm) , al que genera la chalcona por sí sola (12.0 mm).

Con lo anterior se demostró que la adición de la chalcona PLCR-2 a ambos EEP, tiene mejor efecto de inhibición para *C. albicans*. Se puede proponer que la estructura química de esta chalcona, al presentar mayor número de sustituyentes hidroxilo provocan la alteración de los componentes de la pared celular y la potencialización de la actividad antifúngica, siendo necesarios estudios que comprueben esta hipótesis.

Cuadro 11. Actividad antifúngica de extractos de propóleos y potencialización de la actividad con chalconas PLCR-1-3 frente a *Candida albicans*

Prueba de potencialización						
Halo de inhibición (mm)						
Proporción evaluada	PLCR-1		PLCR-2		PLCR-3	
	EM	G	EM	G	EM	G
1:1	0.0	7.0 ± 1.7 ^a	10.3 ± 0.6 ^a	11.3 ± 1.2 ^a	0.0	0.0
1:2	0.0	7.3 ± 0.6 ^a	0.0	0.0	8.0 ± 0.0	0.0
1:3	11.3 ± 0.6 ^a	7.0 ± 0.0 ^a	0.0	0.0	0.0	0.0
1:4	0.0	7.0 ± 0.0 ^a	0.0	0.0	0.0	0.0
1:5	9.0 ± 1.0 ^b	0.0	15.7 ± 0.6 ^b	7.0 ± 1.0 ^b	0.0	0.0

*Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3. (p < 0.05)

Aspergillus flavus.

Los resultados del ensayo de potencialización para las dos muestras de propóleos demostraron que la adición de la chalconas PLCR-2 y PLCR-3 en diferentes proporciones, incrementan la sensibilidad del hongo. Los resultados de los testigos negativos y positivos se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 12. Prueba de potencialización de la actividad de chalconas sintetizadas PLCR 1-3 frente a *Aspergillus flavus*

Prueba de potencialización						
Halo de inhibición (mm)						
Proporción evaluada	PLCR-1		PLCR-2		PLCR-3	
	EM	G	EM	G	EM	G
1:1	0.0	0.0	0.0	7.0 ± 0.6 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	0.0
1:2	0.0	0.0	5.0 ± 0.6 ^a	0.0	0.0	0.0
1:3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1:4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1:5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

*Cada valor es la media ± desviación estándar, n = . (p < 0.05).

Se observó que los dos hongos estudiados presentan una resistencia frente a los dos EEP y el *A. flavus* a las chalconas PLCR-1 y PLCR-3.

Existen estudios que reportan el mecanismo de acción de la resistencia de hongos a nuevos compuestos, como son la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior, que impiden alcanzar la diana dentro de la célula; cambios en la interacción fármaco-diana debida a mutaciones, y modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas de la síntesis del ergosterol.

Por lo anterior, es necesaria la realización de pruebas más específicas a nivel molecular para poder elucidar la resistencia microbiológica y clínica como lo menciona Pfaller (2012), aunado a la preocupación en el uso masivo de azoles en la agricultura, que podría favorecer la aparición de cepas resistentes y modificar la población de hongos que infectan al ser humano (Mellado *et al.*, 2002).

Para el caso de los propóleos, en México se han realizado estudios de la composición química y del efecto antifúngico del propóleo del Estado de México proveniente de la FES Cuautitlán contra cepas de *C. albicans* y, por medio de microscopía electrónica, se demostró la inhibición del tubo germinativo y cambios en la pared celular con sitios de gemación irregulares, provocados por compuestos como el ácido cafeico, flavonoides y

ésteres fenólicos (Londoño *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Quintero-Mora *et al.*, (2011) se concluyó que en *C. albicans*, utilizando RT-PCR Tiempo real, se afectan los genes ADH1 y PIK1 que están relacionados con los cambios la inhibición de la formación del tubo germinativo, la formación de blastoconidias y el cambio morfogénico de la levadura.

8 CONCLUSIONES

- La actividad antimicrobiana de los propóleos se determina por la presencia y cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides, que si se encuentran en bajas cantidades o ausentes, la actividad es baja o nula; pero con la adición de precursores de flavonoides denominados chalconas, se observó la potencialización del efecto antimicrobiano que está en relación al microorganismo evaluado y la proporción utilizada entre el EEP y la chalcona.
- La chalcona sintética que presentó en su estructura química mayor número de sustituyentes hidroxilo en los anillos A y B, denominada PLCR-2, mejoró la potencialización del efecto frente a *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*.
- La chalcona PLCR-3 fue más efectiva para potencializar el efecto antibacteriano de los extractos de propóleo frente a *Staphylococcus aureus*.
- Al potencializar la actividad antimicrobiana de este producto apícola, podrá brindar al apicultor la creación de nuevos nichos en el mercado nacional al utilizar los propóleos como materia prima analizada bajo normativas de calidad y asegurando la calidad del producto.

9 PROSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Establecer las concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas y fungicidas de cada extracto de propóleo, de las chalconas y de las combinaciones entre chalcona:EEP.
2. Evaluar la citotoxicidad de las chalconas estudiadas.
3. Ampliar la investigación del mecanismo de acción de la relación chalcona:propóleo, a través de estudios de microscopía electrónica, estudios genéticos y moleculares, entre otros.
4. Considerando que este estudio es el pionero en la adición de chalconas sintetizadas a extractos etanólicos de propóleos para incrementar su actividad antibacteriana y su utilización como tratamiento complementario para infecciones por diferentes bacterias, es importante realizar el estudio con cepas de aislamientos clínicos con el propósito de evaluar la resistencia antimicrobiana a nuevos compuestos.
5. Realizar pruebas piloto para implementar la adición de chalconas a propóleos de baja actividad y evaluar el costo-beneficio de este ensayo.

10 REFERENCIAS

- Abarca, M. L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S79-S84.
- Akca, A., Akca, G., Toksoy, F., Macit, E., Pıkdöken, L., Özgen, I. 2016. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An *In Vitro* Study. *BioMed Research International*. 2016: 3627463.
- Álvarez M, S. 2012. Caracterización organoléptica y físico-química de propóleos del Departamento de la Libertad, Perú. *The Biologist*. 10(1):34-40
- Alves, F. E., Guzmán, D., Figueroa, J., Tello, J. y De Oliveira, D. 2011. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: apidae) de la región Andina Colombiana. *Acta Biológica Colombiana*. 16: 175-184.
- Ávalos García, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolitos secundarios de las plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*. 2:119-145.
- Barrón-Yáñez, R., García-Mateos, M., Soto-Hernández, M., Colinas-León, T. y Kite, G. 2011. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34(3):151-157.
- Bedascarrasbure, E. 2006. Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de componentes y propiedades químicas. Argentina: Magna.
- Blanco, M., Dip, A., Torres, E., Peña, D., Vogel, C., Bullaín, M. y Fajardo, L. 2016. Actividad antibacteriana *in vitro* de nuevas chalconas halogenadas. *Química Viva*. 15 (2):17-28.
- Bonifaz, A. 2012. *Micología Médica Básica*. México: McGraw Hill.
- Bogdanov, S. 2012. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. Recuperado el 15 de junio de 2012 de <http://www.bee-hexagon.net>
- Bucio, C., Navarro, F., Martínez, O., Torres, J. y García, E. 2016. Producción de propóleo en campo, recolectado por las abejas productoras de miel (*Apis mellifera*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1): 515-520.

- Cervantes, G. E., García, G. R. y Salazar, S. P. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 61(1):28-40.
- Chaván, B. B., Gadekar, A. S., Mehta, P. P., Vawhal, P. K., Kolsure, A. K. y Chabukswar A. R. 2016. Synthesis and Medicinal Significance of Chalcones: A Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 6(56): 01-07.
- Cheng, A., Han, X., Wu, Y. y Lou, H. 2014. The Function and Catalysis of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases Involved in Plant Flavonoid Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 15:1080-1095.
- Chetana, P., Mahajan, K. y Suvarna, K. 2009. Chalcone: A Versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 1(3): 11-22.
- Chil, N., Pavón, S., Galvéz, H., Cuéllar, C. y Ávila, B. 2002. Estudio de algunos parámetros para la caracterización del extracto blando de propóleos procedente de la región de Manzanillo como materia prima para la industria nacional. *Revista Cubana de Química*. XIV:34 - 41.
- CLSI/M26A. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents [En línea] Disponible en: https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2018.
- CLSI/M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Method for antifungal [En línea] Disponible en: https://clsi.org/media/1634/m44a2_sample.pdf. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2018.
- Debarshi, K. M. y Sanjay, K. B. 2016. Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sciences*. 148:154–172.
- Delgado, M., Andrade, J. y Ramírez, C. 2015. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 6(28):74-87.
- Desai, J. y Desai, R. 2003. Synthesis and Antibacterial Activity of chalcona and 2-Amino Pyrimirine and their Related Compound. *Asian Journal of Chemistry*. 15(2):650-654.

- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Reigosa, J. y Sánchez-Moreiras, A. 2016. Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha, Viçosa-MG*. 3(3):607-616.
- Díaz, S. C. y López, V. A. 2004. *Aspergillus* y pulmón. *Arch Bronconeumol*. 40(3):114-122.
- Dobrowolski, J., Vohora, S., Sharma, K., Shah, S., Naqvi, S. y Dandiya, P. 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*. 35(1):77-82.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2017. Norma Oficial Mexicana: Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. NOM-003-SAG/GAN-2017. Tomo DCCLXIX (6). 27-35.
- Elejalde, J. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidante. *Anales de Medicina Interna*. 18(6):326-335.
- Espina, S. M., Guillén, R. G., Calvo, B. y Meza, L. M. 2005. Caracterización morfológica y fisiológica de las especies *Candida* aisladas de la cavidad bucal de pacientes geriátricos. *Ciencia Odontológica*. 2(2):110-119.
- Falcone, M., Rius, S. y Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plants Science*. 222(3):1-15.
- Fang, Y., Sang, H., Yuan, N., Sun, H., Yao, S., Wang, J., y Qin, S. 2013. Ethanolic extract of propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Lipids in Health and Disease*. 12(123):1-6.
- Farnesi, A. P., Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J. K., y Soares, A.E.E. 2009. Effects of stingless bee and honeybee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*. 2:635-640.
- Farré, R., Frásquet, I. y Sánchez, A. 2004. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 45(1):21-43
- Figueroa-Pérez M. G., Romero-Gómez, S., Ramos-Gómez, M. y Reynoso-Camacho, R. 2016. Propiedades de los compuestos fenólicos para el control de la glucose. *DIGITAL CIENCIA@UAQRO*. 1-15.

