



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUIMICO DE UNA MUESTRA DE PROPÓLEO
RECOLECTADA EN TRES MARIAS, ESTADO DE MORELOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Olmos Rodríguez Brenda



Ciudad Universitaria, CDMX

2016



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal:	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. suplente:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM.

Asesor

Sustentante

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Olmos Rodríguez Brenda

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Química por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por el apoyo en el desarrollo del presente trabajo de investigación y por la revisión del escrito.

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

Al personal técnico de la USAI de la Facultad de Química.

Proyectos CONACyT de Ciencia Básica CB-252006 y PAIP 500 9138

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Propóleo	3
2.1.1 Definición y generalidades	3
2.1.2 Aspectos históricos	4
2.1.3 Origen botánico	5
2.1.4 Composición química	6
2.1.4.1 Flavonoides	7
2.2 Propiedades biológicas y farmacológicas del propóleo	8
2.2.1 Actividad anticancerígena	8
2.2.2 Actividad antiinflamatoria y cicatrizante	8
2.2.3 Actividad antifúngica	9
2.2.4 Actividad antimicrobiana	9
2.2.5 Actividad antioxidante	9
2.2.6 Actividad antitumoral	10
2.2.7 Actividad antiviral	10
2.2.8 Actividad inmunológica	10
2.3 Fuentes naturales y actividad farmacológica de la 4',7-dimetilapigenina	11
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos particulares	16
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	17
5.1 Recolección del propóleo	17
5.2 Procedimientos generales de análisis	17
5.2.1 Análisis cromatográficos	17

5.2.2	Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas.....	18
5.3	Estudio químico	18
5.3.1	Preparación del extracto etanólico del propóleo	18
5.3.2	Fraccionamiento primario del EEP de Tres Marías	18
5.3.3	Fraccionamiento secundario del EEP de Tres Marías y purificación del compuesto	19
6.	RESULTADOS Y DISCUSION	22
7.	CONCLUSIONES	26
8.	PERSPECTIVAS	26
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27
10.	REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	34

I. Lista de Figuras

Figura 1. Resina vegetal (propóleo)	2
Figura 2. <i>Apis mellifera</i> Linnaeus	3
Figura 3. Estructura básica de los flavonoides	7
Figura 4. Ubicación del apiario de Tres Marías, Estado de Morelos	17
Figura 5. Estructura química de la 4',7-dimetilapigenina	23
Figura 6. Espectro de RMN- ¹ H de la 4',7-dimetilapigenina (CDCl ₃ , 400 MHz)	24
Figura 7. Espectro de RMN- ¹³ C de la 4',7-dimetilapigenina (CDCl ₃ , 100 MHz)	25

II. Lista de Cuadros

Cuadro 1. Fuentes naturales de 4',7-dimetilapigenina	11
Cuadro 2. Fraccionamiento primario del EEP de Tres Marías.	19
Cuadro 3. Fraccionamiento secundario del EEP.	20
Cuadro 4. Datos espectroscópicos de RMN de ¹³ C y ¹ H, para 4',7-dimetilapigenina	23

III. Lista de diagramas

Diagrama 1. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico del EEP de Tres Marías, Edo. de Morelos.	21
--	----

IV. Lista de Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
a. C.	antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grado centígrado
CAPE	Feniletil éster del ácido caféico
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenasa
CPA	Célula presentadora de antígeno
Edo.	Estado
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
EtOH	Etanol
Fx	Fracción
γ	Gamma
g	Gramos
IL	Interlucina
INF-γ	Interferón gamma
Kg	Kilogramo
Km	Kilometro
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetro
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MVZ	Médico Veterinario Zootecnista
OMS	Organización Mundial de la Salud
%	Porcentaje
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear para carbono 13
TLR	Toll-like receptor (Receptor tipo Toll)
UV	Ultravioleta
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria
VHS	Virus de Herpes Simple
VLC	Columna a presión reducida

1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional hoy en día, es reconocida como un recurso fundamental para la salud de los seres humanos, para el desarrollo y el bienestar, además de un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta (Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2012).

