



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, DE UNA MUESTRA DE  
PROPÓLEO DE SANTIAGO LA GALERA, CANDELARIA LOXICHA, OAXACA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**IVÁN RUÍZ LÓPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. Ma. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020**



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.

## **RECONOCIMIENTO.**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

A los miembros del jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

M. en, C Luis Barbo Hernández Portilla

M. en C. Ángel Durán Díaz

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

**PAPIIT IN212317.**

**Agradecimientos.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por abrirme las puertas en sus aulas y darme una excelente formación académica.

## **Dedicatorias.**

A mis padres, por ser mi guía y ejemplo estoy muy orgulloso de mis raíces, Oaxaca y Michoacán. Por todos los sacrificios que tuvieron que realizar para que yo concluyese mis estudios, por la paciencia. Por siempre estar detrás de mí pese a los altibajos, por ello les dedico la tesis con mucho cariño, quizás no sea suficiente para compensar todo lo que han hecho por mí, pero sin duda sé que sus esfuerzos no fueron en vano, los amo.

A mi hermano Armando, porque pese a nuestras diferencias, siempre has estado cerca de mí y me has brindado tu apoyo en los momentos más difíciles.

A Mr. Cactus Antonio Díaz Flores, por enseñarme todo sobre las cactáceas me abriste un mundo, eres como un segundo padre, gracias por todo lo que dejaste en mí.

A Juan García Santos †, quien diría que aquella muestra sería el comienzo de este proyecto, el cual ahora dedico con cariño, gracias por regalarme tiempo y conocimientos en el mundo de las abejas.

En el medio del odio me pareció que había dentro de mí un amor invencible. En medio de las lágrimas me pareció que había dentro de mí una sonrisa invencible. En medio del caos me pareció que había dentro de mí una calma invencible.

Me di cuenta, a pesar de todo, que en medio del invierno había dentro de mí un verano invencible. Y eso me hace feliz. Porque no importa lo duro que el mundo empuje en mi contra, dentro de mí hay algo mejor empujando de vuelta.

El verano, 1953. Albert Camus

## Contenido

Índice de cuadros .....	6
Índice de Figuras .....	7
Resumen.....	1
Introducción. ....	2
Antecedentes. ....	5
Justificación.....	7
Objetivos. ....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos Particulares .....	7
Material y métodos.....	7
Colecta del material .....	7
.....	9
.....	9
.....	9
Actividad antibacteriana .....	9
Actividad antifúngica.....	10
Flavonoides totales .....	11
Análisis estadístico. ....	12
Resultados.....	12
Características organolépticas .....	12
Rendimiento del propóleo .....	12
Actividad antibacteriana .....	13
Capacidad antioxidante del extracto. ....	21
Cuantificación de fenoles totales.....	22
Cuantificación de flavonoides totales.....	23
Toxicidad. ....	23
Caracterización Química. ....	25
Discusión .....	28
Conclusiones. ....	31
APÉNDICE 1 .....	32
Zona de colecta .....	32

APÉNDICE 2 .....	33
Técnica de Maceración.....	33
APÉNDICE 3 .....	33
Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer .....	33
APÉNDICE 4 .....	35
Microtécnica de dilución en caldo .....	35
APÉNDICE 6 .....	37
Método de cultivo de inhibición del crecimiento radial .....	37
APÉNDICE 7 .....	38
Actividad antioxidante .....	38
APÉNDICE 8 .....	39
Contenido de Fenoles Totales (CFT).....	39
APÉNDICE 9 .....	40
APÉNDICE 10 .....	41
Método de toxicidad general .....	41
APÉNDICE 11 .....	42
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) .....	42
APÉNDICE 12 .....	43
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	43
Referencias.....	44

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Especificaciones físicas de un propóleo NOM-003-SAG/GAN-2017 .....	8
Cuadro 2. Cepas bacterianas utilizadas .....	10
Cuadro 3. Cepas de hongos filamentosos utilizadas .....	10
Cuadro 4. Características organolépticas del propóleo de Oaxaca obtenido del apiario del poblado de Santiago La Galera Municipio Candelaria Loxicha. ....	12
Cuadro 5. Halos de inhibición en las bacterias frente a una concentración de 2 mg del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca. ....	14

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida Mínima (CBM) del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca para las cepas bacterianas. **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 7. Actividad del propóleo de Oaxaca sobre hongos filamentosos .....	18
Cuadro 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial sobre Cepas de Hongos filamentosos. ....	20
Cuadro 9. Concentración letal media del propóleo sobre las larvas de nauplio de <i>Artemia salina</i> .....	25
Cuadro 10. Tiempo de retención e índice de similitud del propóleo de Oaxaca. ....	27

## Índice de Figuras

Figura 1. Maceración del propóleo .....	8
Figura 2. Destilación del extracto metanólico, en el rotavapor .....	8
Figura 3. Extracto metanólico .....	9
Figura 4. Rendimiento del extracto del propóleo de Oaxaca.....	13
Figura 5. Sensibilidad de cada cepa bacteriana frente al propóleo de Oaxaca. ....	15
Figura 6. Curva de letalidad del propóleo sobre el crecimiento en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398.....	17
Figura 7. Curva de letalidad del propóleo sobre el crecimiento en <i>Salmonella tiphy</i> CDBB- 1111 ..	18
Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium sporotrichioides</i> .....	20
Figura 9. Inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus sp</i> .....	20
Figura 10. Inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> .....	21
Figura 11. Inhibición del crecimiento radial de <i>Rhizoctonia lilacina</i> .....	21
Figura 12. Reducción del radical DPPH por el extracto metanólico del propóleo .....	22
Figura 13. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales. El estándar empleado fue ácido gálico. ....	23
Figura 14. Curva patrón para el cálculo de flavonoides totales.....	23
Figura 15. Toxicidad general del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca.....	25
Figura 16. Cromatograma del HPLC del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca.....	26
Figura 17. Cromatograma de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del propóleo de Oaxaca. ....	28
Figura 18. Ubicación del apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Oaxaca .....	32

## Resumen.

El propóleo es una sustancia viscosa de origen vegetal constituido por partículas resinosas de diferentes vegetales una vez en la colmena, las abejas mezclan las resinas con cera y secreciones salivales para obtener el propóleo.

Sus propiedades medicinales se han utilizado a través del tiempo debido a que posee actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antiparasitaria, mostrando variación en su actividad biológica dependiendo de su origen geográfico. En México se han realizado algunas investigaciones sobre las propiedades medicinales del propóleo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de un propóleo de Oaxaca. Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar. Se determinó la actividad del propóleo sobre la curva de crecimiento bacteriano determinando que tuvo una actividad bacteriostática sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*.

Así mismo se determinó la actividad antioxidante por medio del método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) para obtener la capacidad antioxidante media ( $CA_{50}$ ), el resultado fue de 55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Por otro lado, se realizó la caracterización química de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana mediante un Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Para el propóleo de Oaxaca se identificaron mediante HPLC-DAD 4 compuestos que forman parte del extracto: Pinocebrina, Catequina, Catecol y Crisina. En cuanto a los compuestos que se identificaron mediante este análisis se pueden identificar también los compuestos principales, estos son Pinocebrina, fenoles, isoflavonas y flavonoides. En la bibliografía se tienen datos sobre la actividad antimicrobiana de los compuestos antes mencionados.

Palabras clave: Propóleos, actividad antibacteriana, extracto

## Introducción.

Las enfermedades respiratorias y diarreicas ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo. Debido a la frecuencia con que se presentan estas enfermedades, la prescripción y la automedicación de antibióticos para las mismas se ve favorecida. (Solórzano, 1998)

Las enfermedades diarreicas provocan anualmente casi dos millones de muertes de menores de cinco años, lo que las coloca en el segundo lugar entre las causas principales de mortalidad infantil a nivel mundial (OMS, 2017). En México durante 2012 se situó como la segunda causa de morbilidad y el número diecinueve en mortalidad general. La población menor es la más afectada, principalmente en comunidades con el menor índice de desarrollo humano (Cenaprece, 2012)

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud mundial que se encuentra en constante evolución. Este fenómeno es de selección natural por mutaciones al azar y se transmite de bacteria a bacteria mediante genes de resistencia a través de la transferencia horizontal de material genético por intercambio de plásmidos, transposones o secuencias de inserción. Esta capacidad de las bacterias ya existía desde antes del descubrimiento y utilización de los antimicrobianos, pero con la introducción de estos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, dicha selección natural ha tenido un surgimiento. Debido a lo que se llama “presión selectiva” por el uso indiscriminado de los antibióticos en contra de las bacterias. La resistencia a los antibióticos en una bacteria causante de enfermedades infecciosas disminuye las posibilidades de obtener la cura clínica y la erradicación bacteriológica aumentando los costos de tratamiento, la morbilidad y la mortalidad, por lo que es importante encontrar un tratamiento adecuado (Rodríguez Noriega et al., 2014)

Como una alternativa a esta problemática, el empleo de sustancias naturales para el tratamiento de diversas enfermedades podría resultar beneficiosa. A pesar de que muchos microorganismos brindan cierta resistencia para tratar estas infecciones. Actualmente, el propóleo está siendo ampliamente utilizado en la medicina tradicional por sus reconocidas propiedades terapéuticas entre las cuales destacan: la actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante (Kumazawa et al., 2004). Por lo que resulta de suma importancia el estudio de este producto, para comprobar sus actividades farmacológicas y encontrar las moléculas responsables de dichas propiedades.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso que además de tener importancia ecológica son producidos cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas como depredación, ataque por microorganismos, y competencia por suelo, luz y nutrientes (Sepúlveda- Jiménez, 2004). El propóleo tiene en su composición muchos de estos metabolitos secundarios y por ello es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se le atribuyen efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular. Los flavonoides y los ácidos fenólicos, además de ser tóxicos para las levaduras, inhiben la actividad enzimática de la hialuronidasa. Al estudiar la actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) y antiviral (*Avia influenza*) de propóleo de diferente origen geográfico, se comprueba que todos son activos frente a hongos y cepas bacterianas Gram positivas. En las muestras procedentes de zonas templadas esta actividad se atribuye a sus contenidos en ésteres y ácidos fenólicos, componentes de los que carece el propóleo de origen tropical que, sin embargo, muestra una actividad similar por su contenido en derivados carbono prenilados del ácido p-cumárico (Farré et al., 2004).