- Flores, I., Moreno, M., Londoño, A. y Cruz, T. 2016. Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomycosis in Horses. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 6:1-8
- García-Andrade, M., González-Laredo, R., Rocha-Guzmán, N., Gallegos-Infante, J., Rosales-Castro, M. y Medina-Torres, L. 2013. Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*. 44(2013):336-342.
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S. y Yilmaz, I. 2005. Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1(1):27-31.
- González G., A. 1997. Propóleos: un camino hacia la salud. 1ª Ed. Pablo de la Torriente. La Habana, Cuba.
- Gimeno Creus, E. 2004. Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*. 23:80-84.
- González-Búrquez, M. J., González-Díaz, R. F., García-Tovar, C. G., Carrillo-Miranda, L., Soto-Zarate, C. I., Canales-Ramírez, M. M., Penieres-Carrillo, J. G., Cruz-Sánchez, T. A. y Fonseca-Coronado, S. 2018. Comparison between *In Vitro* Antiviral Effect of Mexican Propolis and Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018(7092416):1-9.
- Guerrero V., L. 2016. Estudio de la reactividad de chalconas como precursores en la síntesis de nuevos compuestos pirazolínicos, betalactámicos y tiazolidínicos fusionados. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Gutiérrez, R. Á. y Estévez, B. A. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*. 103:409-419.
- Hegazi, A., Abdou, A. M. y Allah, A. 2014. Egyptian Propolis 11: Its antimicrobial activity with comparison with different localities. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 3(9):530-538.

- Hernández, J., Goycoolea, F., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Domínguez, Z., Robles, R., Vázquez-Moreno, L., Velázquez, E., Astiazaran, H., Lugo, E. y Velázquez, C. 2007. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*. 73(14):1469-1474.
- Hernández-Zarate, M., Abraham-Juárez, M., Cerón-García, A., Gutiérrez-Chávez, D., Gutiérrez-Arenas, D. y Ávila-Ramos, F. 2017. Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de propóleos colectados en Guanajuato, México. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2(2017):607-612.
- Hormaza A., Arbeláez O., y Montes V., N. 2009. Synthesis and spectroscopic characterization of a series of chalcones. *Scientia et Technica*. XV (43):316-321.
- Insuasty-Obando, B. 2016. Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 40 (155):234-243.
- Kulkarni, B., Siva, A., Padmavathi, A. y Konda, R. 2009. 3D-QSAR Studies of antibacterial chalcones. *International Journal of ChemTech Research*. 1(3):717-721.
- Kuropatnicki, A., Szliszka E. y Wojciech, K. 2013. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013. 1-11.
- León González, V. (2012). Estudio químico de un propóleo recolectado en la zona rural del Distrito Federal, evaluación de su actividad antibacteriana contra bacterias patógenas orales. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E. y Guevara, J. 2010. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*. XXXIV: 143154. ISSN-0188-137X.
- Londoño, A. O. 2010. Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción. Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
- Londoño-Orozco, A., Penieres-Carrillo, J. G., García-Továr, C. G., Carrillo-Miranda, L., Quintero-Mora, M. L., García-Vásquez, S. E., Mendoza-Saavedra, M. A. y Cruz-

- Sánchez, T. A. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en Marcha*. 21(1):49-55
- López, N. S., Castelli, V. M., Zacchino, A. S., Domínguez, N. J., Lobo, G., Charris-Charris, J., Cortés, G. J., Ribas, C. J., Devia, C., Rodríguez, A. M. y Enriz, D. R. 2001. *In Vitro* Antifungal Evaluation and Structure-Activity Relationships of a New Series of Chalcone Derivatives and Synthetic Analogues, with Inhibitory Properties Against Polymers of the Fungal Cell Wall. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 9:1999–2013
 - Lotti, C., Campo, M., Piccinelli, A., Cuesta-Rubio, O., Márquez, I. y Rastrelli, L. 2010. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58: 2209-2213.
 - Lozano, G. E., López, G. O., Bocanegra, S. M., Davis, F. L., de la Cruz, F. L. y Cervantes, F. M. 2013. Interacción sinérgica de propóleo (Propolis) y orégano (*Lippia graveolens* Kunth s. l.) contra *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 44(4):73-78.
 - Lozina, L., Boehringer, S. y Acosta, O. 2005. Extrapolación en una forma posológica de valores obtenidos *in vitro* sobre actividad antifúngica del propóleos. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. Resumen: V-018.
 - Lozina, L., Peichoto, M., Acosta, O. y Granero, G. 2010. Estandarización y Caracterización organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 29:102-110.
 - Lugo, E., Goycolea, V. F., Hernández, J. y Velásquez, C. 2006. Pinocebrina, principal componente de propóleos sonorenses. *Invurnus*. 1(2):71-83.
 - Lugo-Sepúlveda, R., Martínez-Robinson, K., Morales, G., De la Rosa, R. y Noriega, J. 2009. Determinación del Origen Botánico de los Propóleos Sonorenses (CABORCA) Mediante HPLC. *Invurnus*. 4(2):24-30.
 - Mahapatra, D. y Bharti, S. 2016. Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sciences*. 148:154–172.
 - Martínez M., A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

- Martínez, M. 2013. Evaluación *in vitro* del efecto antimicótico del propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Matsuka, M. 2000. Criteria of propolis in Japan. Japan Propolis Conference. Tokio: Japan Health Food and Nutrition Food Association, 4.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J. L. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 20(10):523-530.
- Miguel, M., Nunes, S., Dandle, S., Cavaco, A. y Antunes, M. 2014. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology*. 34(1): 16-23.
- Mirzoeva, K., Grishanin, C. y Calder. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*. 152:239-246
- Mora, C. 2011. Modo de acción de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor de β -lactamasa: estudio cinético y caracterización inicial mediante espectrometría de masas. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Antioquía, Medellín.
- Morgado, E., Stock, D., García, F., Finger, D., Frankland, A., Nogueira, M., Felsner, M., Quináia, P., Chagas, M. y Reyes, Y. 2014. A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. *BioMed Research International*. 2014(257617):1-10.
- Palomino, L., Martínez, J., García, C., Gil, J. y Durango, D. 2010. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 63(1): 5373-5383.
- Panché, A., Diwan, A. y Chandra, S. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 5(47):1-15.

- Peña, R. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación Agraria*. 35(1):17-26.
- Peña, D., Vogel, C., Fajardo, L., Blanco, M., Bullaín, M. y Torres, E. 2016. Actividad antibacteriana *in vitro* de nuevas chalconas halogenadas. *Química Viva*. Agosto-Sin mes, 17-28.
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. y Bravo, J. 2014. Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*. 31(2): 68-81.
- Pfaller, M. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*. 125(1): S3-13.
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayoso, P., López-Martínez, R., Soto-Zarate, C. I., Carrillo-Miranda, L., Penieres-Carrillo, J. G., García-Tovar, C. G. y Cruz-Sánchez, T. A. 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25:22-26.
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Soto-Zarate, C. I., García-Tovar, C. G. Carrillo-Miranda, L., Penieres-Carrillo, J. G., y Cruz-Sánchez, T. A. 2011. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by Mexican propolis. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances *FORMATEX*. 1068-1072.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1):76-89.
- Ramírez, M., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A. y Silva, S. 2012. Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(4): 7-14
- Rasul, A., Millimouno, F., Eltayb, W., Ali, M., Li, J. y Li, X. 2013. Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International*. 2013(379850):1-9.
- Rippton, J. 2003. Micología médica: hongos y actinomicetos patógenos. 3ª Ed. McGraw-Hill. Ciudad de México, México.

- Rivera-Yáñez, N., Rodríguez-Canales, M., Nieto-Yáñez, O., Jiménez-Estrada, M., Ibarra-Barajas, M., Canales-Martínez, M. M. y Rodríguez-Monroy, M. A. 2018. Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018(4360356):1-10.
- Rivera, C., Terrazas, I., Jiménez, E., Campos, E., Flores, C., Hernández, B., Cruz, T., Garrido, G., Rodríguez, M. y Canales, M. 2017. Anti-*Candida* Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene-An *In Vitro* Study. *Molecules*. 22(12):1-13.
- Rodríguez, A. G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44(5):464-476.
- Rodríguez, R. B. 2015. Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México, México.
- Sagdic, O., Silici, S. y Yetim, H. 2007. Fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in apple juice treated with propolis extract. *Annals of Microbiology*. 57(3):345-348.
- Sapra, S., Sharma, K., Bhalla, Y. y Dhar, L. 2016. Chalconoid Derived Heterocycles as Potent Bioactive Molecules: A Review. *Journal of Chemical Sciences*. 7:129.
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21:355-363.
- Sforcin, J. y Bankova, V. 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*. 133:253-260.
- Singh, A. y Kumar, V. 2014. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European journal of Medicinal Chemistry*. 85:758-777.
- Sivakumar, P. M., Muthu, K. T. y Doble, M. 2009. Antifungal activity, mechanism and QSAR studies on chalcones. *Chemical Biology & Drug Design*. 74(1):68-79.
- Skoog, D., West, D., Holler, F.J. y Crouch, S. 2015. Fundamentos de Química Analítica. 9° ed. McGraw-Hill. Ciudad de México, México.