México posee una gran riqueza de flora y fauna, por lo que no es de sorprender que las plantas medicinales y otros productos de origen natural formen parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas (Martínez, 2010).

Los productos naturales han proporcionado la inspiración para la mayoría de los ingredientes activos en medicamentos (Harvey, 2007), por lo que un gran número de estos productos naturales tradicionalmente utilizados por varias culturas alrededor del mundo han llegado al mercado gracias al estudio científico (Cragg y Newman 2013).

En la actualidad los medicamentos alopáticos enfrentan la problemática de la falta de abastecimiento para atender los problemas de salud, así como los elevados costos inalcanzables para la población y la desconfianza de la eficacia de los medicamentos alopáticos, origina que el consumo de medicamentos de origen herbolario se haya convertido en una opción para el tratamiento de diversos padecimientos (Osuna-Torres, 2005).

En este contexto, es importante mencionar que el propóleo es uno de los remedios comúnmente utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades debido a sus propiedades biológicas. Sin embargo, en el caso particular de México los estudios químicos y farmacológicos son escasos.

El propóleo es una resina vegetal que las abejas colectan de las yemas de las plantas y mezclan con las enzimas que producen, con cera de abeja y polen. Se usa para sellar grietas y agujeros o para reducir el tamaño de la entrada de la colmena en invierno.



Figura 1. Resina vegetal (propóleo)

Está integrado por al menos 300 compuestos, elaborados por las abejas a partir de exudados de diversas plantas y árboles que mezclan con secreciones salivares (Salatino et al., 2011). Estas características están relacionadas con su composición química, origen botánico, época de recolección y la especie de abeja recolectora (Bankova and Kuleva, 1989; Bankova et al., 2002; Salatino et al., 2011).

Se le han atribuido propiedades tales como: antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, antiulcerosas, antitumorales, inmunoestimulantes, hepatoprotectoras entre otras (Bogdanov, 2005). Debido a los beneficios que se le dan, el interés en el estudio de los propóleos se ha incrementado y en específico de los compuestos químicos que lo integran (Kumazawa et al., 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 Propóleo

2.1.1 Definición y generalidades

La palabra propóleo proviene del vocablo griego *pro* “en defensa de” y *polis* “ciudad”, lo que significa “en defensa de la ciudad”, en el caso de las abejas se refiere a la colmena. El propóleo es una mezcla de resinas y exudados vegetales recolectados por las abejas *Apis mellifera* Linnaeus (Figura 2), con el fin de sellar herméticamente su colmena e impedir que se forme dentro de ella cualquier tipo de contaminación, ya que actúa como un agente microbicida, por lo que se le ha usado como un remedio medicinal desde tiempos remotos (Wagh, 2013).

También conocido como “pegamento de las abejas”, es aromático y de color variable desde amarillo-verdoso hasta café, es suave y pegajoso a temperaturas elevadas, en cambio, a temperaturas bajas y con el paso del tiempo se endurece (Lotfy et al., 2006). El propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo de su origen y la temperatura. Su punto de fusión oscila entre los 60 - 70°C, aunque en algunos casos puede llegar hasta 100°C (Bankova et al., 1995).



Figura. 2 *Apis mellifera* Linnaeus

Las propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiparasitarias que se le atribuyen a este producto, también denominadas como actividad biológica (Choi et al., 2006), varían en función de la fuente natural geográfica de donde es extraído (Salatino et al., 2011).

2.1.2 Aspectos históricos

Existe evidencia histórica del año 300 a. C. sobre el uso de los propóleos con fines medicinales (Kuropatnicki et al., 2013). Los antiguos egipcios lo utilizaban para embalsamar a sus momias, los griegos para aliviar diferentes padecimientos. Hipócrates (460 - 377 a. C.) lo administró para el tratamiento de úlceras en piel. Los pensadores como Aristóteles, Galeno y Dioscórides, así como médicos de culturas griegas y romanas observaron que poseía propiedades antiinflamatorias, por lo cual fue utilizado para el tratamiento de heridas, úlceras y abscesos (Castaldo and Capasso, 2002; Krol et al., 2013).