En México el propóleo es utilizado como auxiliar en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias, en productos cosméticos principalmente cremas, y como suplementos alimenticios, sin embargo, hasta ahora son escasos los estudios químicos y biológicos que puedan avalar la efectividad medicinal en el uso tradicional de los propóleos mexicanos (Vargas et al., 2014)

El propóleo es un material resinoso resultante de la mezcla de enzimas salivales de las abejas con materiales de carácter lipofílico recolectados a partir de las yemas y grietas de la corteza de diversas plantas (olmo, álamo, sauce, abedul, pino, abeto, roble y algunas herbáceas). Su coloración varía dependiendo de su origen botánico y edad (Jean-Prost, 2007). No sólo constituye un material de construcción, su mayor importancia es ser el “arma química” de las abejas en contra de los microorganismos patógenos, ya que al barnizar con propóleo las paredes de su colmena favorecen en ella la desinfección (Farré et al., 2004)

Gracias a su contenido en aceites esenciales el propóleo suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (En el interior de la colmena este se emplea como cemento o bálsamo, para soldar panales entre sí y paredes). También lo usan para reparar fisuras y estrechar las entradas de su morada, optimizando así el control del microclima de la colonia. Recubren los cuerpos extraños que no pueden retirar (ratones, abejorros, etc.) (Jean-Prost ,2007) El propóleo se compone de resinas (50%), cera de abejas (30), aceites esenciales (5%). Este posee actividad antiinflamatoria,

antioxidante y antibacterial. Tanto la miel como el propóleo varían en su composición química según la región geográfica donde se encuentren.

El interés del hombre por las colmenas se remota miles de años atrás. La apicultura es una actividad de creciente importancia en el mundo, debido a la gran variedad de productos naturales que ofrece y a la fuerte tendencia del hombre a consumir productos mínimamente procesados. El cuidado y aprovechamiento de los productos de las abejas en México, se remonta a épocas prehispánicas, donde las diferentes culturas existentes tales como los Mayas, Tarascos, Lacandones, Olmecas y Popolucas cultivaban las abejas sin aguijón (Meliponinos), con fines alimenticios, medicinales y religiosos (Echazarreta y Quezada-Euan, 2002)

Si bien la miel es el producto apícola de más antiguo uso, existen otros de gran interés para el hombre como lo son: la cera, polen, jalea real, veneno y el propóleo. Este último Etimológicamente deriva de los vocablos griegos “Pro” (defensa de) y “polis” (ciudad) (Ramírez et al., 2001). En el pasado el propóleo también llamado “El oro purpura de las abejas”, constituía un obstáculo para los apicultores dada su naturaleza pegajosa. Con el tiempo su valor fue cambiando, hasta llegar a constituir uno de los productos más valiosos que producen las abejas, su empleo está descrito por griegos, egipcios, romanos e incas (Guerrero, 2013)

Los productos de la colmena (miel, propóleo, polen, jalea real, veneno de abejas se han utilizado desde tiempos ancestrales con múltiples finalidades. La composición de estos productos se ha estudiado y, se han encontrado posibles mecanismos, a través de los cuales puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades.

El veneno de abejas está compuesto por al menos 18 compuestos con actividad farmacológica incluyendo enzimas, péptidos y aminos biogénicas. Los modelos realizados en animales han permitido establecer que la aplicación del veneno no produce alteraciones graves en las funciones corporales y, al contrario, posee actividades analgésicas y antiinflamatorias. Su utilidad en enfermedades como la artrosis y dolor crónico ya se ha descrito.

La miel de abeja es un fluido dulce y viscoso producto de la transformación enzimática que hacen las abejas del néctar de las flores. Está compuesta en su mayor proporción por carbohidratos (79%), agua (20%), y otros componentes como oligoelementos, proteínas, vitaminas, enzimas, entre otros. Se ha estudiado su utilidad para el manejo de la tos, cuidado de las heridas y trastorno del colesterol.

La jalea real es un producto viscoso y es el alimento de las larvas jóvenes y la abeja reina. Está compuesta por agua, azúcares, proteínas, lípidos, aminoácidos y vitaminas. La jalea

real sensibiliza las células a la acción de la insulina y podría mejorar el perfil lipídico. El polen está compuesto por agua, glucosa, fructuosa, aminoácidos, lípidos y carotenoides. Popularmente se utiliza como suplemento nutricional y en el manejo del estreñimiento. (Mizugay et al., 2018)

Los flavonoides, junto con los ácidos fenólicos y sus esterés, genéticamente denominados compuestos fenólicos, son actualmente considerados los principales componentes bioactivos del propóleo. Ambos absorben radiación en la región UV del espectro electromagnético protegiendo de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles.

Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo. La estructura más sencilla es la del ácido benzoico, pero con otros sustituyentes en el anillo se forman ácidos fenólicos como el cafeico, ferúlico, camarico y cinámico, comunes en los vegetales y en el propóleo. Dicha composición les proporciona propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales. Además, a algunos esterés de ácidos fenólicos se les atribuye propiedades antitumorales.

Se puede considerar que los flavonoides están conformados por una estructura básica que consiste en 2 anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de 3 átomos de carbono a la que se le pueden adicionar grupos tales como oxhidrilos, metilos, azúcares, etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides tales como flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides. Estos compuestos tienen importantes propiedades antioxidantes, ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. (Bedascarrasburre et al., 2004).

La muestra de propóleo que se estudió en este trabajo provino de un apiario del estado de Oaxaca. El cual cuenta con una rica biodiversidad con 8, 431 plantas vasculares y contribuye a un 5,2% de la producción nacional de miel. Para la región se han registrado 66 taxas pertenecientes a 23 familias. La región se distingue por tener mieles ámbar y ámbar clara, que por su presentación tiene alta demanda en el mercado europeo (Ramírez et al., 2011).

### **Antecedentes.**

Estudios farmacológicos del propóleo, han permitido demostrar que tanto su actividad biológica como su potencia están relacionadas con su composición química. Esta composición es altamente variable y se encuentra íntimamente ligada con la zona geográfica, la vegetación y la forma de recolección.

En este marco de referencia, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en determinar la composición química, la capacidad antioxidante y actividad antibacteriana de propóleos provenientes de diferentes entidades del país

Londoño et al. 2010, elaboraron un estudio en el cual evaluaron extractos obtenidos de 3 plantas mexicanas y probados en 2 bacterias Gram positivas y 8 Gram negativas. Teniendo como resultado que el extracto de propóleo y hexano obtuvo una CMI de 0.125 mg/mL para *S. aureus*, *S. epidermis*, *V. cholerae*, mientras que el extracto con etanol tuvo una CMI <0.125 mg/mL para el mismo grupo de bacterias, la actividad se encuentra asociada a los flavonoides que forma parte de la composición del propóleo.

Carrillo et al. 2011, evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acuosos de propóleos recolectados en la Huasteca Potosina, México. Utilizando cepas de microorganismos Gram negativos *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* *Klebsiella pneumoniae* y microorganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*. La concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico fue 0.93 mg/mL para los Gram positivos y 7.5 mg/mL para las Gram negativas., en el extracto acuoso fue 20 mg/mL para Gram positivas y 30 mg/mL para Gram negativas.

Titau 2012, evaluó el potencial antioxidante y antimicrobiano de un propóleo recolectado en la zona rural del Distrito Federal reportando presencia de flavonoides 4,7-dimetilnaringenina, 4,7-dimetilapigenina y 3,5-dihidroxi-4,7-dimetoxiflavona, este último es uno de los compuestos responsables de la actividad antioxidante del extracto y que la posición del hidroxilo en posición C-3 es fundamental en dicha actividad. Los compuestos aislados presentan concentraciones mínimas inhibitorias sobre la bacteria *Streptococcus mutans* en un rango de 1000 a 1050µg/mL.

## **Justificación.**

Se han realizado estudios sobre diversas actividades biológicas de propóleos de diferentes estados de la República Mexicana (Chihuahua, Mexicali, Estado de México, Veracruz, etc.). En estos estudios se observó que la actividad biológica, (por ejemplo: antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, cicatrizante, etc.) depende del origen botánico de la muestra de propóleo. Continuando con la línea de investigación de nuestro grupo, se decidió evaluar la actividad antimicrobiana de una muestra de propóleo del estado de Oaxaca.

## **Objetivos.**

### **Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana de una muestra de propóleo de Oaxaca.

### **Objetivos Particulares**

Determinar el rendimiento del extracto metanólico de propóleo.

Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) por el método de microdilución en caldo.

Determinar la actividad bactericida o bacteriostática sobre la curva de crecimiento bacteriano.

Determinar la actividad antifúngica en cepas de hongos filamentosos por medio de la inhibición del crecimiento radial.

Determinar la capacidad antioxidante utilizando el radical DPPH.

Realizar un análisis fitoquímico de la muestra de propóleo (CG-EM y HPLC-DAD).

## **Material y métodos**

### **Colecta del material**

El propóleo se obtuvo de un apiario del estado de Oaxaca, Municipio Candelaria Loxicha, Santiago La Galera (Apéndice 1). Las características organolépticas del propóleo se tomaron con base a lo publicado en la NOM-003-SAG/GAN-2017 (cuadro 1)

Cuadro 1. Especificaciones físicas de un propóleo NOM-003-SAG/GAN-2017

Parámetros	Características
Color	Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, variando conforme a su origen botánico.
Aroma	Resinoso (olor a madera) o balsámico (olor a cera) o balsámico, dependiendo de su origen botánico.
Sabor	Variable, de suave balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.
Consistencia	A temperatura ambiente maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico.

### Obtención del extracto metanólico.

El extracto metanólico se llevó a cabo por el método de maceración (Domínguez, 1973). El material colectado se limpió para retirar la basura que tenía, así como restos de abejas u otros insectos, cera, ramas, etc. Fue pesado (95.5g) y colocado en un matraz con 300mL de metanol (Figura 1), para posteriormente obtener el extracto metanólico, el cual se filtró y fue destilado a presión reducida en un rotavapor (Figura 2). El rendimiento del extracto se determinó con relación al peso seco del propóleo (Figura3) (Apéndice 2).



Figura 1. Maceración del propóleo



Figura 2. Destilación del extracto metanólico, en el rotavapor



Figura 3. Extracto metanólico

### **Actividad antibacteriana**

#### **Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.**

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer. En el cual los discos fueron impregnados con 2000µg del extracto a probar; como control positivo se utilizaron discos de 25µg de cloranfenicol, y como control negativo se utilizaron discos con 10µL del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (VandenBerghe y Vlietink, 1991) (Apéndice3).

**Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.** Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó la microtécnica de dilución en caldo. Las concentraciones utilizadas para los bioensayos fueron de: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.31 mg/mL. Las cajas se inocularon con 50µL de un cultivo bacteriano a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL y se incubaron durante 24 horas (Koneman et al., 1985) (Apéndice4).

#### **Actividad del propóleo sobre la curva de crecimiento bacteriano**

El efecto bactericida o bacteriostático del extracto se determinó sobre una curva de crecimiento bacteriano. Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa aquellas que presentaron los valores menores en las pruebas cuantitativas, es decir con una mayor susceptibilidad al extracto. Se monitoreó su crecimiento en nueve tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto (CMI,  $\frac{1}{2}$ CMI, CBM) y un grupo testigo (Muroi et al., 1993) (Apéndice 5).