- Solomons, F. 2012. Química orgánica. 10^o ed. Limusa. Florida, USA.
- Sosa-López, Á., Cabrera, M. y Álvarez, M. 2017. Vegetación de origen como parámetro de caracterización microbiana de los propóleos. *Journal of the Selva Andina Biosphere*. 4(1):3-23.
- Soto-Vázquez, M. 2015. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. *In Crescendo. Institucional*. 6(2):22-32.
- Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I. y Švabić-Vlahović, M. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*. 158: 353–357.
- Tapia, C. 2005. Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. Programa de Microbiología y Micología. ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Teles, F., Machado, T., Pessoa, F., Honorato, V., de Oliveira, H., Fernandes, A., Gomes, S., Porfirio, Z., Braga, A., Lerner, R. y Fanelli, C. 2015. Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation Model. *PLoS One*, 10(1). e0116535.
- Tenorio, F., Mondragón, L. y Pastelín, G. 2006. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Archivos de Cardiología de México*. 76(4): 33-45.
- Tovalino, M., Sacsquispe, S., Ceccarelli, J. y Alania-Mallqui, J. 2012. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. *Revista Estomatológica Herediana*. 22:50-58.
- Trusheva B., Trunkova, D. y Bankova, V. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*. 1(13):1-4.
- Vargas, R., Torrescano, G., Mendoza, A., Vallejo, B., Acedo, E., Sánchez, J., Peñalba, M. y Sánchez, A. 2014. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotecnia*. XVI (1): 32-37.

- Velarde, E. y González, A. 1995. Reacción de Claisen-Schmidt para la obtención de chalconas. *Revista de Química*. IX. (2).
- Wang, T., Li, Q. y Bi, K. 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13:12-23.
- Yaqüe, A., Cebrián, L., Rodríguez, D., J., Gonzalo, J. N., Royo, G., Campillos, P. y López, L. J. 2005. Cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido: origen, características e incidencia en el sur de la provincia de Alicante en el período 1999-2003. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 23(2):76-9.
- Zavaleta, J., Muñoz, A., Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C. y Loja, B. 2005. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Acta Médica Sanmartiniana*. 1(1):81-85.
- Zendejas, G., Ávalos, H. y Soto, M. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomedica*. 25:129-143.

Potencialización de la actividad antifúngica de propóleos mexicanos con la adición de chalconas sintetizadas

Potentialization of the Mexican propolis antifungal activity by the addition of synthetic chalcones

Betsabé Rodríguez Pérez¹, José Guillermo Penieres Carrillo¹, María Margarita Canales Martínez², Ricardo Alfredo Luna Mora¹, Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez¹

¹ Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México. México. C.P. 54714.

² Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala Tlalnepantla, Estado de México. C.P. 54090.

RESUMEN

Actualmente muchos propóleos presentan un gran valor socioeconómico importante, debido a las diversas actividades biológicas que presentan, que son producidas por los componentes químicos existentes en ellos. Sin embargo, no todos los propóleos llegan a presentar actividad biológica considerable, ya que sus componentes no la propician y esto puede mejorarse con la adición de precursores de flavonoides como las chalconas.

En el presente trabajo, se informa acerca de la evaluación en la potencialización de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus flavus* de dos propóleos mexicanos, uno con buena actividad antimicótica (propóleo del Estado de México) y otro con baja actividad (propóleo del Estado de Guanajuato), mediante la adición a ellos de las chalconas 1,3-difenilpropil-2E-1-ona (PLCR-1), 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-2) y 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-3), en diferentes concentraciones de cada una y en combinaciones entre ellas, mediante la técnica de difusión en disco, siendo la chalcona PLCR-2 la que presentó los mejores resultados.

Palabras clave: propóleos mexicanos, actividad antifúngica, chalconas, potencialización.

ABSTRACT

Many propolis are considered of great socioeconomic value due to their various biological activities, which are produced by the chemical components present in them. However, not all propolis come to exhibit considerably biological activity, since its components don't propitiate it but this can be improved with the addition of flavonoids precursors such as chalcones. In the present work we report the evaluation in the antifungal activity potentialization against *Candida albicans* and *Aspergillus flavus* of two Mexican propolis, one with good antifungal activity (propolis from the state of Mexico) and the other with low activity (propolis from the state of Guanajuato). We added chalcones: 1,3-diphenylpropyl-2E-1-one (PLCR-1), 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-(2,4,6-trihydroxyphenyl) prop-2E-en-1-one (PLCR-2) and 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-

4-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2E-en-1-one (PLCR-3) each at different concentrations and combinations between them, by means of the disc diffusion technique. Our results indicate that chalcone PLCR-2 presents the best results.

Keywords: Mexican propolis, antifungal activity, chalcones, potentialization.

INTRODUCCIÓN

El aumento en la prevalencia de las micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los antifúngicos del tipo azoles, fármacos que son el pilar de la terapia antifúngica actual (Bader *et al.*, 2015) y los efectos secundarios que provocan éstos últimos en los pacientes, se ha observado cada vez más a nivel mundial; esto ha generado la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos que cumplan con los requerimientos de un antifúngico ideal (Quintero-Mora *et al.*, 2008). Los extractos etanólicos de propóleos poseen actividad fungicida y fungistática en diferentes especies de levaduras y hongos filamentosos, propiedad de importancia por ser una opción terapéutica económica y poco tóxica respecto a los antimicóticos tradicionales (Joya y Bastida-Pacheco, 2017). La inclinación del ser humano hacia el aprovechamiento de los productos naturales, se ha convertido en la actualidad en una opción insuperable para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades (Londoño-Orozco *et al.*, 2008).

Los propóleos, son una resina elaborada por las abejas *Apis mellifera* a partir de exudados de la vegetación circundante a la colmena y que la utilizan con fines desinfectantes y de embalsamamiento de cadáveres de invasores en ella (Al *et al.*, 2016; Bankova, 2005; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Se han reportado e identificado hasta más de 300 compuestos químicos en algunos propóleos en todo el mundo, que ha apoyado a la investigación y aplicación en los potenciales beneficios para la salud (Bankova *et al.*, 2016; Hernández-Zarate *et al.*, 2017; Lotti *et al.*, 2010). La presencia de los compuestos y su naturaleza química, es importante para que los propóleos lleguen a presentar actividad biológica, pero también el efecto sinérgico de estos compuestos es esencial para las actividades biológicas como la antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, entre otras (Bankova *et al.*, 2016; Miguel *et al.*, 2014).



Por otro lado, las chalconas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza y son precursores en la biosíntesis de flavonoides (Sapra *et al.*, 2016). Su estructura química (Figura 1) presenta un anillo aromático en cada extremo de una cadena de 3 átomos de carbono con un sistema carbonílico α,β -insaturado (1,3-difenilprop-2E-en-1-ona) (Blanco *et al.*, 2016).

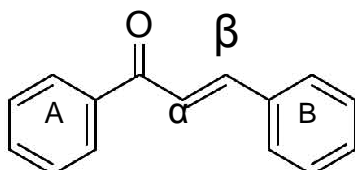


Figura 1. Estructura química de una chalcona (1,3-difenilprop-2E-en-1-ona).

Figure 1. Chemical structure of a chalcone (1,3-diphenylprop-2E-en-1-one).

Este sistema carbonílico, la presencia y las posiciones de sustituyentes químicos, principalmente grupos hidroxilo, determinan el amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas, considerándose compuestos con importantes potencialidades terapéuticas (Díaz-Tielas *et al.*, 2016; Mahapatra y Bharti, 2016; Singh *et al.*, 2014). Además, son compuestos que se pueden obtener en el laboratorio a partir de la síntesis química de condensación de Claisen-Schmidt entre la acetofenona o derivados de ella, con un aldehído aromático, mediante catálisis ácida o básica, seguido de una reacción de deshidratación (Figura 2) (Chetana *et al.*, 2009).

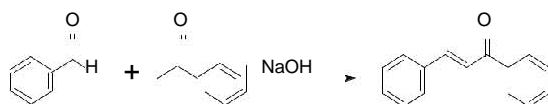


Figura 2. Síntesis general de chalconas.

Figure 2. General synthesis of chalcones.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la potencialización de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus flavus* de dos propóleos mexicanos, uno con buena actividad antimicótica (propóleo del Estado de México) y otro con baja actividad (propóleo del Estado de Guanajuato), mediante la adición a ellos de chalconas sintetizadas, en diferentes concentraciones de cada una y en combinaciones entre ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Los reactivos y solventes utilizados en este estudio fueron obtenidos de Sigma-Aldrich México: benzaldehído y sus derivados (# 1050905), acetofenona y sus derivados (# 42163), hidróxido de sodio (# 795429), ácido clorhídrico (# 320331), hexano (# 296090), acetato de etilo (# 270989), alcohol etílico (# 792780), reactivo de Folin-Ciocalteu (# F9252), tricloruro de aluminio (# 449598), metanol (#

179957), acetonitrilo (# 34998), ácido fórmico (# F0507). Los estándares de flavonoides de ácido gálico (# 91215) y quercetina (# 1592409) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich México. Los medios de cultivo fueron adquiridos en Becton Dickinson México.

Recolección de los propóleos en greña

Se obtuvieron dos propóleos en greña o en bruto de la cosecha de verano (septiembre de 2015). Un propóleo proveniente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Estado de México) con localización geográfica al norte 19°41' y al oeste 99°11', con altura de 2260 msnm y recolectado utilizando mallas plásticas. El otro propóleo corresponde al municipio de San José Iturbide, Guanajuato con coordenadas al norte 21°07' y al oeste 100°32', con altura de 2100 msnm y recolectado por el método de raspado. A las muestras se les eliminaron las impurezas, previo a las pruebas organolépticas.