En la Edad Media el propóleo no era muy popular y su uso en la medicina convencional desapareció. El interés en el propóleo regresó de Europa, junto con la teoría del renacimiento. En el siglo pasado los científicos fueron capaces de demostrar que el propóleo posee importantes actividades biológicas. La investigación sobre la composición química del propóleo se inició a principios del siglo XX y se continuó después de la Segunda Guerra Mundial. Los avances en los métodos analíticos cromatográficos permitieron la separación y la extracción de varios componentes de propóleos.

En la actualidad es utilizado por algunas culturas de los estados europeos (Balcánicos) como tratamiento para heridas, quemaduras, faringitis y úlcera estomacal (Bankova et al., 2007). La administración de este producto se ha mantenido durante siglos hasta llegar a nuestros tiempos, en los que se están realizando investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de propóleos en los campos de la biología y la medicina humana.

En México el cuidado y aprovechamiento de los productos de las abejas, se remonta a épocas prehispánicas donde las diferentes culturas existentes tales como los Mayas, Tarascos y Olmecas Populucas, cultivaban a las abejas sin aguijón (*Meliponinos*), con fines alimenticios, medicinales y religiosos (Martínez, 2010).

Su capacidad antibacteriana, antiséptica, antiinflamatoria, antifúngica, anestésica y propiedades curativas han sido confirmadas. El propóleo ha sido utilizado con eficacia en tratamientos dermatológicos, problemas ginecológicos, enfermedades neurodegenerativas, en la cicatrización de heridas, en el tratamiento de quemaduras y úlceras (Salatino et al., 2011).

2.1.3 Origen botánico

La biodiversidad del propóleo a nivel mundial es inmensa, en cada región se pueden encontrar diferentes compuestos. El propóleo tiene más de 300 componentes y se atribuyen a la presencia de componentes químicos identificados como familias de polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, etcétera, que pueden llegar a superar los 150 compuestos en un propóleo (Palomino G et al., 2009). Entre las moléculas farmacológicamente activas destacan las de tipo flavonoides y ácidos fenólicos con sus ésteres.

Los propóleos originarios de zonas templadas (oeste de Asia, Europa y América del Norte) poseen una composición química parecida entre ellos en la que sobresalen los fenólicos (flavonoides, ácidos cinámicos y derivados). Lamentablemente, pocos estudios han sido desarrollados con propóleos mexicanos (Lotti et al., 2010), pero es evidente que todo lo anterior sugiere que su actividad biológica se debe a la combinación y sinergias de los diferentes compuestos que contiene.

Una posible variación en la composición del propóleo, es la reducción en la disponibilidad de las fuentes principales de resina, para que el material alternativo provisto por las plantas comience a ser recolectado por las abejas (Bosio et al., 2000; Salatino et al., 2011).

2.1.4 Composición química

La composición de los propóleos es bastante compleja y variada ya que depende de la flora, de las condiciones geográficas y climáticas donde se elabora el producto (Salatino et al., 2011). Las abejas recolectan las resinas en un perímetro de 1-2 Km alrededor de la colmena y su composición dependerá de la vegetación circundante y de la preferencia de la abeja por un determinado tipo de flores, según su color, aroma, forma y floración (Bankova et al., 2007; Salatino et al., 2011).

Por su consistencia y estructura, los propóleos pueden clasificarse en dos grupos: 1) Los de naturaleza fluida y 2) Los balsámicos-oleo-resinosos. Los primeros presentan una fracción importante de agentes volátiles, mientras que en los balsámicos predomina la consistencia densa, con bajo contenido de volátiles, susceptible de polimerización y con frecuencia se percibe el aroma de las plantas en forma concentrada; en general son sustancias viscosas, semisólidas y cauchosas. Dependiendo de su origen y condiciones térmicas; se presentan como un material duro a los 15°C y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C (Toreti et al., 2013).