Tipo	Cepa	*ATCC, clasificación o donadas
Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	12398
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35984
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	FES Cuautitlán
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CDBB-B-1533
	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	<i>Actinomyces viscosus</i>	WFCC 449
Gram negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDBB-B-999
	<i>Pantoea agglomerans</i>	CDBB-B-959
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDBB-B-958
	<i>Escherichia coli</i>	FES Iztacala (caso clínico 1)
	<i>Proteus mirabilis</i>	Hospital Ángeles (caso clínico)
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDBB-B1159
	<i>Salmonella typhi</i>	CDBB-B-1111

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

### Actividad antifúngica

Hongos filamentosos

### Evaluación cualitativa

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

### Cuadro 3. Cepas de hongos filamentosos utilizadas

Cepa	*ATCC, clasificación o donadas
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	NRL.3299
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CDBB-H-1112 Ceparío CINVESTAV
<i>Aspergillus sp</i>	FES Iztacala (Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz)
<i>Aspergillus niger</i>	CDBB-H-179 Ceparío CINVESTAV
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	CDBB-H-306 Ceparío CINVESTAV

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

### **Evaluación cuantitativa**

Para la determinación de la concentración fungicida media ( $CF_{50}$ ) y la concentración fungicida mínima (CFM), se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado (Wang y Bun, 2002). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron 2, 4, 8, 12, 16, 20 mg/mL., cada bioensayo se realizó por triplicado.

### **Capacidad antioxidante del extracto**

Se determinó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se cuantificó la Concentración Antioxidante media ( $CA_{50}$ ), utilizando las siguientes concentraciones: 200,300,400,500,600,700,800,900  $\mu\text{g/mL}$ . Como control positivo se utilizó catequina. Como blanco se utilizaron pozos con 200  $\mu\text{L}$  de MeOH grado HPLC (Murillo et al., 2006) (Apéndice 7).

### **Fenoles totales.**

Se cuantificó por el método modificado de Singleton y Rosi, 1965. La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría con base a una reacción de óxido-reducción, por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu. El extracto de referencia fue ácido gálico por su estabilidad y estructura fenólica. (Apéndice 8). El ensayo fue realizado por triplicado.

### **Flavonoides totales.**

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007). Donde 1 mL de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 2% en metanol se mezclaron con el mismo volumen del extracto en solución (2 mg/mL). El contenido total de flavonoides se determinó utilizando una curva de calibración con quercetina en una solución estándar de 1 mg/mL (1-100 ppm) (Apéndice9)

### **Toxicidad general.**

La toxicidad general se evaluó en el propóleo. Los ensayos se realizaron con larvas de nauplio II de *Artemia salina*, siguiendo el método de McLaughlin (1991), a concentraciones de 1000, 100, 10  $\mu\text{g/mL}$ . Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice10).

### **Caracterización química del extracto.**

Se realizó una caracterización química por medio de un análisis con una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD). Así como una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) (Apéndice 11 y 12).

### **Análisis estadístico.**

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

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

Todo el análisis realizado fue hecho con el paquete de cómputo estadístico Minitab versión 18.

### **Resultados.**

#### **Características organolépticas**

De forma cualitativa se observó que el propóleo de Oaxaca presentó las siguientes características (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características organolépticas del propóleo de Oaxaca obtenido del apiario del poblado de Santiago La Galera Municipio Candelaria Loxicha.

<b>Características</b>	
Color	Marrón
Aroma	Balsámico a café
Sabor	Picante
Consistencia	Maleable

#### **Rendimiento del propóleo**

Se colectaron y pesaron 95.5 g de propóleo (peso seco), de lo cual se obtuvo 26.41 g de extracto metanólico (rendimiento 27.7 %).

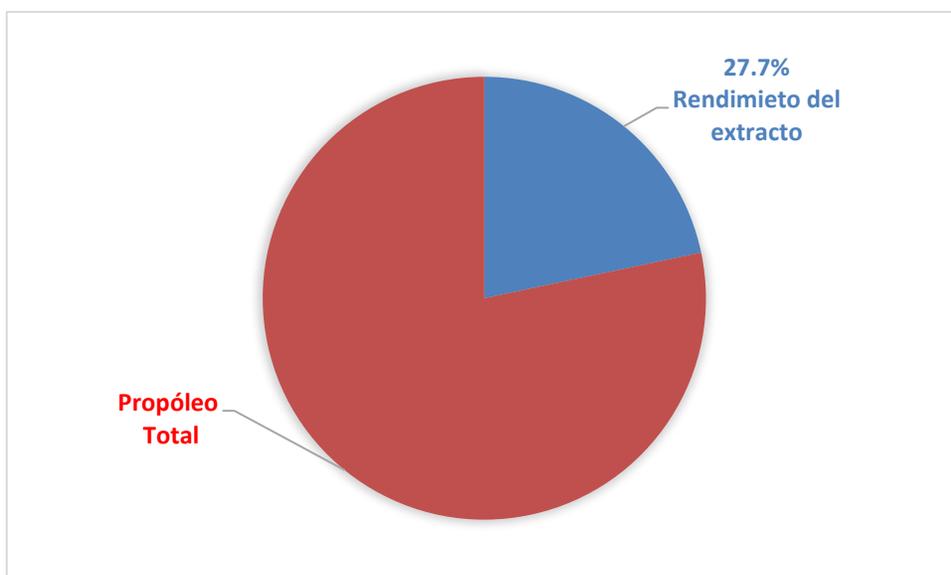


Figura 4. Rendimiento del extracto de propóleo de Oaxaca.

4Figura 4. Rendimiento del extracto de propóleo de Oaxaca.

## Actividad antibacteriana

### Evaluación cualitativa

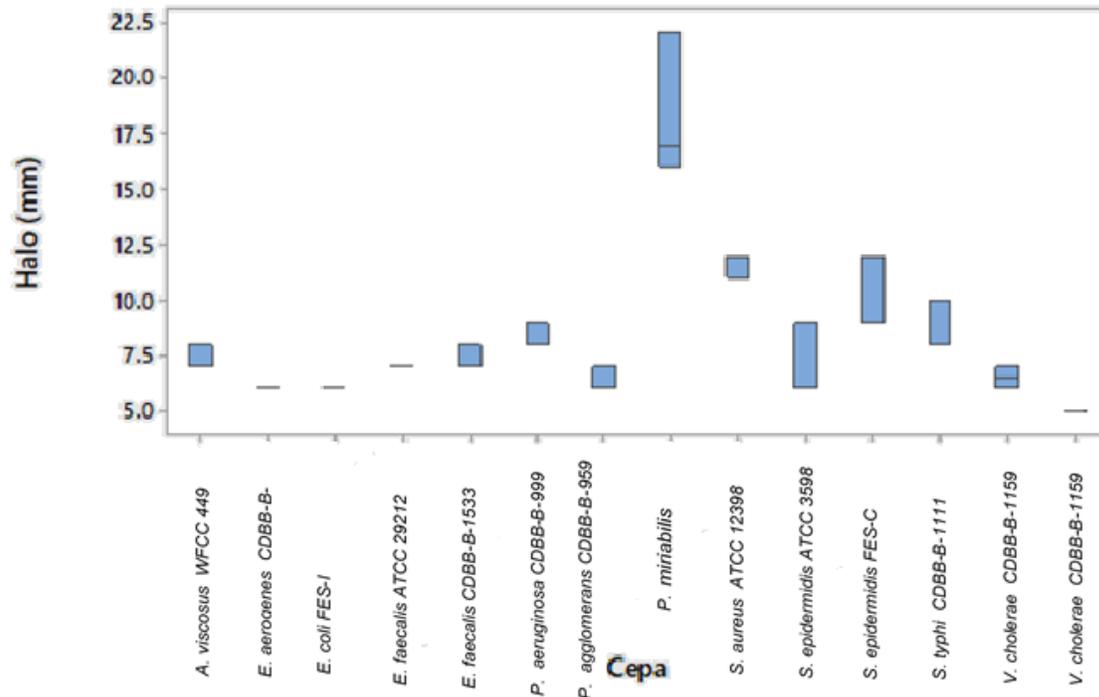
Como se puede observar en el cuadro 5, el propóleo mostró mayor actividad en las cepas Gram positivas con concentraciones de 2mg. El propóleo mostró actividad sobre las trece cepas bacterianas utilizadas. La bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 presentó los mayores halos de inhibición frente al extracto por parte de las bacterias Gram positivas y *Proteus mirabilis* por las bacterias Gram negativas.

CEPA Gram positivas	Diámetro halo de inhibición (mm)	CEPA Gram negativas	Diámetro halo de inhibición (mm)
<i>S.aureus</i> ATCC 12398	11.3 ± 0.57	<i>P.aeruginosa</i> CDBB-B-999	8.6 ± 0.58
<i>S.epidermidis</i> ATCC 35984	7.0 ± 1.73	<i>P.agglomerans</i> CDBB-B-959	6.6 ± 0.6

<i>S.epidermidis</i> FES-C	10.0 ± 1.73	<i>E.aerogenes</i> CDBB-B-958	6.0 ± 0
<i>E.faecalis</i> CDBB-B-1533	7.7 ± 0.6	<i>E. coli</i> CUSI	6.0 ± 0
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	7.0 ± 0	<i>P. miriabilis</i>	18.0 ± 3.0
<i>A.viscosus</i> WFCC 449	7.0 ± 0.6	<i>V.cholerae</i> CDBB-B1159	6.0 ± 1
		<i>S.typhi</i> CDBB-B-1111	8.7 ± 1.15

Cuadro 5. Halos de inhibición en las bacterias frente a una concentración de 2 mg del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca.

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



**Figura 5.** Sensibilidad de cada cepa bacteriana frente al propóleo de Oaxaca.

5Figura 5. Sensibilidad de cada cepa bacteriana frente al propóleo de Oaxaca.

frente al extracto del propóleo en la figura 4 se muestra el comportamiento de las diferentes cepas de bacterias, cabe destacar que para la bacteria *Proteus mirabilis* presentó los mayores halos de inhibición (17.0 mm) frente al extracto por parte de las Gram negativas, y en el caso de las Gram positivas fue *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 con una media de 11.0 mm y las cepas que mostraron los menores halos fueron: *E.aerogenes*, *E. coli*, y *E. faecalis* con medianas que van desde 5.0 a 6.0 mm.

El análisis de ANOVA mostró que existen diferencias significativas entre el extracto de propóleo y las 13 cepas a probar ( $F=20.06$ ,  $P=0.01$ )

## Evaluación cuantitativa

Al comprobar que las cepas fueron sensibles al extracto, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto de propóleo, los resultados indicaron las concentraciones a las cuales el extracto provocó un efecto inhibitorio, el cual refiere una mortalidad de la mayor parte de la población bacteriana, haciendo evidente una mayor sensibilidad en las cepas pertenecientes a las bacterias Gram positivas, tal como se observa en el cuadro 6.

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida Mínima (CBM) del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca para las cepas bacterianas.