Microorganismos

Los hongos utilizados para este estudio fueron una cepa de referencia de *Candida albicans* (ATCC 14065) y una de *Aspergillus flavus* proveniente de un aislamiento de campo a partir de granos de maíz, los cuales fueron seleccionados por constituir importantes microorganismos patógenos de humanos y animales, y este hongo filamentosos tiene afinidad por un amplio rango de huéspedes incluyendo el ser humano, los animales y las plantas, además de ser el patógeno que está involucrado con mayor frecuencia en la producción de aflatoxinas. Ambos microorganismos fueron proporcionados por el laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Antifúngicos

Se utilizaron antifúngicos comerciales de ketoconazol de 50 μg (Bio-Rad catálogo 62866) y de voriconazol de 1 μg (Bio-Rad catálogo 62803).

Sensidiscos

Se utilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (Whatman No. 5) previamente esterilizados.

Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP)

Para la obtención del extracto etanólico se utilizó la siguiente metodología: se pesó una cantidad de 50 g de los propóleos en greña, previa limpieza, se añadió alcohol etílico al 70 % en una proporción 3:1 de disolvente:propóleo, para someterlas a extracción en un Ultrasonicator (Branson, CPX1800H, Danbury, Estados Unidos). Posteriormente, se separó por filtración utilizando un embudo Buchner y el filtrado resultante se concentró utilizando un Rotovapor (Science MED, SM100-PRO, Finlandia) y se pasó a un frasco ámbar utilizando la mínima cantidad de alcohol etílico al 70 %. Se dejó a sequedad utilizando una bomba de vacío para eliminar los residuos de etanol. El extracto seco se pesó y almacenó protegido de la luz y en refrigeración a 4 °C hasta su utilización (NOM-003-SAG/GAN-2017; Trusheva *et al.*, 2007).

Síntesis de chalconas

Para la síntesis de chalconas, se realizó la reacción de condensación de Claisen-Schmidt entre el benzaldehído y la acetofenona correspondiente, a una concentración de 0.01 M, respectivamente. La mezcla se colocó en un matraz bola de 250 mL de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Posteriormente, se agregó gota a gota sobre la mezcla de reacción, 10 mL de una solución de NaOH (0.1 M) por un lapso de 30 min manteniendo la temperatura de reacción entre 20 °C y 25 °C, utilizando un baño de hielo. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante por 5 h y a continuación se neutralizó con HCl 0.1 N, se dejó enfriar hasta la formación de un precipitado. El precipitado fue filtrado por gravedad y se dejó secar a temperatura ambiente. El producto principal fue purificado utilizando cromatografía en columna (sílica gel y hexano:acetato de etilo en proporción de 8:2) para la obtención de las chalconas puras (Chetana *et al.*, 2009; Hormaza *et al.*, 2009).

Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides

Las determinaciones se realizaron conforme a lo establecido en la NOM-003-SAG/GAN-2017. Para medir la cantidad de compuestos fenólicos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (FC) con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando una longitud de onda de 765 nm y empleando ácido gálico como solución estándar. Se utilizó el método colorimétrico del tricloruro aluminio ($AlCl_3$) para la cuantificación de flavonoides, utilizando quercetina como estándar de referencia y se determinó la absorbancia utilizando una longitud de onda de 415 nm. Las lecturas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (DLAB, SP-UV1000, China). Los resultados se interpolan en la gráfica de la curva de calibración. Los resultados de ambas determinaciones se expresaron en porcentaje (NOM-003-SAG/GAN-2017; Rodríguez, 2015).

Cromatografía de Gases acoplada Espectroscopía de Masas (CG-EM)

El análisis de los extractos etanólicos fue realizado en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6850) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies, 5975C). La columna capilar utilizada fue HP-5MS (30 m x 0.25 mm) y con grosor de película de 0.25 mm, utilizando helio como gas acarreador. El tipo de inyección fue en modo Split y el volumen de inyección de 1 µL. Las condiciones de separación utilizadas fueron al inicio, una temperatura de 70 °C por dos min con dos incrementos de rampa, el primero de 20 °C por min hasta alcanzar los 230 °C y el segundo fue de 8 °C por min hasta llegar a los 280 °C manteniéndose por 5 min. El tiempo total de análisis fue 21.25 min. El rango de masa detectado fue de 35-750 *m/z*, la muestra fue ionizada por impacto electrónico a 70 eV y la temperatura alcanzada por la fuente de ionización fue de 230 °C. La identificación de los compuestos fue llevada a cabo por comparación con la biblioteca de la base de datos NIST versión 8.0. (Rivera-Yañez *et al.*, 2017).

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-DAD)

Se utilizaron 30 µL del extracto de propóleo, se inyectó a una concentración de 3 mg/mL en un equipo de HPLC Hewlett-Packard HP modelo 1100 (Hewlett-Packard, Wilmington DE, EU) con un detector de matriz de diodos (DAD) 1100 operado con ChemStation A0903 con los siguientes parámetros: separación isocrática usando una fase móvil metanol:acetonitrilo:agua (25:25:50) acidificada con ácido fórmico (1 %) durante 60 min; columna Discovery C-18 (250x4.6 mm), a 269 bar de presión y un rango de temperatura de 23 °C; velocidad de flujo, 1 mL/min; matriz de detectores de diodos con ajuste del detector a 260 nm; y escaneo completo de 200-400 nm. Los constituyentes se identificaron con base a una comparación del tiempo de retención y el espectro UV con los estándares (Rivera-Yañez *et al.*, 2018).

Evaluación de la actividad antifúngica

Preparación de los sensidiscos. Se impregnaron discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro (Whatman No. 5) con 6 mg/10 µL de los extractos de propóleos y la misma cantidad para las chalconas a evaluar, dejándose secar durante 24 h. Como testigo negativo se utilizaron discos impregnados con alcohol etílico al 70 %. Como testigos positivos se utilizaron antifúngicos comerciales de ketoconazol de 50 µg para *C. albicans* y de voriconazol de 1 µg para *A. flavus* (CLSI/M44-A2, 2009; NOM-003-SAG/GAN-2017).

***Candida albicans* (método de difusión en disco).** Se inoculó a la levadura en caldo Dextrosa Sabouraud (BD Dioxon), se incubó a 35 °C por 48 h, se realizaron las pruebas de identificación y se ajustó al tubo 0.5 de la escala del nefelómetro de MacFarland utilizando un espectrofotómetro, con una absorbancia entre 0.08–0.12 a una longitud de onda de 625 nm. A partir del inóculo preparado, se realizó un sembrado masivo sobre placas de agar Mueller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno (BD Dioxon). Se colocaron los discos impregnados con las muestras a evaluar, los testigos negativos y positivos. Se incubaron por 24 h a 37 °C y se midieron los halos de inhibición y a las 48 h se midió nuevamente el diámetro de los halos. Los resultados se expresaron como el promedio del diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento (CLSI/M44-A2, 2009; NOM-003-SAG/GAN-2017).

***Aspergillus flavus* (Método de inhibición del crecimiento radial).** El hongo filamentoso fue sembrado en placas de agar SDA (BD Dioxon) que fueron incubadas a 28 °C hasta que el desarrollo se apreció en toda la superficie del agar. Se tomó un inóculo de 5 mm de diámetro del hongo y se resembró en agar SDA (BD Dioxon), colocando los discos impregnados con las muestras a evaluar, los testigos negativos y positivos. Se incubaron a 28 °C por 72 h, hasta que la superficie del agar estuvo cubierta por el micelio. Se observó la formación de zonas de inhibición con formas de media luna. Los resultados se expresaron como el promedio del



diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento (CLSI M44-A2; Londoño, 2010).

Ensayo de potencialización entre EEP y chalconas

Se realizaron los ensayos de potencialización después de evaluar la actividad antifúngica de manera individual, de los EEP y de las chalconas. Se realizaron modificaciones a las metodologías utilizadas para los ensayos de evaluación de sinergia entre EEP y antimicrobianos (Mirzoeva *et al.*, 1997; Stepanović, *et al.*, 2003). Para este ensayo se realizó el siguiente procedimiento: se prepararon diferentes concentraciones de EEP de 1 a 5 mg/mL y una concentración de 1 mg/mL para cada chalcona. Se realizaron los cálculos químicos necesarios para tener cada una de las siguientes combinaciones entre cada una de las chalconas con cada EEP: combinación A: 1 parte de chalcona/1 parte de EEP (1:1); combinación B: 1 parte de chalcona/2 partes de EEP (1:2); combinación C: 1 parte de chalcona/3 partes de EEP (1:3); combinación D: 1 parte de chalcona/4 partes de EEP (1:4) y combinación E: 1 parte de chalcona/5 partes de EEP (1:5). Se impregnaron discos estériles con 10 µL de cada combinación y se realizó el procedimiento para evaluar la actividad antifúngica como se describió con anterioridad.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de Análisis de varianza (ANOVA) empleando un nivel de significancia de $P < 0.05$ utilizando el Programa Estadístico GraphPad Prism 7.04.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de chalconas

Las tres chalconas sintetizadas mediante la reacción de condensación de Claisen-Schmidt fueron: 1,3-difenilprop-2E-en-1-ona (PLCR-1) y dos análogos hidroxisustituídos en los anillos A y B: 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil) prop-2E-en-1-ona (PLCR-2) y 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-3), las estructuras se muestran en la Figura 3.

El compuesto PLCR-1 presentó un aspecto de cristales amarillos con rendimiento del 88 %; el compuesto PLCR-2, un aspecto de polvo café con rendimiento del 71 % y el compuesto PLCR-3, un polvo rojo con rendimiento del 96 %. Los porcentajes de rendimiento presentan un valor promedio de 85 %, siendo satisfactorios debido a que es una metodología sencilla, ecológica, económica y es un tema de gran interés en la actualidad (Ramírez *et al.*, 2012).

Recolección de propóleos y especificaciones físicas de los propóleos

Se evaluó el color, el aroma, el sabor y la consistencia. Para la evaluación del color se utilizó un microscopio este-reoscópico para observar detenidamente las tonalidades predominantes en cada muestra. El aroma se describió como: resinoso (madera) o balsámico (cera). El sabor se identificó como dulce, amargo, picante o insípido. La consistencia se determinó al tocar la muestra con los dedos, describiéndola como maleable o rígida (Lozina *et al.*, 2010; NOM-003-SAG/ GAN-2017).