Se han identificado más de 300 constituyentes de los propóleos, dentro de los cuales una amplia variedad son compuestos fenólicos, principalmente de tipo flavonoide, siendo estos, a los que se les ha atribuido parte de las propiedades biológicas de los propóleos (Bankova et al., 1981; Bedascarrasbure et al., 2001). También se han identificado otros constituyentes como ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes, aldehídos y terpenos (Franchi et al., 2012; Salatino et al., 2011). De manera general, la composición de los propóleos se basa en resinas y aceites volátiles en un 50%, cera un 30%, aceites aromáticos un 10%, polen 5% y el 5% restante está constituido por otras sustancias y detritos orgánicos. También se encuentran pequeñas cantidades de vitamina B, azúcares, hierro, zinc, oro, plata y potasio.

Los compuestos aislados en forma recurrente de los EEP (extracto etanólico de propóleo) son polifenoles incluyendo flavonoides, que son la parte más abundante y efectiva. Estos compuestos son los principales responsables de las actividades antibacterianas, antivirales y antioxidantes descrita para los EEP.

2.1.4.1 Flavonoides

Estos compuestos, miembros del grupo de polifenoles, además de su actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividad cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplásica, antimicrobial, entre otras (Procházková et al., 2011).

En la naturaleza, las plantas son la única fuente natural de flavonoides, por ejemplo, se encuentran en frutas, verduras, semillas, cereales y en algunos productos manufacturados como la cerveza, el té y el vino (Iglesias-Neira, 2009).

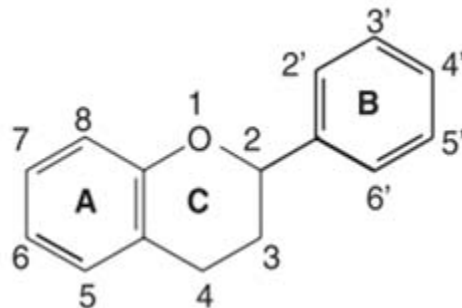


Figura. 3 Estructura básica de los flavonoides

A partir de sus variaciones estructurales, los flavonoides se clasifican en 13 subgrupos. Dentro del grupo de los flavonoides, se destacan las flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocianidinas (Pérez-Trueba, 2001).

2.2 Propiedades biológicas y farmacológicas

En los últimos años se ha publicado un gran número de estudios en relación a las propiedades biológicas presentes en el propóleo, los cuales señalan que la combinación de distintos componentes, es esencial para que se presente alguna actividad biológica considerable (Bankova et al., 2007).

2.2.1 Actividad anticancerígena

Es la actividad biológica más estudiada en los productos naturales, principalmente en los propóleos. Se han realizado investigaciones en diversas partes del mundo en las que se concluye que efectivamente estos productos naturales poseen actividad antiproliferativa contra varios tipos de células cancerígenas tanto de humano como de ratón e incluso se han logrado aislar e identificar algunos de los compuestos responsables de dicha actividad (Banskota et al., 2002).

Existen diversas investigaciones que aprueban el efecto anticancerígeno mediante ensayos con animales y cultivos celulares, donde se manifiesta que el consumo de propóleo podría ser preventivo para el cáncer (Ribeiro and Salvadori, 2003).

2.2.2 Actividad antiinflamatoria y cicatrizante

La capacidad de acelerar la epitelización y la división celular en la curación de las heridas, así como la prevención y detención del desarrollo de procesos inflamatorios, son de las propiedades que contiene el propóleo, ya que se han probado, que la aplicación de soluciones alcohólicas de propóleo aceleran los procesos de regeneración tisular. Por otro lado, algunos de los componentes fenólicos del propóleo como el ácido caféico y el CAPE (feniletil éster del ácido caféico), así como la quercetina y la naringenina, ejercen un efecto antiinflamatorio a través de diversos mecanismos, en el que concluyen que este proceso se basa en la acción inhibitoria hacia la enzima COX, precursora del proceso inflamatorio (Araujo et al., 2001).