<b>Bacteria</b>	<b>CMI (mg/mL)</b>	<b>CBM (mg/mL)</b>
<i>S.aureus</i> ATCC 12398	5.0	>20.0
<i>S.epidermidis</i> ATCC 35984	5.0	>20.0
<i>S.epidermidis</i> FES-C	1.25	>20.0
<i>E.fecalis</i> CDBB-B-1533	20.0	>20.0
<i>E.fecalis</i> ATCC 29212	5.0	>20.0
<i>A.viscosus</i> WFCC 449	1.25	2.5
<i>P.aeruginosa</i> CDBB-B-999	20.0	>20.0
<i>P. agglomerans</i> CDBB-B-959	5.0	10.0
<i>E.aerogenes</i> CDBB-B-958	20.0	>20.0
<i>E. coli</i> CUSI	20.0	>20.0
<i>P. mirabilis</i>	20.0	>20.0
<i>V.cholerae</i> CDBB-B1159	20.0	>20.0
<i>S.typhi</i> CDBB-B-1111	5.0	>20.0

CMI= Concentración Mínima Inhibitoria; CBM=Concentración Bactericida Mínima

La evaluación cuantitativa mostró que el propóleo del estado de Oaxaca exhibió los mejores resultados para *A. viscosus* reportando los valores más bajos para CMI (1.25mg/mL) y CBM (2.5 mg/mL), mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999 presentó una CMI (5mg/mL) y CBM (10 mg/mL).

### Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano.

Las cepas bacterianas tipo Gram positiva y negativa que se eligieron fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 y *Salmonella tiphy* CDBB-B-1111. Como se puede observar, la actividad que presentó el propóleo sobre la curva de letalidad a distintas concentraciones del propóleo fue de tipo bacteriostático tanto para la cepa de bacteria Gram positivas como para la Gram negativa (Figuras 6 y 7).

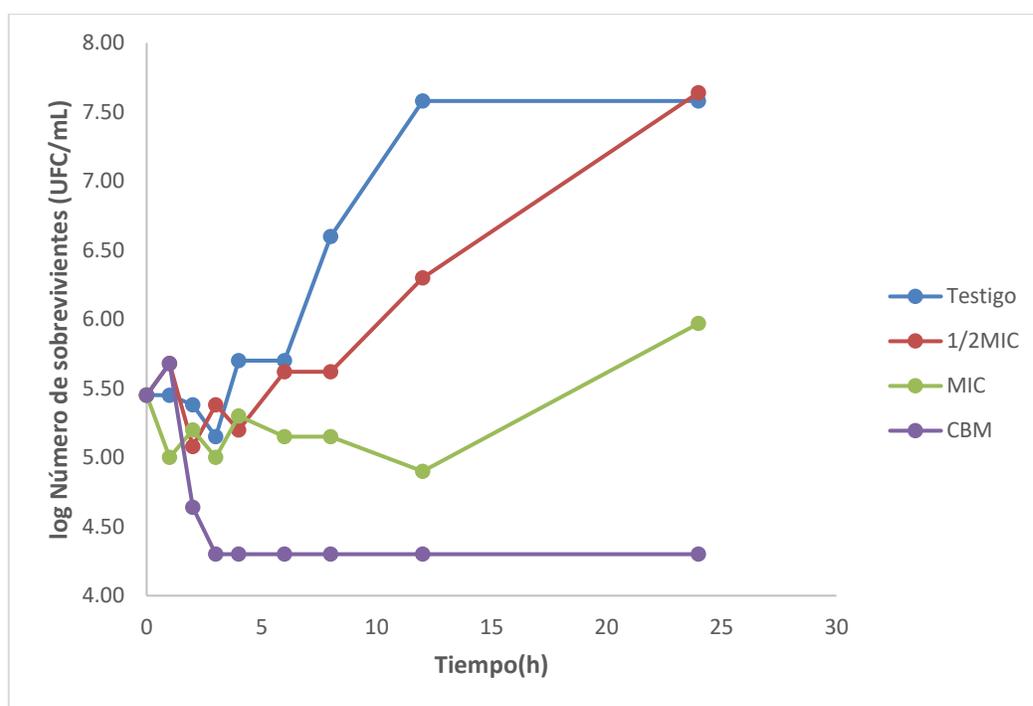


Figura 6. Curva de letalidad del propóleo sobre el crecimiento en *Staphylococcus aureus* ATCC 12398

6Figura 6. Curva de letalidad del propóleo sobre el crecimiento en *Staphylococcus aureus* ATCC 12398

Figura 7. Curva de letalidad del propóleo sobre el crecimiento en *Salmonella tiphy* CDBB-1111

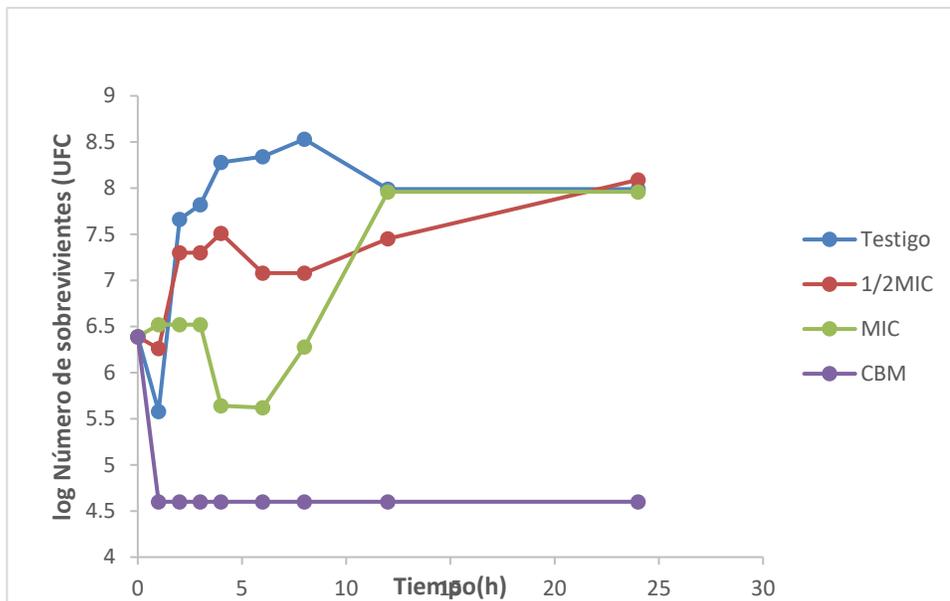


Figura 7. Curva de letalidad del propóleo sobre el crecimiento en *Salmonella tiphy* CDBB-1111

e observó actividad

sobre las mismas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Actividad del propóleo de Oaxaca sobre hongos filamentosos

<i>Fusarium sporotrichioides</i> NRL.3299	++
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	++
<i>Aspergillus</i> sp FES Iztacala	+
<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H-179	+
<i>Rhizoctonia lilacina</i> CDBB-H-306	+

Tabla 5. Actividad del propóleo de Oaxaca sobre hongos filamentosos

Resultados obtenidos a partir de tres repeticiones.

++: Mayor grado de inhibición; +: Menor grado de inhibición

### Evaluación cuantitativa

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

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

*Fusarium sporotrichioides* NRL.3299

Las concentraciones del extracto y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se pueden observar en el cuadro 8, en donde a partir de 2 mg/mL se observó un porcentaje de inhibición de 95.53%. En la figura 7 se observa el comportamiento del hongo frente al extracto.

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial sobre Cepas de Hongos filamentosos.

<b>Concentración del extracto de propóleo (mg/mL)</b>	<b>% de inhibición sobre <i>Fusarium sporotrichioides</i></b>	<b>% de inhibición sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	<b>% de inhibición sobre <i>Aspergillus niger</i></b>	<b>% de inhibición sobre <i>Rhizoctonia lilacina</i></b>
2.0	95.53	98.87	94.87	98
4.0	95.53	96.87	96.67	97.8
8.0	95.8	90.2	94.87	96
12.0	96.2	98.2	94.2	96.2
16.0	96.87	98.2	94.2	95.8
20.0	97.53	98.87	94	96.2

Tabla 6 Porcentajes de inhibición del crecimiento radial sobre Cepas de Hongos filamentosos.

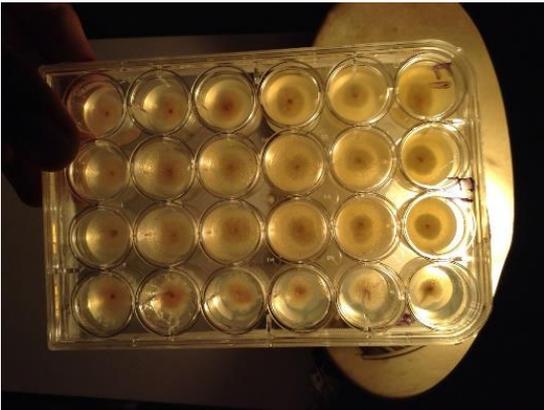


Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium sporotrichioides*

8Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium sporotrichioides*

En la figura 8 se muestra el comportamiento logarítmico de la inhibición del crecimiento radial del hongo frente al extracto.



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

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



Figura 10. Inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus niger*

10Figura 10. Inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus niger*



Figura 11. Inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia lilacina*

11Figura 11. Inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia lilacina*

### **Capacidad antioxidante del extracto.**

Dadas las propiedades biológicas mostradas, es sabido que algunas de ellas están relacionadas con los compuestos antioxidantes presentes en el propóleo. El extracto metanólico del propóleo presentó una capacidad antioxidante media ( $CA_{50}$ ) de  $55\mu\text{g/mL}$  obtenida a partir de la reducción en un 50% del radical DPP, el cual es un buen valor ya que en la NOM-003-SAG/GAN-2017 el parámetro mínimo es de 100 microgramos/mililitro (Figura 12).

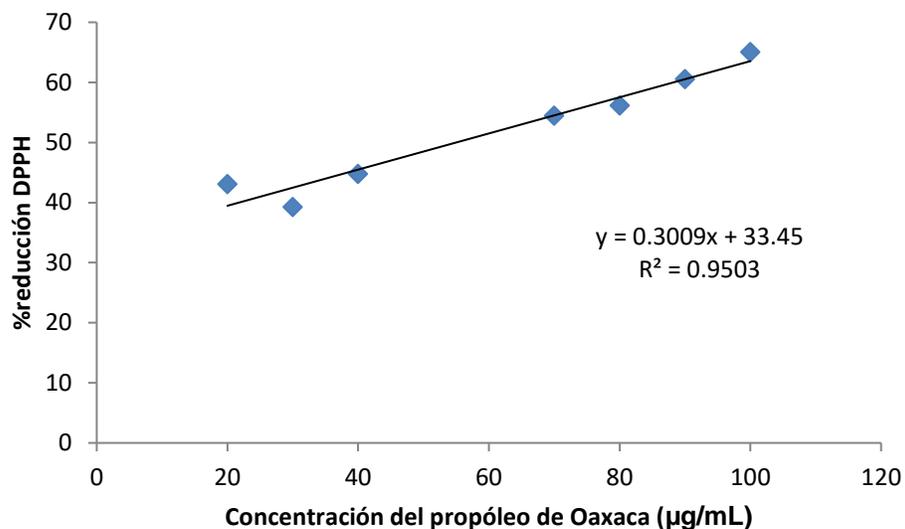


Figura 12. Reducción del radical DPPH por el extracto metanólico del propóleo

12 Figura 12. Reducción del radical DPPH por el extracto metanólico del propóleo

### Cuantificación de fenoles totales.

Los compuestos fenólicos están correlacionados en parte con la capacidad antioxidante mostrada, por lo cual se evaluó su contenido presente en el extracto metanólico del propóleo, obteniendo una concentración de 13.64 mg e AG/g (Figura 13).