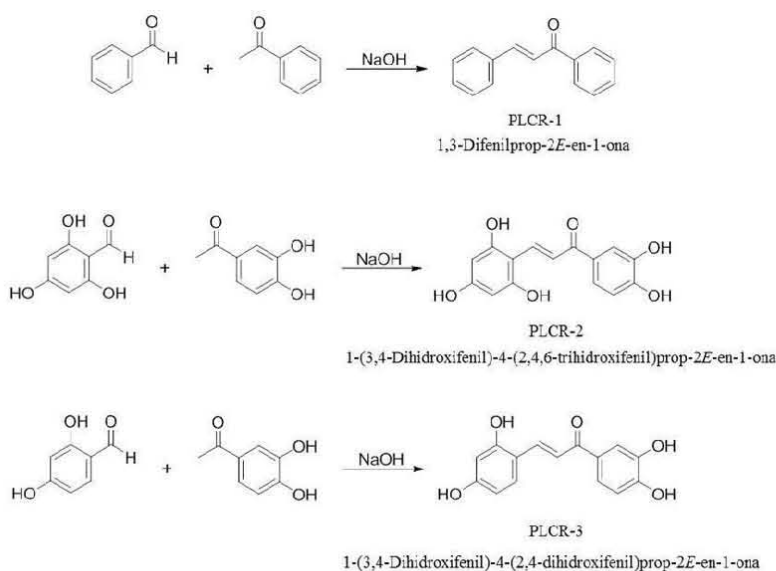


Figura 3. Síntesis general de chalconas PLCR 1-3.
Figure 3. General synthesis of chalcones PLCR 1-3.

La normatividad mexicana establece que la producción y la recolección de los propóleos debe realizarse utilizando mallas de plástico para facilitar su obtención y evitar la manipulación directa con el fin de garantizar que su composición química no se afecte. El propóleo del Estado de México (EM) se produjo bajo lo establecido en la normatividad mexicana, se obtuvo un propóleo de aspecto granulado y brillante, que se compara con lo reportado por Viloría *et al.* (2012). El propóleo de Guanajuato (G) se recolectó por el método de raspado presentando aspecto de trozos irregulares y opacos como lo reporta Bucio *et al.* (2016).

Las características físicas de los propóleos están relacionadas con la fuente vegetal de donde las abejas recolectan la resina. El color que prevaleció en ambas muestras fue marrón con tintes verdes y se percibió un sabor amargo; el aroma del propóleo del EM fue balsámico, relacionado con la presencia de aceites esenciales de *Eucalyptus* sp. y *Pinus* sp. (Londoño, 2010; Sosa-López *et al.*, 2017). Para la muestra de G, el aroma fue resinoso (olor a madera) por los aceites esenciales del mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), principal especie establecida en la proximidad del apiario (García-Andrade *et al.*, 2013).

Composición química de los extractos de propóleos

La composición química de los propóleos es un rico conjunto de compuestos fenólicos y flavonoides que determinan su bioactividad y depende del origen botánico, la época y del método de recolección (Bankova, 2009). Los resultados de la composición química de los propóleos se muestran en la Tabla 1. Ambos propóleos cumplen con las especificaciones de calidad mexicana. Los compuestos detectados en la muestra del EM corresponden a los flavonoides, pinocembrina, kaempferol, crisina y quercetina, identificados en propóleos del mismo apiario como compuestos mayoritarios en otros estudios (Flores, 2018; González-Búrquez *et al.*, 2018; Rodríguez, 2015); también se detectaron en menor cantidad, ácido palmítico y ácido oleico que están presentes en las ceras (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014) y en especies de álamos (Lugo *et al.*, 2006), *Eucalyptus* sp (Londoño, 2010) y *Pinus* sp (Rasul *et al.*, 2013). En el propóleo de G no se detectaron

flavonoides, únicamente un terpeno, la (*E*)- α -Damascona; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez (2015), que se relaciona con factores como: el origen botánico que define la cantidad y calidad de los metabolitos; la época de recolección, pues existen reportes de la presencia únicamente de terpenos en propóleos producidos en el verano y otoño (Bankova *et al.*, 2016); la obtención por la técnica de raspado, donde puede existir contaminación física por madera o pintura (Bucio *et al.*, 2016), la exposición al calor y la manipulación de la resina, principalmente.

Actividad antifúngica y ensayo de potencialización entre EEP y chalconas

La actividad antifúngica es una de las propiedades fundamentales de los propóleos (Bankova *et al.*, 2016), siendo de importancia el estudio de la composición química.

Candida albicans. Se realizaron pruebas de identificación a partir del inóculo preparado (Figura 4A y 4B) y los resultados de la actividad antifúngica de las muestras estu-diadas se muestran en la Tabla 2.

El ketoconazol es un antifúngico que inhibe la ruta biosintética del ergosterol, componente lipídico de la membrana fúngica y probado clínicamente (Tapia, 2005) se observó la sensibilidad de la levadura frente a este fármaco. Los EEP no inhibieron el crecimiento de la cepa de referencia, pero existen estudios previos que indican que propóleos obtenidos del mismo apiario en distintas épocas, presentan efecto fungicida y fungistático en cepas de referencia y muestras de aislamientos clínicos de *C. albicans* (Quintero-Mora *et al.*, 2008), por lo que es necesaria una evaluación utilizando este tipo de muestras para corroborar los resultados. La levadura presentó sensibilidad frente a las tres chalconas, sin diferencias significativas entre los halos de inhibición. Se ha reportado que la actividad antifúngica de las chalconas es por factores como: la presencia del grupo carbonilo α,β -insaturado; la posición y la cantidad de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos A y B (Kulkarni *et al.*, 2009) y la sustitución de la cetona y el doble enlace C=C (enona) que se une al grupo tiol de las glicoproteínas de la pared fúngica provocando la inhibición en la síntesis de 1,3- β -D-glucano

Tabla 1. Composición química de propóleos mexicanos identificados por GC-EM y HPLC-DAD.

Table 1. Chemical composition of Mexican propolis, identified by GC-MS and HPLC-DAD.

Muestra	% Fenoles*	% Flavonoides*	CG-EM			HPLC-DAD		
			TR (min)	Abundancia porcentual	Compuestos propuestos	TR (min)	Abundancia porcentual	Compuestos propuestos
EEP Estado de México	12.9 ± 0.001 _a	5.4 ± 0.001 _a	23.707	5.5	Ácido palmítico	5.410	18.7	Pinocembrina
			25.094	2.9	2-Nonadecanona	7.877	5.7	Kaempferol
			25.801	3.5	Ácido oleico	8.837	0.9	Quercetina
			29.594	68	Pinocembrina	15.424	7.0	Crisina
EEP Guanajuato	7.5 ± 0.002 _b	1.8 ± 0.74 _b	29.66	18.8	(<i>E</i>)- α -Damascona	Ningún compuesto detectado		

* Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3; Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05)



Tabla 2. Actividad antifúngica de extractos de propóleos y potencialización de la actividad con chalconas PLCR-1-3 frente a *Candida albicans* ATCC 14053.

Table 2. Antifungal activity of propolis extracts and potentialization of their activity with PLCR-1-3 chalcones against *Candida albicans* ATCC 14053.

		Halo de inhibición (mm)				
Ketoconazol		24 ± 1.0 _a				
Alcohol etílico al 70 %		0.0				
Extracto del Estado de México (EM)		0.0				
Extracto de Guanajuato (G)		0.0				
PLCR-1		12.0 ± 1.0 _b				
PLCR-2		9.3 ± 1.5 _b				
PLCR-3		11.3 ± 0.6 _b				
Prueba de potencialización						
Halo de inhibición (mm)						
Proporción evaluada	PLCR-1		PLCR-2		PLCR-3	
	EM	G	EM	G	EM	G
1:1	0.0	7.0 ± 1.7 _a	10.3 ± 0.6 _a	11.3 ± 1.2 _a	0.0	0.0
1:2	0.0	7.3 ± 0.6 _a	0.0	0.0	8.0 ± 0.0	0.0
1:3	11.3 ± 0.6 _a	7.0 ± 0.0 _a	0.0	0.0	0.0	0.0
1:4	0.0	7.0 ± 0.0 _a	0.0	0.0	0.0	0.0
1:5	9.0 ± 1.0 _b	0.0	15.7 ± 0.6 _b	7.0 ± 1.0 _b	0.0	0.0

Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3. Literales o letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05)

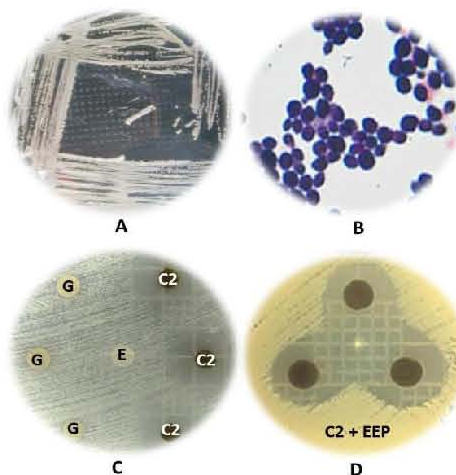


Figura 4. Evaluación de la sensibilidad de *Candida albicans* frente a las muestras estudiadas. **A.** Identificación macroscópica; **B.** Identificación microscópica; **C.** Comparación de la actividad antifúngica del extracto de propóleo de Guanajuato (G) y chalcona PLCR-2 (C2); **D.** Potencialización del efecto antifúngico de la mezcla del extracto de propóleo de Guanajuato y la chalcona PLCR-2.

Figure 4. *Candida albicans* sensitivity evaluation against studied samples. **A.** Macroscopic identification; **B.** Microscopic identification; **C.** Comparison between the antifungal activity of the propolis extract from Guanajuato (G) and PLRC-2 (C2); **D.** Potentialization of the antifungal effect of the Guanajuato propolis extract and PLCR-2 mixture.

y de la glutatión-S -transferasa (Guerrero, 2016; Lopez *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2009).