2.2.3 Actividad antifúngica

El propóleo es el producto apícola que presentó la mayor actividad antifúngica, según un estudio donde se examinaron diferentes productos apícolas frente a 40 cepas de levaduras, de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Trichosporon spp.* El aumento en la prevalencia de las micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos empleados en la actualidad y los efectos secundarios que estos últimos provocan en los pacientes son, sin duda, algunos indicadores de la necesidad de encontrar o desarrollar nuevos compuestos que cumplan con los requerimientos de un antifúngico (Koc et al., 2011).

2.2.4 Actividad antimicrobiana

Las propiedades antimicrobianas del propóleo han sido estudiadas, en ensayos *in vitro* y se ha demostrado que los extractos de propóleos son activos frente a numerosos microorganismos, siendo más eficaces en un gran número de bacterias Gram positivas (Choi et al., 2006; Marcucci et al., 2001). En otros estudios se describe que los extractos de propóleo de Corea, se encontraron que estos tenían actividad sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans*, atribuyendo esta actividad al contenido de compuestos fenólicos como los flavonoides (Velazquez et al., 2007).

2.2.5 Actividad antioxidante

Como antioxidante, el propóleo presenta compuestos que poseen la capacidad de retrasar o prevenir la oxidación de otras moléculas, este efecto es atribuido a la presencia de compuestos fenólicos que varía de acuerdo al origen geográfico y botánico del propóleo. CAPE es el típico constituyente de propóleo derivado del álamo y al parecer es el agente antioxidante más poderoso de las sustancias reportadas en estas resinas (Farooqui, 2010). Se han investigado las propiedades antioxidantes del propóleo y han informado que son capaces de no sólo disminuir la peroxidación lipídica y daños en el ADN, sino también actuar como un neutralizador de radicales libres y reducir la producción de interferón gamma (INF- γ) (Sá-Nunes et al., 2003).

2.2.6 Actividad antitumoral

Hay investigaciones que han reportado la propiedad antitumoral del propóleo *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha demostrado que presenta actividad antiproliferativa en tumores celulares (Banskota et al., 2001; Orsolich et al., 2010). La propiedad quimiopreventiva del propóleo se ha analizado en modelos con animales y cultivos celulares, observando su amplia capacidad para inhibir la síntesis de ADN en células tumorales. Se ha aislado una sustancia activa de un propóleo brasileño que ha sido caracterizada y se observa que inhibe el crecimiento de células hepáticas y detiene las células tumorales. Los extractos de propóleo se han examinado en varios estudios para evaluar su actividad citotóxica, comprobando que el CAPE tiene una acción antitumoral (Orsolich et al., 2010).

2.2.7 Actividad antiviral

En estudios sobre la infección por Virus de Herpes Simple de tipo 1 (VHS-1) *in vitro*: el 0,5% del extracto de propóleo provocó una inhibición del 50% de la infección por VHS-1, mientras que *in vivo* el 5% el propóleo ayudó a prevenir la aparición y el desarrollo de los síntomas de la infección de VHS-1 en los animales.

Algunos estudios se han realizado en la aplicación del propóleo en la infección genital por el Virus de Herpes Simple de tipo 2 (VHS-2), el cual ha demostrado su efectividad. Estos efectos pueden ser beneficiosos en el tratamiento de sobreinfecciones como úlceras cervicales, que son comunes en la infección por VHS en mujeres (Krol et al., 2013; Kuropatnicki et al., 2013).

2.2.8 Actividad inmunológica

Los estudios realizados por Orsatti en el año 2010 permitieron demostrar que el extracto etanólico de propóleo a una dosis de 200 mg/Kg durante tres días, activó en ratones los pasos iniciales de la respuesta inmune mediante la sobreexpresión de los receptores TLR-2, TLR-4 y la producción de citosinas proinflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos y las células del bazo. Esta respuesta contribuye al reconocimiento de los microorganismos y a la activación de los linfocitos por las CPA (Reyna, 2013).

En los modelos de inmunosupresión, la administración de extractos acuosos de propóleo en ratones previenen los efectos de la ciclofosfamida y mejora la tasa de supervivencia de los animales (Dimov et al., 1991).