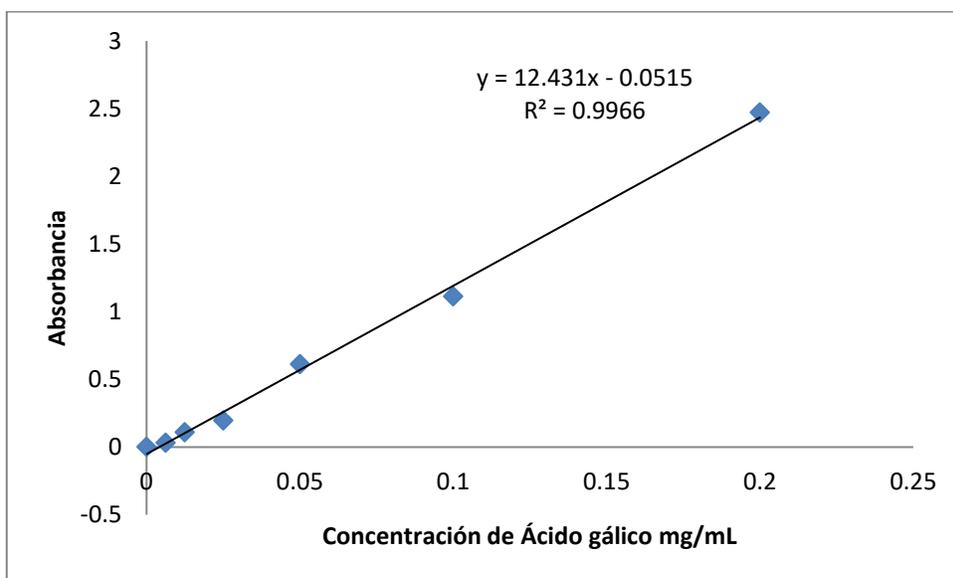


Figura 13. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales. El estándar empleado fue ácido gálico.

*13Figura 13. Curva patrón para el cálculo de fenoles totales. El estándar empleado fue ácido gálico.*

### Cuantificación de flavonoides totales.

El extracto metanólico de Oaxaca presentó flavonoides, el cual es un grupo perteneciente a los fenoles, con una estructura que le permite tener un poder antioxidante, para atrapar especies reactivas de oxígeno. Interpolando en la Figura 14 y haciendo el cálculo estequiométrico se obtuvo que el propóleo de Oaxaca contiene 139.24µg de equivalentes de quercetina/g.

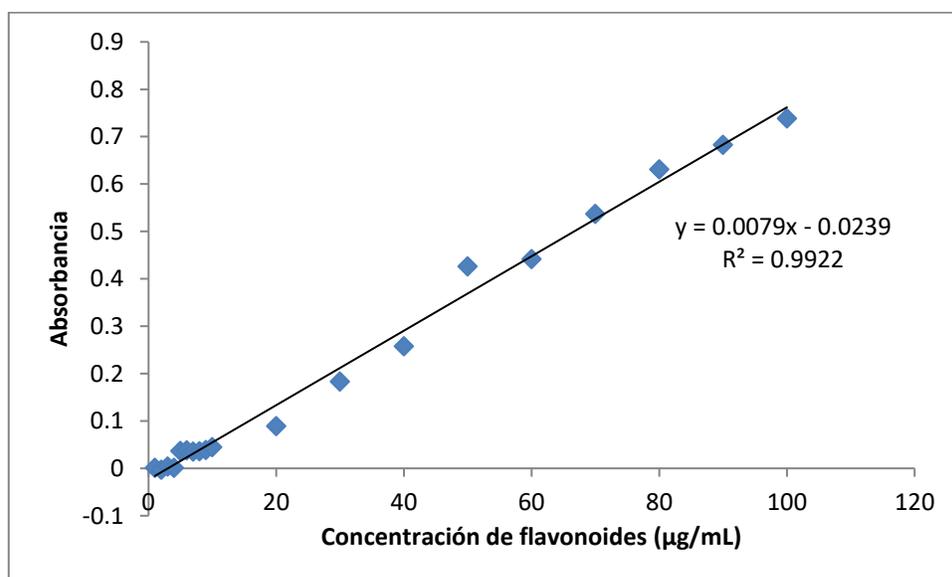


Figura 14. Curva patrón para el cálculo de flavonoides totales

*14Figura 14. Curva patrón para el cálculo de flavonoides totales*

### Toxicidad.

El resultado sobre la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto metanólico del propóleo sobre las larvas de nauplio de *Artemia* salina se muestra en el cuadro 9 y en la Figura 15. En la que se observa que el propóleo presenta una toxicidad moderada de acuerdo al criterio de McLaughlin(1991), el cual considera una toxicidad débil cuando la CL<sub>50</sub> está entre 1000 y

500 ppm, moderada cuando la  $CL_{50}$  está entre 100y 500 ppm y fuerte cuando la  $CL_{50}$  se extiende a partir de 0 a 100 ppm.

Cuadro 9. Concentración letal media del propóleo sobre las larvas de nauplio de *Artemia salina*

Extracto	CL <sub>50</sub> µg/mL
Propóleo	458.6

Tabla 7 Concentración letal media del propóleo sobre las larvas de nauplio de *Artemia salina*

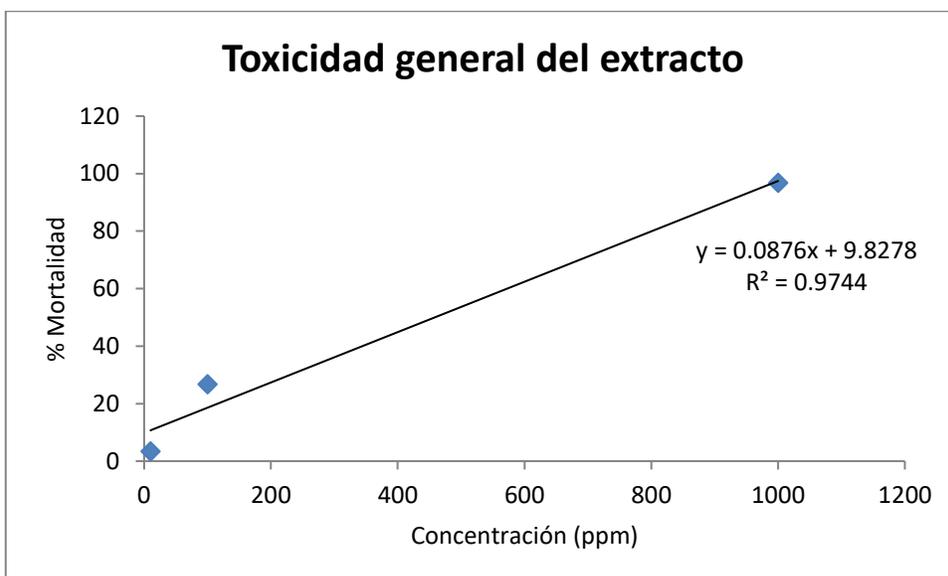


Figura 15. Toxicidad general del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca

### Caracterización Química.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC- DAD)

De acuerdo con los resultados del cromatograma (Figura 16), con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV y los datos de la base de datos, el extracto presentó los siguientes compuestos que se pueden ver en el (cuadro 15).

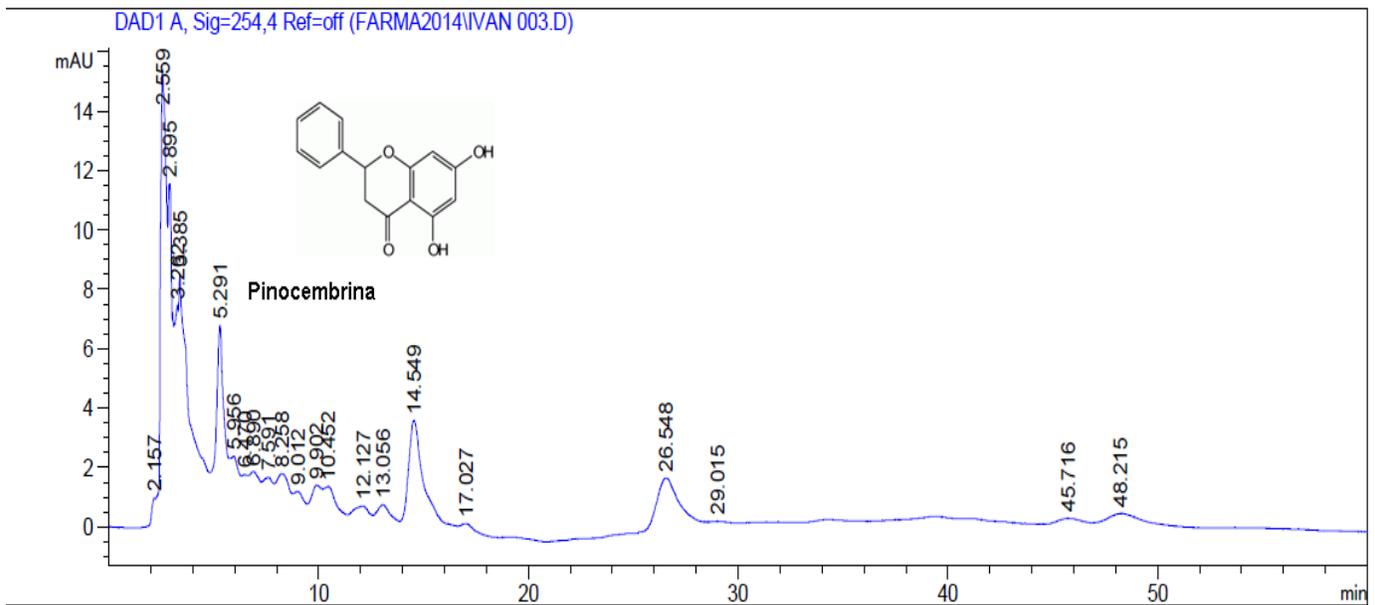


Figura 16. Cromatograma del HPLC del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca

16Figura 16. Cromatograma del HPLC del extracto metanólico del propóleo de Oaxaca

Cuadro 10. Tiempo de retención e índice de similitud del propóleo de Oaxaca.