La evaluación de la potencialización de la actividad antifúngica se muestra en la Tabla 2. La muestra del EM puede presentar o no, el efecto inhibitorio en el crecimiento de *C. albicans* con base a la chalcona adicionada y la proporción evaluada; sin embargo, la adición de la chalcona PLCR-2 en proporción 1:5, provocó un mayor halo de inhibición (15.7 mm) que el halo de inhibición de la chalcona por sí sola (9.3 mm), considerando que el efecto no es particularmente por la chalcona ya que se encuentra en menor proporción.

La mezcla del EEP de G con la chalcona PLCR-3 presentó un antagonismo en todas las proporciones observando el crecimiento de la levadura. Con la PLCR-1, no existió diferencia significativa entre el diámetro de los halos de inhibición (7.0 mm) de las proporciones evaluadas, pero sí, con el halo de inhibición de la chalcona (12 mm); la adición de la chalcona PLCR-2 en la proporción 1:1 presentó mejor actividad antifúngica con un halo de inhibición mayor, al que genera la chalcona por sí sola (Figura 4D).

Con lo anterior se demostró que la adición de la chalcona PLCR-2 a los EEP, tiene mejor efecto de inhibición para *C. albicans*. Se puede proponer que la estructura química de esta chalcona, al presentar mayor número de sustituyentes hidroxilo provocan la alteración de los componentes de la pared celular y la potencialización de la actividad antifúngica, siendo necesarios estudios que comprueben esta hipótesis.

***Aspergillus flavus*.** Se realizó la identificación del hongo por la evaluación de la morfología de las colonias de color verde con micelio amarillo, textura vellosa y el reverso de la colonia incoloro (Figura 5A). Utilizando la técnica de microcultivo de Riddel, se realizó la identificación de las características morfológicas utilizando las monografías de Larone para la observación microscópica de la cabeza conidial característica de este hongo (Figura 5B). (Cruz *et al.*, 2014; Larone, 2011). Los resultados de la actividad antifúngica frente a este hongo se muestran en la tabla 3. Se observó la sensibilidad del hongo frente al voriconazol, antifúngico triazólico de segunda generación utilizado para mejorar el pronóstico de las aspergilosis invasoras (Tapia, 2005) y también presentó a sensibilidad a la chalcona PLCR-2 (Figura 5C). Los resultados del ensayo de potencialización para las dos muestras de propóleos demostraron que la adición de las chalconas PLCR-2 y -3 en diferentes proporciones, incrementan la sensibilidad del hongo (Figura 5D).

Se observó que los dos hongos estudiados presentan una resistencia frente a los dos EEP y el *A. flavus* a las chalconas PLCR-1 y -3; existen estudios que reportan el mecanismo de acción de la resistencia de hongos a nuevos compuestos, como son: la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior, que impiden alcanzar la diana dentro de la célula; cambios en la interacción fármaco-diana debida a mutaciones; y, modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas de la síntesis del ergosterol. Por lo anterior, es necesaria la realización de

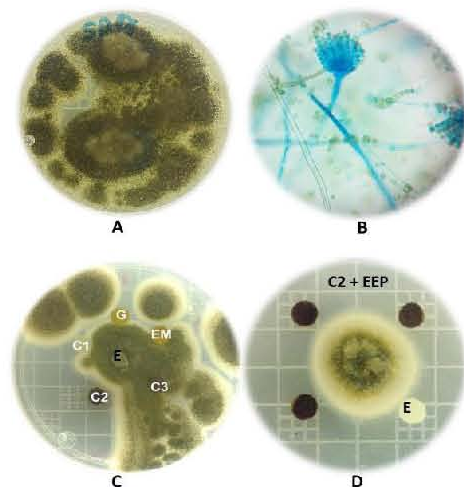


Figura 5. Evaluación de la sensibilidad de *Aspergillus flavus* frente a las muestras estudiadas. **A.** Identificación macroscópica; **B.** Identificación microscópica; **C.** Comparación de la actividad antifúngica de los extractos de propóleo del Estado de México (EM), Guanajuato (G), chalconas PLCR-1 (C1), PLCR-2 (C2) y PLCR-3 (C3), Etanol (E); **D.** Potencialización del efecto an-tifúngico de la mezcla del EEP y la chalcona PLCR-2. Se observan las medias lunas que indican la inhibición de crecimiento.

Figure 5. Sensitivity evaluation of *Aspergillus flavus* against the studied samples. **A.** Macroscopic identification; **B.** Microscopic identification; **C.** Comparison of the antifungal activity of the propolis ethanolic extracts from the State of Mexico (SM), Guanajuato (G); PLCR-1 (C1), PLCR-2 (C2) and PLCR-3 (C3) chalcones, Ethyl alcohol (E); **D.** Potentialization of the antifungal effect for a PEE and PLCR-2 mixture.

pruebas más específicas a nivel molecular para poder elucidar la resistencia microbiológica y clínica como lo menciona Pfaller (2012), aunado a la preocupación en el uso masivo de azoles en la agricultura que podría favorecer la aparición de cepas resistentes y modificar la población de hongos que infectan al ser humano (Mellado *et al.*, 2002).

Para el caso de los propóleos, en México se han realizado estudios de la composición química y del efecto antifúngico del propóleo del Estado de México proveniente de la FES Cuautitlán contra cepas de *Candida albicans* y por medio de microscopía electrónica se demostró la inhibición del tubo germinativo y cambios en la pared celular con sitios de gemación irregulares provocados por compuestos como el ácido cafeico, flavonoides y ésteres fenólicos (Londoño *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Quintero *et al.* (2011), se concluyó que en *C. albicans*, se afectan los genes ADH1 y PIK1 que están relacionados con los cambios de la inhibición de la formación del tubo germinativo, la formación de blastoconidias y el cambio morfológico de la levadura.

Se puede proponer que existe una sinergia entre los compuestos químicos de los propóleos y las chalconas que provocan la alteración de los componentes de la pared celular, siendo necesario la realización de estudios como microscopía electrónica, estudios genéticos y moleculares;

Tabla 3. Prueba de inhibición del crecimiento radial de los extractos de propóleos y potencialización de la actividad de chalconas sintetizadas PLCR 1-3 frente a *Aspergillus flavus*.**Table 3.** Propolis extracts inhibition of radial growth and activity potentialization of synthetic chalcones PLCR 1-3 against *Aspergillus flavus*.

Halo de inhibición (mm)	
Voriconazol (1 µg)	18 ^a
Alcohol etílico al 70 %	0.0
Extracto de Estado de México (EM)	0.0
Extracto de Guanajuato (G)	0.0
PLCR-1	0.0
PLCR-2	10 ^b
PLCR-3	0.0

Prueba de potencialización Halo de inhibición (mm)						
Proporción evaluada	PLCR-1		PLCR-2		PLCR-3	
	EM	G	EM	G	EM	G
1:1	0.0	0.0	0.0	7.0 ± 0.6 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	0.0
1:2	0.0	0.0	5.0 ± 0.6 ^a	0.0	0.0	0.0
1:3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1:4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1:5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3. Literales o letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05).

considerando que este estudio es el pionero en la adición de chalconas sintetizadas a extractos etanólicos de propóleos para incrementar su actividad antifúngica y su utilización como tratamiento complementario para infecciones por hongos. Por lo tanto, es también importante realizar el estudio con cepas de aislamientos clínicos para ambos hongos con el fin de evaluar la resistencia antifúngica a nuevos compuestos.

CONCLUSIONES

La actividad antifúngica de los propóleos está determinada por la cantidad de compuestos fenólicos, cuando estos metabolitos se encuentran en bajas cantidades o ausentes, la actividad es baja o nula; pero con la adición de precursores de flavonoides denominados chalconas, se observó la potencialización del efecto antifúngico. La chalcona sintética que presentó en su estructura química mayor número de sustituyentes hidroxilo en los anillos A y B, denominada PLCR-2, mejoró la potencialización del efecto frente a *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*, actuando de diferente forma con base a la proporción utilizada; por lo anterior, es necesario ampliar la investigación del mecanismo de acción de la relación chalcona:propóleo para validar estos resultados y finalmente, esta investigación brinda apoyo al apicultor que utiliza esta resina como materia prima para la elaboración de productos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido de los proyectos: UNAM-DGAPA, PAPIIT IT 200915, PAPIIT IN217118, FESC:PIAPIC 1632, PIAPI 1802, IN223719. Betsabé Rodríguez Pérez es estudiante de doctorado en el Programa de Producción y Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Conacyt) (No. 511917).