2.3 Fuentes naturales y actividad farmacológica de la 4',7-dimetilapigenina

Es un compuesto con estructura de tipo flavona, teniendo un interés biológico, ya que posee múltiples actividades, tal como se describe en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Fuentes naturales de 4',7-dimetilapigenina

Fuente	Actividad biológica y farmacológica	Referencia
<i>Aloysia gratissima</i>	Antimicrobiana	Bailac et al., 1999 Soler et al., 1986
<i>Alpinia oxyphyllae</i>	Antidiarreica	Zhang et al., 2013
<i>Aquilaria sinensis</i>	Inhibidor de la producción de óxido nítrico (NO)	Kuo, 1995 Pacher et al., 2007 Wang et al., 2008
<i>Artemisia campestris</i>	Antioxidante y Antibacteriana	Akrouf et al., 2011 Ghorab et al., 2013
<i>Baccharis conferta</i>	Antiespasmódica	Tortoriello, 1995
<i>Baccharis illinita</i>	Efecto anticoagulante	Colman et al., 1998 Harborne, 2000
<i>Ballota inaequidens</i>	Antibacteriana y antifúngica	National Committee of Clinical Laboratory Standards, 1993

Cuadro 1. Fuentes naturales de 4',7-dimetilapigenina

Fuente	Actividad biológica y farmacológica	Referencia
<i>Calea tenuifolia</i>	Antiplasmódica	Díaz et al., 1976 Martínez, 1959
<i>Combretum erythrophyllum</i>	Antibacteriana	Martini, 2002
<i>Conocliniopsis prasiifolia</i>	Antiinflamatoria, analgésica y antipirética	Al-Ghamdi MS, 2001 Pio-Correia, 1984
<i>Croton betulaster</i>	Antidiabético, antidiarreico antiinflamatorio, anticancerígeno antihelmíntico, cicatrizante. Inhibidor del crecimiento de células de glioblastoma humano e induce apoptosis.	Barbosa et al., 2003 Bruneton, 1991
<i>Eremosparton songoricum</i>	Protección contra el daño del ADN y la inhibición de la peroxidación de lípidos.	L. Le Marchand, 2002 McKelvey-Martin et al., 1993
<i>Frullania muscicola</i>	Efectos inhibidores contra algunos hongos. Efectos citotóxicos a algunas células tumoraes humanas. Antifúngica	Asakawa, Y. 1995 Wang and Lou 2000
<i>Kaempferia parviflora</i>	Antiinflamatoria, antialérgica, antibacteriana, antiplasmódica	Cucuzza et al., 2008 Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2007 Yenjai et al., 2004

Cuadro 1. Fuentes naturales de 4',7-dimetilapigenina

Fuente	Actividad biológica y farmacológica	Referencia
<i>Lampaya hieronymi</i>	Antiinflamatoria	A. Ialenti et al., 1995 M. Di Rosa, 1971
<i>Lavandula gibsoni</i>	Insecticida	Sharma et al., 1981
<i>Leucas cephalotes</i>	Antiinflamatorio	Department of Medicinal Plants, Ministry of Forests and Soil Conservation, 1993
<i>Manekia obtusa</i>	Antiparasitaria	Cunico, 2005 Guimarães, 2009
<i>Marrubium thessalum</i>	Antinociceptiva y antioxidante	Skaltsa, 2009 Meyre-Silva et al., 2010
<i>Mussaenda erythrophylla</i>	Antioxidante, antifertilidad antiflogística y antipirética	Dictionary of Chinese Traditional Medicine, 1986 Gupta M. et al., 2004
<i>Piper capense</i>	Antiparasitaria	Azas N et al., 2002
<i>Piper fimbriulatum</i>	Antiplasmódica y antitripanosómica	Corbett et al., 2004
<i>Piper longum L.</i>	Antioxidante	Djeridane et al., 2006
<i>Rhus undulata</i>	Antiinflamatoria	Kokwaro, 1976