No	Tiempo de retención (min)	Compuesto	%de similitud con el estándar
1	2.133	Catequina	89.8
2	2.573	Catequina	91.8
3	2.886	Catequina	91.6
4	3.046	Catequina	89.1
5	3.12	Catequina	88.8
6	3.26	Catequina	88.5
7	3.386	Catequina	88.9
8	5.393	Pinocembrina	93.7
9	5.946	Pinocembrina	89.8
10	6.473	Catecol	87.6
11	6.686	Catecol	88.3
12	7.58	Catecol	90.2
13	8.273	Catecol	87.5
14	9.006	Catecol	86.9
15	9.906	Catecol	82.8
16	10.453	Catecol	81.8
17	12.12	Catecol	80.2
18	13.06	No Identificado	No Identificado
19	14.56	Crisina	82.1
20	17.02	No Identificado	No Identificado

Tabla  
8Tiempo  
de

retención e índice de similitud del propóleo de Oaxaca.

### **Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM)**

El propóleo estudiado fue sometido a un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el cromatograma se muestra en la Figura 17, pudiéndose registrar 10 picos para la muestra de propóleo de Oaxaca, de los cuales ninguno pudo ser identificado con la base de datos del equipo, Biblioteca NIST ver 8.0.

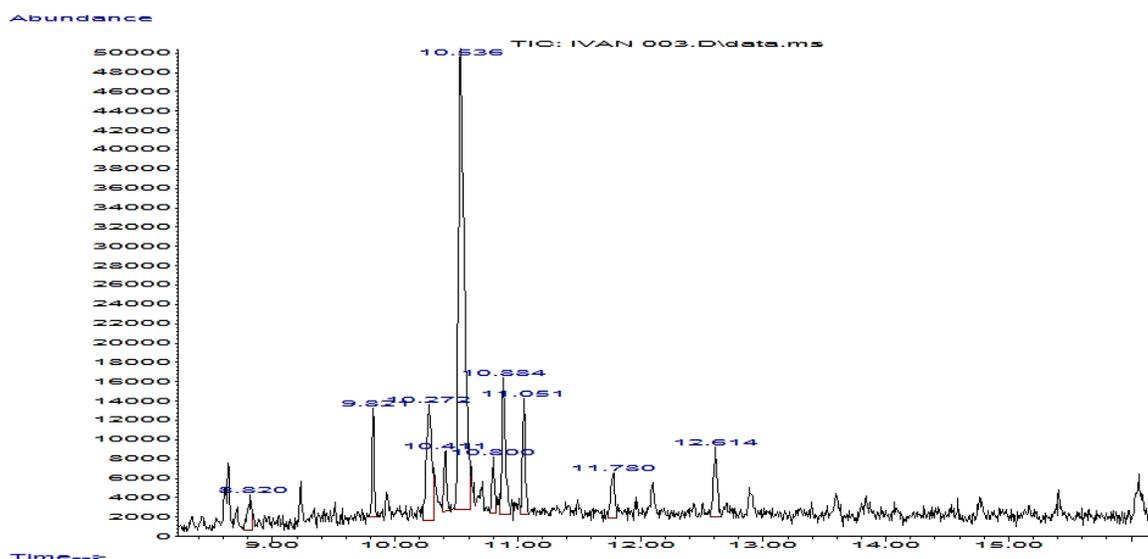


Figura 17. Cromatograma de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del propóleo de Oaxaca.

17Figura 17. Cromatograma de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del propóleo de Oaxaca.

## Discusión

En este trabajo se presenta por primera vez la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto del propóleo de Santiago La Galera.

En lo referente al rendimiento, el propóleo de Santiago La galera obtuvo un 27% cuyo valor está muy cercano al rendimiento reportado, para un propóleo del estado en trabajos anteriores se había reportado un rendimiento del 30 % en una muestra evaluada municipio de San Juan Bautista Cuicatlán (Rivera, 2013). En cuanto a las características el propóleo presenta un color marrón, con aroma a café, un sabor picante y de consistencia maleable. Existen informes acerca de la composición química del propóleo la cual varía de acuerdo con la región geográfica y sobre todo de la fuente vegetal de procedencia, dado el hecho básico, de que la abeja elabora el propóleo de acuerdo con sus necesidades y con la disponibilidad de materias primas vegetales (Chil et al., 2002)

El propóleo producido por *Apis mellifera* se caracteriza por presentar gran variedad de colores puede ser ocre, rojo, pardo, marrón claro o verde, algunos son friables y firmes, mientras que otros son gomosos y elásticos. El origen floral y composición depende en gran medida de las especies vegetales presentes en una zona. Por ejemplo, existe propóleo verde en Brasil y Chile central en donde predominan especies de *Baccharis dracunculifolia* y *B. linearis*, respectivamente. En Cuba existen propóleos donde predominan especies de *Clusia*.

En otras partes del mundo, los propóleos provienen de especies de los géneros *Acacia*, *Betula*, *Cistus*, *Pinus*, *Quercus*, *Salix*, *Ulmus*, *Xantorrhoea* (Peña, 2008).

Como anteriormente se había mencionado se determinó que el extracto presentó actividad tanto en bacterias Gram positivas como negativas, las cepas más sensibles fueron *P. mirabilis*, *S.epidermidis* FES-C y *S.typhi* mostrando halos de inhibición que van desde 6.0-17.0 mm de diámetro. Siendo *P. mirabilis* el de mayor halo. El análisis de Anova mostró que existen diferencias significativas entre el extracto de propóleo y las 13 cepas utilizadas ( $F=20.06$ ,  $P=0,01$ ). Esto concuerda con lo reportado por Londoño et al. 2010, quienes encontraron que bacterias como *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. typhi* mostraron ser las más sensibles presentando halos por encima de los 9.0 mm de diámetro. Rivera (2013) al evaluar los extractos de diferentes estados del país reporta que para el estado de Oaxaca las bacterias *S. aureus* y *V. cholerae* fueron sensibles al propóleo mostrando halos que oscilan entre los 6.0 y 7.0 mm de diámetro. Es importante mencionar que se han elaborado extractos acuosos y se han probado con bacterias tales como *S.typhi* , *S. aureus*, *E. coli.*, teniendo solo actividad sobre *S. aureus.*, Bucio-Villalobos et al. 2017, concluyen que los ingredientes activos del propóleo no son solubles en agua, por lo que se pierden en un proceso de extracción acuosa

Comparando los resultados obtenidos con la bibliografía, se observó que el propóleo de Santiago la Galera presentó valores de CMI y CBM similares a los descritos para extractos obtenidos en otras partes del mundo, que van de 0.2 a 12.0 mg/mL (Quintero et al., 2008). Las cepas más susceptibles fueron *S.aureus* ATCC 12398 y *S.epidermidis* ATCC 35984 en Gram positivas, para la Gram negativas fue *P.aeruginosa* CDBB-B-999 y *S.typhi* CDBB-B-1111. El estudio del propóleo durante los últimos años ha tenido una gran importancia, ya que se han encontrado un gran número de propiedades, las cuales han sido relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, sin embargo, y a pesar que en México el propóleo es empleado desde hace muchos años como parte de la medicina tradicional y de que existe una gran variedad de productos comerciales, son muy pocos los estudios que se han realizado a su actividad biológica (Londoño et al., 2010).

Por otro lado, se evaluó la actividad del propóleo sobre la curva de letalidad a distintas concentraciones del propóleo y se determinó que el extracto de propóleo es bacteriostático para ambas bacterias *S. aureus* y *S. thypi*. Aunque los trabajos reportados no explican la causa de una mayor actividad biológica del extracto de propóleo sobre las Gram positivas, ésto podría deberse a las diferencias en la composición de las paredes celulares de cada grupo de bacterias. La pared celular en las Gram negativas está recubierta por una membrana externa que influye notablemente en la resistencia frente a varios antibióticos, sobre todo a los que actúan sobre la pared de peptidoglicanos, mientras que la pared en las

Gram positivas ejerce un efecto protector o de resistencia contra numerosos antibióticos que tiene que atravesar esta estructura para llegar a su interior y ejercer su efecto antibacteriano. Sin embargo, el mantenimiento de esta estructura se convierte en el punto de ataque de varios antibióticos, afectando fácilmente en la viabilidad de estas bacterias y creando una susceptibilidad diferente a los mismos entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esta diferencia puede contribuir a la sensibilidad de este grupo de bacterias a la acción de los principios activos del propóleo (Carrillo et al., 2011). Se ha propuesto que las proporciones de ácido caféico, los flavonoides y los ésteres fenólicos son los principales responsables de la actividad biológica (Londoño et al., 2010), lo cual coincide con los fenoles y flavonoides cuantificados en el presente estudio.

Con respecto a la actividad antifúngica del extracto metanólico del propóleo, se encontró que fue activo sobre cinco cepas de hongos filamentosos (Cuadro9). De acuerdo con lo obtenido en las pruebas cuantitativas, el extracto metanólico tuvo actividad sobre *T. mentagrophytes* CDBB-1112, el cual es un hongo dermatofito causante del pie de atleta, dicho extracto presentó un 96.0% de inhibición sobre este hongo desde la concentración más baja (2.0 mg/mL), además es importante mencionar que el extracto no sólo tuvo inhibición en *T. mentagrophytes* sino que también presentó el 96% de inhibición en *Fusarium sporotrichiodes* con una concentración de (2.0 mg/mL), el cual es un hongo patógeno que se presenta principalmente en las plantas responsable de dañar los cultivos por lo que tiene una notable importancia agrícola y económica. La cepa menos sensible fue *Aspergillus niger* CDBB-H-179 la cual presentó un 94% de inhibición en la concentración más baja 2.0 mg/mL). Esta actividad antifúngica del propóleo depende de su composición química y esta última está determinada por su origen botánico (García, 2013).

El extracto metanólico del propóleo mostró un total de compuestos fenólicos de 13.64 mg eAG/g y 139.24 µg (eQ)/g de flavonoides, esto es importante pues va relacionado con la capacidad antioxidante donde mostró una CA<sub>50</sub> media de 55.0 µg/mL. Es importante mencionar que el extracto metanólico del propóleo es una mezcla de varios compuestos que actúan en conjunto. Entre estos compuestos, los fenilpropanoides (ácido fenólico, flavonas, flavononas, etc) juegan un papel determinante en la capacidad antioxidante, debido a su estructura química. Lugo Sepúlveda en 2009 identifico los principales flavonoides identificados en el extracto de *Enceclia farinosa* fueron pinocembrina, crisina y galangina. Comparando los flavonoides presentes en la planta de *Enceclia farinosa* con los propóleos sonorenses se concluye que las abejas del género de *Apis mellifera* recolectan partículas de esta planta para su producción (Lugo Sepúlveda et al., 2009).