REFERENCIAS

- Al, N.Y., Sun, J., Robertson, A., Giesy, J. P. y Wiseman, S. 2016. Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian propolis. *Journal Apicultural Research*. 55(4):305–314.
- Bader, O., Tünnermann, J., Dudakova, A. y Tangwattanachuleeporn, M. 2015. Environmental azole resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59: 4356–4359.
- Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 100(2005):114–117.
- Bankova, V. 2009. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of Apiculture Product and Apiculture Medical Science*. 1(2):23–28.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B., Barbosa da-Silva, I., Danert, C., Nogueira, E., Falcão, S., Isla, M., Nieva, M., Papotti, G., Popova, M., Basso, S. K., Salas, A., Frankland, S. A., Vilczaki, S., Sforzin, J., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., Trusheva, B., Vilas-Boas, M., Wilson, M. y Zampini, C. 2016. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*. 56(S13): 1–49.
- Blanco, P. M., Dip, G. A., Torres, R. E., Peña, F. D., Vogel, C., Bullaín, G. M. y Fajardo, C. L. 2016. Actividad antibacteriana *in vitro* de nuevas chalconas halogenadas. *Química Viva*. 15(2):17–28.
- Bucio, V. C., Navarro, L. F., Martínez, J. O., Torres, M. J. y García, A. E. 2016. Producción de propóleo en campo, recolectado por las abejas productoras de miel (*Apis mellifera*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1): 515–520.
- Chetana, B. P., Mahajan, S. K. y Suvarna, A. K. 2009. Chalcone: A Versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 1(3):11–22.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/M44-A2), Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts [Consultado 26 febrero 2018] 2009. Disponible en: https://clsi.org/media/1634/m44a2_sample.pdf.
- Cruz, S. T. A., Estrada, G. P. A., López, Z. C. I., Aufrán, M. M., Pérez, V. V. y Londoño, O. A. 2014. Use of Propolis for Topical Treatment of Dermatophytosis in Dog. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 4: 239–245.
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Reigosa, M. J. y Sánchez-Moreira, A. 2016. Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha*. 34(3):607–616.
- Flores, I., Moreno, M., Londoño, A. y Cruz, T. 2016. Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomyosis in Horses. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 6: 1–8.
- García-Andrade, M., González-Laredo, R., Rocha-Guzmán, N. y Gallegos-Infante, J. 2013. Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and

- cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*. 44(2013):336–342.
- González-Búrquez, M. J., González-Díaz, R. F., García-Tovar, C. G., Carrillo-Miranda, L., Soto-Zarate, C. I., Canales-Ramírez, M. M., Penieres-Carrillo, J. G., Cruz-Sánchez, T. A. y Fonseca-Coronado, S. 2018. Comparison between *In Vitro* Antiviral Effect of Mexican Propolis and Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018(7092416):1–9.
- Guerrero, V. L. 2016. Estudio de la reactividad de chalconas como precursores en la síntesis de nuevos compuestos pirazolinicos, betalactámicos y tiazolidinicos fusionados. Maestra en Ciencias. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Hernández-Zarate, M., Abraham-Juárez, M., Cerón-García, A., Gutiérrez-Chávez, D., Gutiérrez-Arenas, D. y Ávila-Ramos, F. 2017. Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de propóleos colectados en Guanajuato, México. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2(2017): 607–612.
- Hormaza, A. A., Arbeláez, O. F. y Montes, V. N. 2009. Síntesis y caracterización espectroscópica de una serie de chalconas. *Scientia et Technica*. XV (43):316–320.
- Joya, M., Gil, M. y Bastidas-Pacheco, G. 2017. Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento *in vitro* de cepas del género *Candida*. *Tecnología en Marcha*. 30(3):3–11.
- Kulkarni, G. B., Siva, R. A., Padmavathi, A. y Raamadevi, K. 2009. 3D-QSAR Studies of anti-bacterial chalcones. *International Journal of ChemTech Research*. 1(3):717–721.
- Larone, D.H. 2011. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. ASM Press, Washington, D.C.
- Londoño, A. O. 2010. Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción. Doctora en Ciencias. Tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
- Londoño-Orozco, A., Penieres-Carrillo, J. G., García-Továr, C. G., Carrillo-Miranda, L., Quintero-Mora, M. L., García-Vásquez, S. E., Mendoza-Saavedra, M. A. y Cruz-Sánchez, T. A. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en Marcha*. 21(1):49–55.
- López, N. S., Castelli, V. M., Zacchino, A. S., Domínguez, N. J., Lobo, G., Charris-Charris, J., Cortés, G. J., Ribas, C. J., Devia, C., Rodríguez, A. M. y Enriz, D. R. 2001. *In Vitro* Antifungal Evaluation and Structure-Activity Relationships of a New Series of Chalcone Derivatives and Synthetic Analogues, with Inhibitory Properties Against Polymers of the Fungal Cell Wall. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 9:1999–2013.
- Lotti, C., Campo, M., Piccinelli, A., Cuesta-Rubio, O., Márquez, I. y Rastrelli, L. 2010. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58:2209–2213.
- Lozina, L., Peichoto, M. E., Acosta, O. y Granero, G. E. 2010. Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 29(1):102–110.
- Lugo, E., Goycolea, V. F., Hernández, J. y Velásquez, C. 2006. Pinocebrina, principal componente de propóleos sonorenses. *Invernus*. 1(2):71–83.
- Mahapatra, D. K. y Bharti, S. K. 2016. Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sciences*. 148 (2016):154–172.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J. L. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 20(10):523–530.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Dandle, S. A., Cavaco, A. M. y Antunes, M. D. 2014. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology*. 34(1):16–23.
- Mirzoeva, K., Grishanin, N. y Calder P. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*. 152(1997):239–246.
- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. [Consultado 6 octubre 2017]. Disponible en: <https://dof.vlex.com.mx/c/Norma-Oficial-Mexicana>.
- Pfaller, M. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*. 125(1): S3–13.
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayoso, P., López-Martínez, R., Soto-Zarate, C. I., Carrillo-Miranda, L., Penieres-Carrillo, J. G., García-Továr, C. G. y Cruz-Sánchez, T. A. 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25:22–26.
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Soto-Zarate, C. I., García-Tovar, C. G. Carrillo-Miranda, L., Penieres-Carrillo, J. G., y Cruz-Sánchez, T. A. 2011. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by Mexican propolis. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances (FORMATEX)*. 1068–1072.
- Ramírez, E. M., Barajas, B. L., Pérez, B. C., Sáenz, G. A. y Silva, B. S. 2012. Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(4): 7–14.
- Rasul, A., Millimouno, F., Eltayb, W., Ali, M., Li, J. y Li, X. 2013. Pinocebrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International*. 2013(379850):1–9.
- Rivera-Yáñez, N., Rodríguez-Canales, M., Nieto-Yáñez, O., Jiménez-Estrada, M., Ibarra-Barajas, M., Canales-Martínez, M. M. y Rodríguez-Monroy, M. A. 2018. Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018(4360356):1–10.
- Rivera-Yáñez, C. R., Terrazas, L. I., Jiménez-Estrada, M., Campos, J. E., Flores-Ortiz, C. M., Hernández, L. B., Cruz-Sánchez, T. A., Garrido-Fariña, G. I., Rodríguez-Monroy, M. A. y Canales-Martínez, M. M. 2017. Anti-*Candida* Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene, An *In Vitro* Study. *Molecules*. 22(12):1–13.
- Rodríguez, R. B. 2015. Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. Maestría en Ciencias, Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México, México.

- Sapra, S., Sharma, K., Bhalla, Y. y Dhar, K. L. 2016. Chalconoid Derived Heterocycles as Potent Bioactive Molecules: A Review. *Chemical Sciences Journal*. 7(2):3–8.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F. y Almeida-Aguiar, C. 2015. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015(206439):1–29.
- Singh, P., Anand, A. y Kumar, V. 2014. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 85:758–777.
- Sivakumar, P. M., Muthu, K. T. y Doble, M. 2009. Antifungal activity, mechanism and QSAR studies on chalcones. *Chemical Biology & Drug Design*. 74(1):68–79.
- Sosa-López, Á. A., Cabrera, M. G. y Álvarez, M. Y. 2017. Parámetros físicos y características organolépticas de propóleos provenientes de la Provincia de Misiones, Argentina. *Journal of the Selva Andina Biosphere*. 5(1):51–58.
- Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I. y Švabić-Vlahović, M. 2003. Antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*. 158: 353–357.
- Tapia, C. 2005. Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. Programa de Microbiología y Micología. ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Trusheva, B., Trunkova, D. y Bankova, V. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemical Central Journal*. 1(13):1–13.
- Vargas-Sánchez, R. D, Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez-Escalante, J. J., Peñalba-Garmendia, M. C. y Sánchez-Escalante, A. 2014. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotecnia*. XVI (1):32–37.
- Viloria, B. J., Gil, G. H., Durango, R. D. y García, P. C. 2012. Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 10(1):77–86.

12 ARTÍCULO ACEPTADO

Guanajuato, Gto., a 29 de mayo de 2019
Asunto: Aceptación de Artículo

**Betsabé Rodríguez Pérez
María Margarita Canales Martínez
José Guillermo Penieres Carrillo
Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez
PRESENTE**

Por medio de la presente, me permito informar que su artículo: "Estudio químico y antimicrobiano de propóleos recolectados en cinco Estados de la República Mexicana.." ha sido aceptado para su publicación en la Revista *Acta Universitaria*, órgano de difusión de la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"
EL EDITOR**



DRA. ARTEMISA HELGUERA ARELLANO

13 ANEXOS

1. Contenido de fenoles: método de Folin-Ciocalteu

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5\text{I}_3\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ (mezcla de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico hexavalente). El reactivo contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 760 nm:



Preparación de reactivos

- Solución estándar de ácido gálico (0.2 mg/mL): Disolver 1 mg de ácido gálico en 5 mL de agua. Mantener en refrigeración y protegido de la luz.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%: Disolver 2 g de carbonato de sodio anhidro en 7 mL de agua destilada y aforar a 10 mL.
- Etanol al 70%: Medir 72.9 mL de alcohol etílico al 96% y aforar a 100 mL con agua destilada.

Preparación de muestras

- Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleos disueltos en etanol al 70%. Tomar una alícuota de 250 μL de ésta y agregar 750 μL de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

Blanco de muestra

- Tomar 1 mL de la muestra solución estándar de la muestra y añadir 1 mL de MeOH.

Preparación de la curva de calibración

- A partir de la solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, preparar una curva de calibración utilizando diluciones seriadas, como se indica a continuación:

Sistema	Ácido gálico (mg/mL)	Estándar de ácido gálico (μL)	Muestra (μL)	Agua destilada (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na₂CO₃ (mL)	Agua destilada (mL)
Blanco	-	-	-	-	500	1.5	7
1	0.2	500 μL de la solución estándar	-	500	500	1.5	7
2	0.1	500 μL del sistema 1	-	500	500	1.5	7
3	0.05	500 μL del sistema 2	-	500	500	1.5	7
4	0.025	500 μL del sistema 3	-	500	500	1.5	7
5	0.0125	500 μL del sistema 4	-	500	500	1.5	7
6	0.00625	500 μL del sistema 5	-	500	500	1.5	7
Muestra (0.05 mg/mL)	-	-	250	750	500	1.5	7

- Esperar 2 horas a temperatura ambiente, para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-Vis.
- Repetir la misma operación para la muestra.