Cuadro 1. Fuentes naturales de 4',7-dimetilapigenina

Fuente	Actividad biológica y farmacológica	Referencia
<i>Salvia macrosiphon</i>	Agente diurético, antireumatoide	Javidnia, 2005 Matloubi et al., 2000
<i>Salvia moorcraftiana</i>	Antifúngica, antibacteriana, fitotóxica, actividad leishmanicida, insecticida, actividad de inhibición de la enzima	Atta-ur-Rahman, 1991 Brass et al., 1979 Marsui et al., 1996 Niwa et al., 1986
<i>Salvia pocolata</i>	Antioxidante y anticolinesterásico	Fraga et al., 2005 Ulubelen, 1998
<i>Satureja macrostema</i>	Antioxidante, hepatoprotector	Dorkina, 2004 Pérez, 2010
<i>Teucrium polium L.</i>	Antioxidante	Shahidi, 1997 Silva et al., 2007
<i>Teucrium ramosissimum</i>	Promueve antiproliferación de las células cancerosas humanas. Antioxidante y antimicrobiana	Ben Sghaier et al., 2007 Galati and O'Brien, 2004 Hachicha et al., 2007 Ye et al., 2005

3. JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina alternativa o complementaria. Se viene utilizando desde hace miles de años, sus practicantes han contribuido a la salud humana. La medicina tradicional ha mantenido su popularidad en todo el mundo, teniendo un conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas (OMS, 2015).

En la actualidad los productos naturales representan una excelente alternativa para el tratamiento y la prevención de las enfermedades en los países en desarrollo (Castaldo y Capasso, 2002). Al igual que la miel, el propóleo se conoce desde la antigüedad y ha sido utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades, entre ellas en medicina. Recientemente resurge el uso del propóleo, debido a su alta gama de propiedades biológicas y farmacológicas (actividad antiinflamatoria, antifúngica, cicatrizante, anestésica, antiviral, anticancerígena, antioxidante y antibacteriana), se ha constituido como uno de los materiales vegetales más estudiados en el mundo (Farré et al., 2004; Bogdanov 2014).

Uno de los mayores problemas presentes en el propóleo es la variabilidad de su composición química, esta es dependiente del sitio de colecta, de los distintos ecosistemas, de la época del año, el tipo de cosecha empleado y de las secreciones de las fuentes principales de donde las abejas obtienen las resinas (Serra et al., 1994; Burdock, 1998; Bankova et al., 2000;)

El interés de estudiar el propóleo, no solo es para conocer su composición química, sino ayudar a las necesidades de los productores, indicando cuales son los beneficios que otorga, lo cual les brinde confiabilidad, ventaja y permita mejorar su comercialización frente a apicultores.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar el estudio químico del extracto etanólico de una muestra de propóleo recolectada en Tres Marías, Estado de Morelos.

4.2 Objetivos particulares

- Realizar la revisión bibliográfica de documentos científicos y páginas relacionadas con los estudios químicos de propóleos.
- Preparar el extracto etanólico del propóleo recolectado en Tres Marías, Estado de Morelos.
- Fraccionar el extracto etanólico de propóleo mediante métodos cromatográficos.
- Aislar y purificar los compuestos presentes en las fracciones derivadas del extracto etanólico del propóleo.
- Establecer la estructura molecular de los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Recolección del propóleo

La muestra de propóleo utilizada en este estudio fue recolectada por el MVZ Ángel López Ramírez de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM en noviembre del 2015 en Tres Marías, Estado de Morelos. En la Figura 4 se muestra el sitio de recolección.



Figura 4. Ubicación del apiario de Tres Marías, Estado de Morelos

5.2 Procedimientos generales de análisis

5.2.1 Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 (Merck).

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063 - 0.200 mm) y empleando diversos sistemas de elución. Se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254\text{nm}$ y 302nm, posteriormente se revelaron con vainillina sulfúrica (a 100 °C).

Las separaciones cromatográficas en placa preparativa se realizaron sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck de 20 × 20 cm y 2 mm de espesor.

5.2.2 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) ubicado en el Edificio H de la Facultad de Química de la UNAM.