De acuerdo con los resultados obtenidos de la toxicidad general del extracto de propóleo, se encontró que, de acuerdo con Niño et al. (2006), el extracto crudo de propóleo es moderadamente tóxico, pues utilizando cantidades pequeñas como 0.010 mg/mL del extracto aún quedaban con vida algunas larvas. Es importante mencionar que las larvas de

*Artemia salina*. Se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de la bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (Pino et al., 2010)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD), mostró que el extracto de propóleo de Oaxaca posee compuestos como, Pinocebrina, Crisina, Catecol, y catequina, dichos compuestos deben su actividad a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares (Domingo y López-Brea, 2003). Por otra parte, en un estudio sobre 21 muestras de propóleos mexicanos de diferentes estados de la República, se determinó la presencia de 8 flavonoides específicos, el análisis se realizó de acuerdo con su peso molecular exacto, los flavonoides utilizados fueron: Acacetina, Pinocebrina, Crisina, Apigenina, 4',7- Dimetilapigenina, 4', 7 Dimetilnaringenina, Alpinetina y Galangina. Cabe señalar que la crisina se presentó en 19 de las muestras y la Pinocebrina se muestra sólo en un apiario de Tlaxcala (Duarte Lisci., et al. 2017).

El análisis del cromatograma de gases masas mostró que se detectaron 10 picos, pero en el espectro de masas ninguno coincide con la base de datos del equipo. El mayor problema que existe con el propóleo, a pesar de contar con grandes avances tecnológicos que permiten conocer la composición química de una muestra determinada, es la variabilidad en su composición química, la cual es dependiente del sitio de colecta, de los diferentes ecosistemas, de la época del año y de las secreciones que sirven como fuente de dicha resina (Huang et al., 2014)

## **Conclusiones.**

El extracto metanólico de propóleo tiene actividad antibacteriana, sobre Gram positivas y Gram negativas, así como también presentó una inhibición en hongos filamentosos.

El extracto es bacteriostático sobre *S.aureus* y *S. tiphy*.

El extracto presenta una cantidad importante de compuestos fenólicos totales y flavonoides

El compuesto de mayor abundancia detectado en HPLC fue Pinocebrina.

El extracto presento una toxicidad moderada.

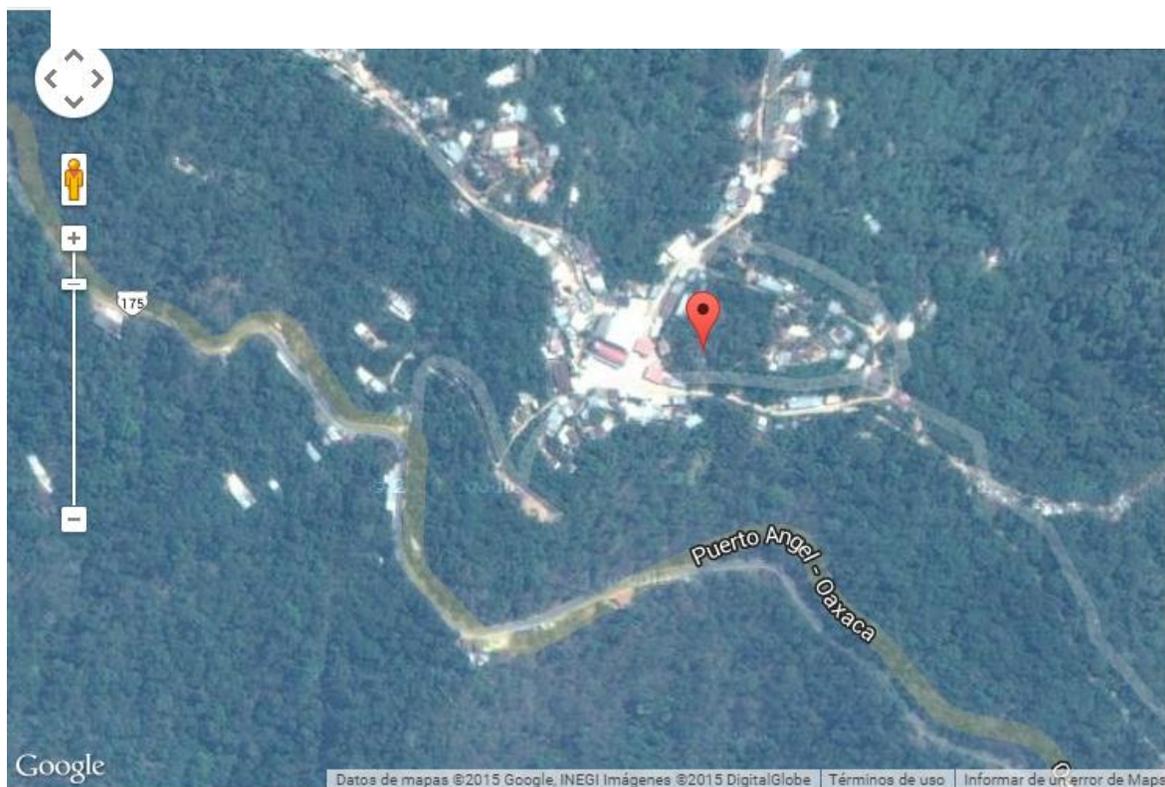
## APÉNDICE 1

### Zona de colecta

El propóleo se obtuvo en greña (propóleo en bruto) y fue colectado en un apiario de Oaxaca en Junio de 2014 y antes de ser procesado se conservó en oscuridad y a temperatura ambiente.

El apiario donde se realizó la colecta del propóleo se encuentra en el municipio de Santiago la Galera en el estado de Oaxaca que se ubica a una latitud  $15^{\circ} 58' 20''$ , longitud  $96^{\circ} 28' 42''$ , altitud 1,285 msnm. Este municipio cuenta con bosques de encino, además de *Bursera simaruba*, *Ceiba sp*, *Cletrha mexicana*, *Lonchocarpus sp*

Figura 18. Ubicación del apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Oaxaca



18Figura 18. Ubicación del apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Oaxaca

## APÉNDICE 2

### Técnica de Maceración

(Domínguez, 1973)

El propóleo en greña se pesa e introduce en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se le agrega una cantidad de solvente necesaria, donde el propóleo esté cubierto y el líquido esté por encima (99.7g de muestra de propóleo en 1L de solvente), el recipiente es cubierto para evitar la evaporación del solvente.

El propóleo se deja reposar como mínimo 1 día y máximo 2 semanas, teniendo en cuenta que la extracción de los compuestos se verá reflejando en la coloración del líquido, entre más oscuro esté mayor rendimiento tendrá el propóleo.

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

## APÉNDICE 3

### Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer

(Vanden Berghe D. A. y Vlietinck A. J. 1991)

**Medio.** Se utilizará como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton, debido a que promueve el desarrollo de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es recomendable que el agar tenga un espesor uniforme en la placa de 4 mm, ya que, si este es más fino, el antibiótico tiende a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; y por lo contrario un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

**Inóculo.** Con un asa de siembra estéril se tocaron las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de apariencia semejante. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton, se enjuaga bien el líquido para descargar bien todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo a 37° C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del

medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml.

El estándar No. 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de cloruro de bario a 99.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.36 N. La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca, o por medio de espectrofotómetro a 600 nm.

Si la suspensión de los organismos se ve más turbia que el estándar, se agrega solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Posteriormente se sumerge un segundo hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana antes de retirarlos se elimina el exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra en estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de por lo menos  $60^\circ$  luego de cada estría.

**Control positivo.** Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con un antibiótico conocido (cloranfenicol  $25\mu\text{g}/\text{disco}$ ).

**Incubación.** Ya que las cajas con agar están preparadas para las pruebas de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a  $35^\circ\text{C}$ , sin mayor tensión de  $\text{CO}_2$ . Esto es importante ya que el  $\text{CO}_2$  puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso en el pH. El desarrollo de microorganismos es inhibido por el pH ácido, lo cual puede provocar una estrechez en la inhibición. Así como la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciendo diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones en las zonas de inhibición.

**Interpretación de resultados.** Las zonas de inhibición se miden con una regla calibrada en mm. En todos los casos la prueba se realizará por triplicado y los valores promedio se reportan en mm.

## **APÉNDICE 4**

### **Microtécnica de dilución en caldo**

(Koneman, 1996)

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en agar, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica (placas de ELISA). La microplaca se prepara colocando 50  $\mu$ L de caldo Müeller-Hinton con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se prepara una suspensión bacteriana con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar Nº 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL, de esta suspensión se toman 0.01 mL y se le adicionan a 9.99 mL de caldo Müeller-Hinton obteniéndose así una concentración de  $10^5$  bacterias/mL. Cada concavidad se inocula con 50  $\mu$ L de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se le añaden 50  $\mu$ L de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08 % a cada concavidad, se incuba por 30 minutos a 37 °C. En las concavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazán de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

## APÉNDICE 5

### Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano

(Muroi et al., 1993)

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

- Medio: se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. El medio se coloca en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4mm.
- Inóculo: Se prepara el inóculo con aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación).  
Con ayuda de una micropipeta, se inocula 0.01mL de la suspensión bacteriana en los tubos que con tienen los extractos a evaluar. La concentración final es aproximadamente de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se incuba en una estufa a 35 °C sin presión de CO<sub>2</sub>.
- Aplicación de sustancias: Se prepara en tubos con 10mL de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de CMI,  $\frac{1}{2}$  CMI y CBM. Se muestrea cada hora en los primeros 4 tiempos: T0-0, T1-1. T2-2. T3-3, T4-4(tiempo-horas transcurridas), después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 horas y finalmente a las 24 horas. En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina para determinar las unidades formadoras de colonia en cada tubo.
- Testigo: Se prepara un tubo sin extracto como testigo.
- Incubación: Las cajas se incuban durante 24 horas a 35°C

- Interpretación de resultados: Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el logaritmo base 10 del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

## APÉNDICE 6

### **Método de cultivo de inhibición del crecimiento radial**

(Wang y Bun, 2002).

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas Petri (100 x 15mm) que contengan 30 mL de agar de papa dextrosa (PDA), en el cual se inocula el micelio del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Si el primer ensayo es con un extracto crudo, se recomienda usar concentraciones grandes de activo (1-2 mg por disco). Los discos se colocan a una distancia de 30 mm del límite micelial.

**Incubación.** Las placas son incubadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

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

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

**Interpretación de resultados.** En el caso de existir zonas de inhibición se reportará el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se hará por triplicado.

## APÉNDICE 7

### Actividad antioxidante

(Murillo, 2006).

La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm), por medio de espectrofotometría UV-VIS. En una placa de ELISA se adicionarán 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 µM; inmediatamente se protege de la luz y se mantendrá en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 540nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el control negativo fue aplicando 200µL de metanol en los pozos y como control positivo se usa quercetina.

### Interpretación de Resultados

Los resultados fueron reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control (DPPH con metanol)

E= Absorbancia del experimental

(Mezcla DPPH + compuesto problema).