- Graficar la concentración de ácido gálico en el eje de las “x” contra la absorbancia para obtener la curva patrón.
- Interpolar la lectura de absorbancia de la muestra en la curva de calibración.
- Los valores se expresan como mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra o en %.

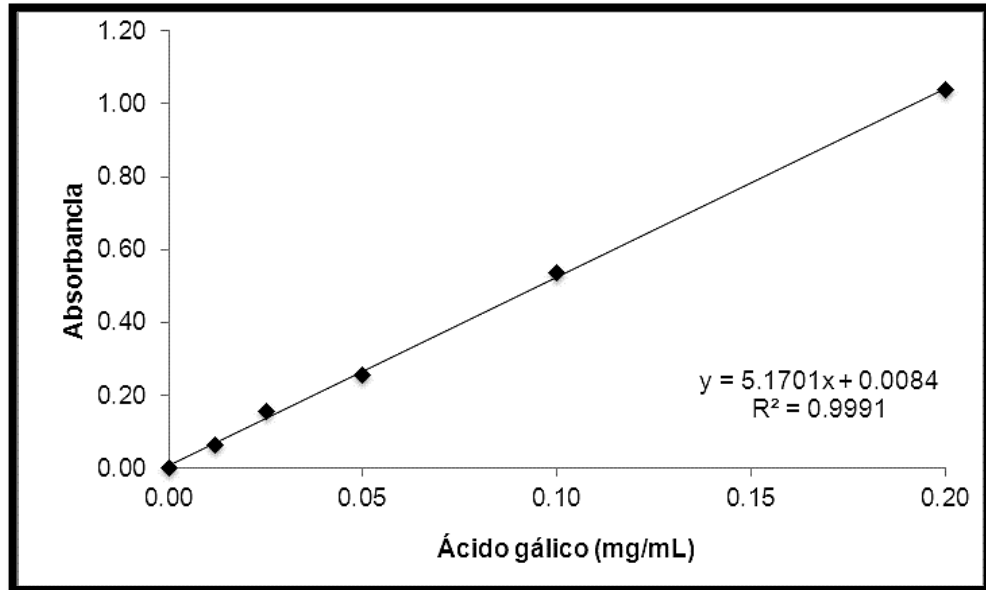


Figura 25. Curva de calibración de ácido gálico

2. Cuantificación de flavonoides

El principio básico es la formación de complejos estables de ácidos con el grupo cetona C-4 y/o del grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonoles, así como complejos lábiles ácidos con los grupos *orto*-dihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides. La quercetina es la más adecuada para la construcción de la curva de calibración debido a sus propiedades antioxidantes.

Preparación de reactivos

- Solución stock de quercetina (1 mg/mL). Disolver 10 mg de quercetina en MeOH y aforar a 10 mL. Conservar en la oscuridad y refrigerada.
- Cloruro de aluminio, AlCl₃ (2%). Disolver 2 g de cloruro de aluminio en agua destilada y aforar a 100 mL, con mucho cuidado ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico.

Preparación de muestras

- Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleo disueltos en etanol al 70%. Tomar una alícuota de 250 µL de ésta y agregar 750 µL de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

Blanco de muestra

- Tomar 1 mL de la muestra y adicionar 1 mL de MeOH.

Preparación de la curva de calibración.

- A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones deseadas, como se muestra a continuación:

Concentración (µg/mL)	Stock de quercetina (µL)	MeOH (µL)	AlCl₃ (mL)
90	270	2730	3
80	2667	333	3
70	2625	375	3
60	2571	429	3
50	2500	500	3
40	2400	600	3
30	2250	750	3
20	2000	1000	3
10	1500	1500	3
9	2700	300	3
8	2667	333	3
7	2625	375	3
6	2571	429	3
5	2500	500	3
4	2400	600	3
3	2250	750	3
2	2000	1000	3
1	1500	1500	3

Procedimiento

1. Esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción.
2. Calibrar el espectrofotómetro a 0 de absorbancia con MeOH a una longitud de onda de 415 nm.

3. Graficar la concentración de quercetina vs absorbancia, realizar un análisis de regresión lineal e interpolar la absorbancia de la muestra a evaluar.
4. El contenido total de flavonoides se expresa como μg de equivalentes de quercetina/g de extracto.

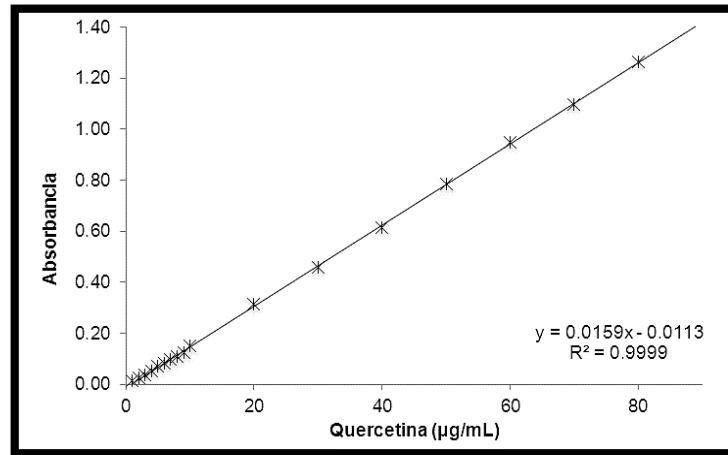


Figura 26. Curva de calibración de quercetina

3. Índice de oxidación

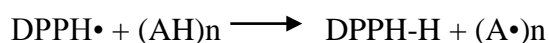
El permanganato de potasio (KMnO_4) es un agente oxidante de color violeta intenso formado por iones potasio (K^+) y permanganato (MnO_4^-), que se vuelve incoloro al reducirse al catión Mn^{4+} en una solución ácida, a esta determinación se le denomina *índice de oxidación* y es evaluada de manera visual.

Procedimiento

1. Pesar 0.2 g de EEP y se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.
2. Añadir 5 mL de etanol puro, de modo que cubra la muestra y se deja reposar una hora.
3. Añadir 100 mL de agua destilada y agitar hasta homogeneizar la mezcla y filtrar a gravedad.
4. Tomar 10 mL de esta solución y aforar a 100 mL con agua destilada.
5. Tomar 2 mL de la solución diluida, y añadir 1 mL de ácido sulfúrico al 20% y agitar un minuto.
6. Añadir una gota de KMnO_4 de concentración 0.1 N, sin tocar las paredes.
7. Cronometrar y registrar el tiempo en que tarda en desaparecer el color rosa.
8. Reportar el promedio de las determinaciones en segundos (s).

4. Capacidad antioxidante

Esta determinación se realizó utilizando el método de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (también llamado 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (DPPH•). que se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición de la absorción del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas

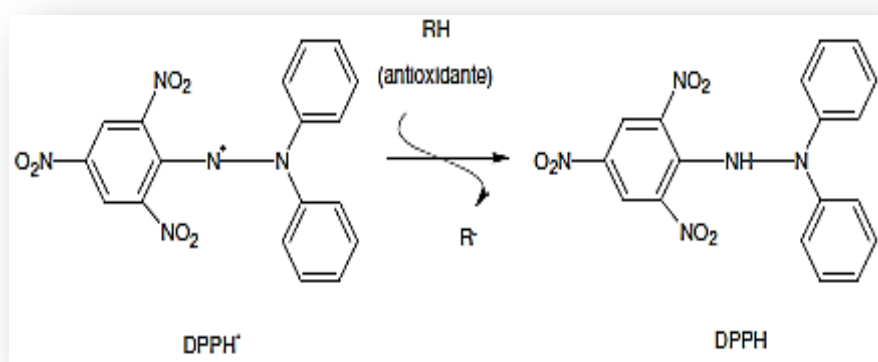


Figura 27. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (sinónimo 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (DPPH•).

Preparación de reactivos

- Solución stock de quercetina o muestra (5 mg/5 mL). Disolver 5 mg de quercetina o muestra en 5 mL de MeOH. Conservar en la oscuridad y refrigerada.
- Solución de DPPH• (100 µM). Pesar 2 mg de reactivo de DPPH•, disolver en una pequeña cantidad de MeOH y aforar a 50 mL.

Preparación de las muestras

Para las concentraciones de 1, 2, 3 y 4 ppm, realizar la siguiente preparación:

- Del stock de 5 mg/5 mL, tomar una alícuota de 200 µL y añadir 1800 µL de MeOH, a partir de ella preparar las concentraciones deseadas como se indica a continuación:

Concentración (ppm)	Muestra (µL)	MeOH (µL)	DPPH• (mL)
1	10	990	3
2	20	980	3
3	30	970	3
4	40	960	3
5	50	950	3

- Para las demás concentraciones, preparar como se indica:

Concentración (ppm)	Muestra (µL)	MeOH (µL)	DPPH• (mL)
10	10	990	3
20	20	980	3
40	40	960	3
60	60	940	3
80	80	920	3
100	100	900	3
120	120	880	3
140	140	860	3
160	160	840	3
180	180	820	3
200	200	800	3
250	250	750	3

- Proteger de la luz y dejar que se lleve a cabo la reacción por 30 minutos.
- Calibrar el espectrofotómetro UV-VIS con metanol a una longitud de onda de 517 nm.
- Determinar la absorbancia de cada sistema y del DPPH• (100 µM), graficar la concentración (µg/mL) vs absorbancia para obtener la ecuación de la recta.
- Para obtener el % de reducción del DPPH•, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (Absorbancia \text{ del DPPH}\bullet) - [Absorbancia \text{ de la mezcla (DPPH}\bullet + \text{ compuesto problema})] * 100$$

- Graficar la concentración (µg/mL) vs % reducción; la CA₅₀ se calcula interpolando en la gráfica.