## APÉNDICE 8

### Contenido de Fenoles Totales (CFT)

(Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación  $6^+$ . La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre  $5^+$  y  $6^+$ , formando una solución azul.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que, por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales (Aguilar et al., 2003).

Se utiliza una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL. Cuadro 16.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.5 mg/mL), se toma una alícuota de 250  $\mu$ L de esta y se agregan 750  $\mu$ L de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se toma 1mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 6mL de agua destilada a continuación se adicionan 500  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10mL.

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

Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

**Cuadro16. Curva patrón para fenoles totales**

<b>Tubo</b>	<b>[Ácido gálico] mg/mL</b>	<b>µL patrón</b>	<b>µL agua destilada</b>	<b>mL Agua destilada</b>
<b>1</b>	0.00625	31.25 ñ	968.75 (968.5)	7
<b>2</b>	0.0125	62.5	937.5	7
<b>3</b>	0.025	125	875	7
<b>4</b>	0.05	250	750	7
<b>5</b>	0.1	500	500	7
<b>6</b>	0.2	1000	0	7
<b>P (problema)</b>	-	250	750	7

## **APÉNDICE 9**

### **Cuantificación de flavonoides Totales**

#### **(Método de Dowd modificado de Praveen y Awang, 2007)**

La concentración de flavonoides se mide por espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ). El catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides en metanol, produciendo en el análisis espectrofotométrico un desvío a longitudes de onda más largas y una intensificación de la absorción. Por lo tanto, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, en particular los ácidos fenólicos que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Esto se hace en un espectrofotómetro a 425 nm utilizando cloruro de aluminio al 2 % en metanol. En estas condiciones, el complejo flavonoide-aluminio absorbe a una longitud mucho mayor que el flavonoide sin presencia del agente complejante. Los ácidos fenólicos, incluidos los que forman complejos con  $AlCl_3$  absorben longitudes de onda mucho más bajas evitando así la interferencia con las medidas de absorbancia.

Se prepara una curva de calibración con quercetina, que es un flavonol muy abundante en la naturaleza dentro del grupo de los flavonoides y destaca por su elevada actividad antioxidante, consiste en 3 anillos y 5 grupos hidroxilo. Se utiliza una solución estándar de quercetina (1mg/1mL), a partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para las diferentes concentraciones (1-100ppm, a cada una se le agrega el volumen correspondiente de metanol para alcanzar el volumen de 1 mL, posteriormente se adiciona a cada un 1 mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en metanol, para alcanzar el final de 2 mL.

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415nm. Los resultados se expresan como equivalentes de querceina/g de extracto.

## **APÉNDICE 10**

### **Método de toxicidad general**

(Método modificado de Niño et al., 2006)

El ensayo se realizó con larvas de nauplio II de *Artemia salina* (Leach). Se preparó una solución para un litro en el que se agregaron 5g de NaCl y 2g de  $\text{NaHCO}_3$  posteriormente se pesaron e incorporaron a la solución 0.5g de quistes de *Artemia salina*.

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

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

**Control negativo.** Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual será el solvente para disolver la muestra (extracto) se emplea el mismo volumen en que se disuelve la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar (500  $\mu\text{L}$ )

**Control positivo.** Se utilizó ácido gálico

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

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

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) se determinó para cada extracto en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración de mg/mL a través del análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la  $CL_{50}$  está entre 1000 y 500 ppm (0.5 y 1 mg/mL), moderada cuando la  $CL_{50}$  está entre 100 y 500 ppm (0.1 y 0.5 mg/mL) y señalando como fuerte cuando la  $CL_{50}$  se extiende a partir de 0 a 100 ppm (0 a 1 mg/mL) según el criterio de McLaughlin et al. 1998.

## **APÉNDICE 11**

### **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

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

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

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

Condiciones de corrida para las fracciones (Método hexánico):

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

Horno:

- Temperatura inicial: 70 °C
- Rampa de calentamiento: 15 °C por minuto hasta 290 °C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 21.67 minutos
- Línea de transferencia: 290 °C

Detector del Espectrómetro de Masas:

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

## APÉNDICE 12

### Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

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

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

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

El extracto metanólico se analizó por HPLC, con las siguientes condiciones:

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

Extracto metanólico: se corrió con una mezcla de MeOH-acetonitrilo- H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O

(25:25:0.1:50)

Flujo de 1 mL/min

Detector de arreglo de diodos (DAD)

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

## Referencias

Aguilar Ortigoza, C.J., Sosa V., Aguilar Ortigoza M. 2003. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. *Economic Botany*. 57, 354-364.

Bedascarrasburre, E., Maldonado, L., Álvarez, A., Rodríguez, E. 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 369-372.

Bucio, V. M C., Martínez, J. O A., 2017. Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del Municipio de Irapuato, Guanajuato, México, *Agronomía Mesoamericana*, 28, 223-227.

Carrillo, L.M., Castillo, N.L., Mauricio, R. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina México. *Información Tecnológica*. 5, 21-28.

Centro Nacional de Programas preventivos y Control de Enfermedades Programa de Acción Específico. Prevención de Enfermedades Diarreicas Aguadas y Cólera 2013-2018. Programa Sectorial de Salud.

Chil, N.I., Pavón, H.S., Gálvez, H.H., Cuellar, C.A., 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 Urbana de Química*. 14, 34-41.

Domingo, D., López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16, 385-393.

Domínguez X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. México, pp. 3-17.

Duarte, L. G. A., Rivero, C.F., Escobedo, C.O., Amacosta, C.J.Z. 2017. Análisis directo de flavonoides por espectrometría de masas en condiciones ambientales en muestras de propóleos de diferentes regiones del País. Colección Memorias de los Congresos de la Sociedad Química De México 52 Congreso Mexicano De Química y 36 Congreso Nacional De Educación Química. 25-27.

Errecalde, J. 2004. Uso de los antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. Toma do en Agosto 2019. Disponible en:

<http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s04.htm#TopOfPage>

- Farre, R., I Frasquet., Sánchez A. 2004. El própolis y la salud. *Ars. Pharmaceutica* 45, 21-43.
- Guerrero, G.J. 2013. Estudio químico del propóleo negro de la región de Zacatecas. Tesis Maestría. Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García, L.A. 2013. Ev-aluación *in vitro* del efecto de propóleos con diversos orígenes sobre el desarrollo de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions og yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27, 1-93.
- Huang S, Cui- Ping Z, Kai W, Gerorge Q. I, Fu-Liang Hu. 2014. Recent Advances in The Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 19, 19611-19632.
- Jean-Prost, P., Médori, P., Le Conte, Y. 2007. Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena 4ª Edición. Edit. Mundi-Prensa España. 508-509
- Konneman, W. E.1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 439.
- Kumazawa, S., Hmasaka, T., Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 84, 329-339.
- Londoño, A. O., Ávila, A. J., Canales, M. M., Hernández, D. C., Serrano, P., Flores, O.C. 2010. Antibacterial comparative study extracts of Mexican propolis and of three plants with use *Apis mellifera* for its production. *Journal of animal and veterinary advances*. 8, 1250-1254.
- Lugo-Sepúlveda, R. E., Martinez, R. K., Morales, G., De la Rosa, L. R., Noriega, R J. A. 2009. Determinación del origen botánico de los propóleos Sonorenses (CABORCA) Mediante HPLC. *INVURNUS*.4,24-30.
- McLaughlin, J. L.1991. Crow Gall Tumors on Potato disc and Brine Shrimp Lethality: Two simple Bioassays for Higher Plant Screening an Fractionation. En: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. (Ed), *Methods in plants Biochemistry assays for Bioactivity*, Academic Press. 6, 1-32.
- Mizugay, M. N. 2018. Evaluación de la actividad antibacteriana de propóleos de Caborca y pinocembrina sobre la vialidad de *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* no 01. Tesis licenciatura. División de ciencias biológicas y de la salud departamento de ciencias químico-biológicas. Universidad de Sonora
- Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante in Vitro de las bebidas de frutas. *Revista Tecnología*. Alfa editores técnicos, pp 27.

Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki., Takasatsuki A.1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of V-ATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell Structure and Function*. 18,139-149.

Niño, j., Correa, Y. M., Mosquera, O. M. 2006. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of 11 Solanaceae Plants from Colombia Biodiversity. *Pharmaceutical Biology*. 44, 14-18.

Organización Mundial de la Salud. Enfermedades diarreicas (internet). Ginebra: WHO,2017 (Citado febrero 23, 2020). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detali/diarrhoeal-disease>

Peña, R. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación Agraria*. 35, 17-26.

Quintero, M. L.,Londoño, A.O., Hernández, H. F., Manzano, G. P., López, M. R., Soto, Z. I., Carrillo, M. L., Penieres, C. G., García, T. G y Cruz, S. T, 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*.*Revista Iberoamericana de Micología*. 25, 22-26.

Ramamoorthy, P. K., Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2, 70-80.

Ramírez, A. E., Navarro, C. A., Díaz, C. E. 2011. Botanical characterisation of Mexican honeys from a subtropical region Oaxaca based on pollen analysis. *Grana*. 50, 40-54.

Ramírez, E. M., Villalobos, D. I., Villafuerte, G.A., Andrade, F.F. 2001. Propóleo: ¿una alternativa en la terapéutica médica y odontológica? *Medicina oral*. 2, 91-94.

Rivera, Y.N. 2013. Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes estados de la República Mexicana. Tesis Maestría. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional.

Rodríguez, N. E., León, G., Petersen M S, Pérez G HR, González, D. E., Morfín, O. R. 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México 1973-2013. *Biomédica* 2014; 34 (suplemento 1): 18190 DOI:

<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>

Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. 2004. La participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 355-363.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela, R. R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299,152-178.

Solorzano, S. F., Miranda, N. M. G. 1998. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud pública de México*. 40, 510-516.

Titau, D.G. 2012. Evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiano de un propóleo recolectado de la zona rural del Distrito Federal. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Vander Berghe, D. A., Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. In: *Methods in plant biochemistry. "Assays for Bioactivity"*. Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P. M. Academic Press. New York. 6, 47-71.

Vargas-Sánchez, R.D, Torrescano-Urrutia., Sánchez, E., 2013. El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38, 705-711.

Vargas-Sánchez, R.D., Torrescano-Urrutia, G.R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo- Galland, B., Acedo F E., Sánchez-Escalante, J.J., Peñalba-Garmendia, M. C., Sánchez-Escalante, A. 2014. Mecanismos involucrados e la actividad antioxidante y antibacteriana de los propóleos. *Biotecnia*. 16, 32-37.

Viuda, M. M., Ruiz, N. Y., Fernández, L. J., Pérez, J. A. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*. 73, 118-124.

Rzendowski, J. 1972. Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México III Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. *Ciencias*. México. 27, 123-132.

Wang, H., Bun, N. T. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61, 1-6.