El espectro de resonancia magnética nuclear para protón (RMN-¹H) y Carbono 13 (RMN-¹³C) se registraron en un equipo Varian, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz. El disolvente usado para la disolución de la muestra fue CDCl₃.

5.3. Estudio químico

5.3.1 Preparación del extracto etanólico del propóleo

Se pesó una muestra de propóleo recolectado en Tres Marías, Edo. de Morelos 41.7822 g que se extrajo por maceración utilizando como disolvente etanol (1000 mL) y se llevó a sónica por un periodo de 4 horas.

5.3.2 Fraccionamiento primario del EEP de Tres Marías

El extracto (17.2 g) se disolvió con una mezcla de CH₂Cl₂ / MeOH, se adsorbió en sílica gel y se cromatógrafió en una columna al vacío (VLC, 10 × 30 cm). La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad creciente con mezclas de hexano, CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂/acetona. Se recolectaron treinta fracciones que se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de nueve fracciones primarias. En el Cuadro 2 se describe el fraccionamiento primario y las fracciones obtenidas.

Cuadro 2. Fraccionamiento primario del EEP de Tres Marías.

Fracciones	Disolvente	Proporción (%)	Clave
1-3	Hexano	100	Fx1
4-6	CH ₂ Cl ₂	100	Fx2
7-15	CH ₂ Cl ₂ /acetona	98:2	Fx3
16-19	CH ₂ Cl ₂ /acetona	95:5	Fx4
20-22	CH ₂ Cl ₂ /acetona	90:10	Fx5
23-24	CH ₂ Cl ₂ /acetona	80:20	Fx6
25-26	CH ₂ Cl ₂ /acetona	70:30	Fx7
27-28	CH ₂ Cl ₂ /acetona	50:50	Fx8
29-30	Acetona	100	Fx9

5.3.3 Fraccionamiento secundario del EEP de Tres Marías y purificación del compuesto.

De las 9 fracciones que se obtuvieron en el fraccionamiento primario se tomó la Fx₃ (0.5175 g), se adsorbió en sílica gel y se cromatógrafió en una columna al vacío (VLC, 10 × 30 cm). La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad creciente con mezclas de CH₂Cl₂ / acetona. Se recolectaron ciento dieciocho fracciones que fueron reunidas por similitud cromatográfica en dieciséis fracciones. En el Cuadro 3 se describe el fraccionamiento secundario y fracciones obtenidas.

De la fracción secundaria Fx VII precipitó un sólido amarillo, este sólido se recrystalizó con acetona y se denominó compuesto P3MC01. Para la caracterización de la estructura química del compuesto aislado, se usaron métodos espectrométricos y espectroscópicos (RMN-¹H).

Cuadro 3. Fraccionamiento secundario del EEP

Fracciones	Disolvente	Proporción (%)	Clave
1-15	CH ₂ Cl ₂	100	Fx I
16-20	CH ₂ Cl ₂ /acetona	98:2	Fx II
21-24	CH ₂ Cl ₂ /acetona	98:2	Fx III
25-28	CH ₂ Cl ₂ /acetona	95:5	Fx IV
29-37	CH ₂ Cl ₂ /acetona	95:5	Fx V
38-42	CH ₂ Cl ₂ /acetona	95:5	Fx VI
43-47	CH ₂ Cl ₂ /acetona	90:10	Fx VII
48-59	CH ₂ Cl ₂ /acetona	90:10	Fx VIII
60-63	CH ₂ Cl ₂ /acetona	85:15	Fx IX
64-68	CH ₂ Cl ₂ /acetona	85:15	Fx X
69	CH ₂ Cl ₂ /acetona	85:15	Fx XI
70-72	CH ₂ Cl ₂ /acetona	70:30	Fx XII
73-84	CH ₂ Cl ₂ /acetona	70:30	Fx XIII
85-103	CH ₂ Cl ₂ /acetona	50:50	Fx XIV
104-113	CH ₂ Cl ₂ /acetona	50:50	Fx XV
114-118	Acetona	100	Fx XVI

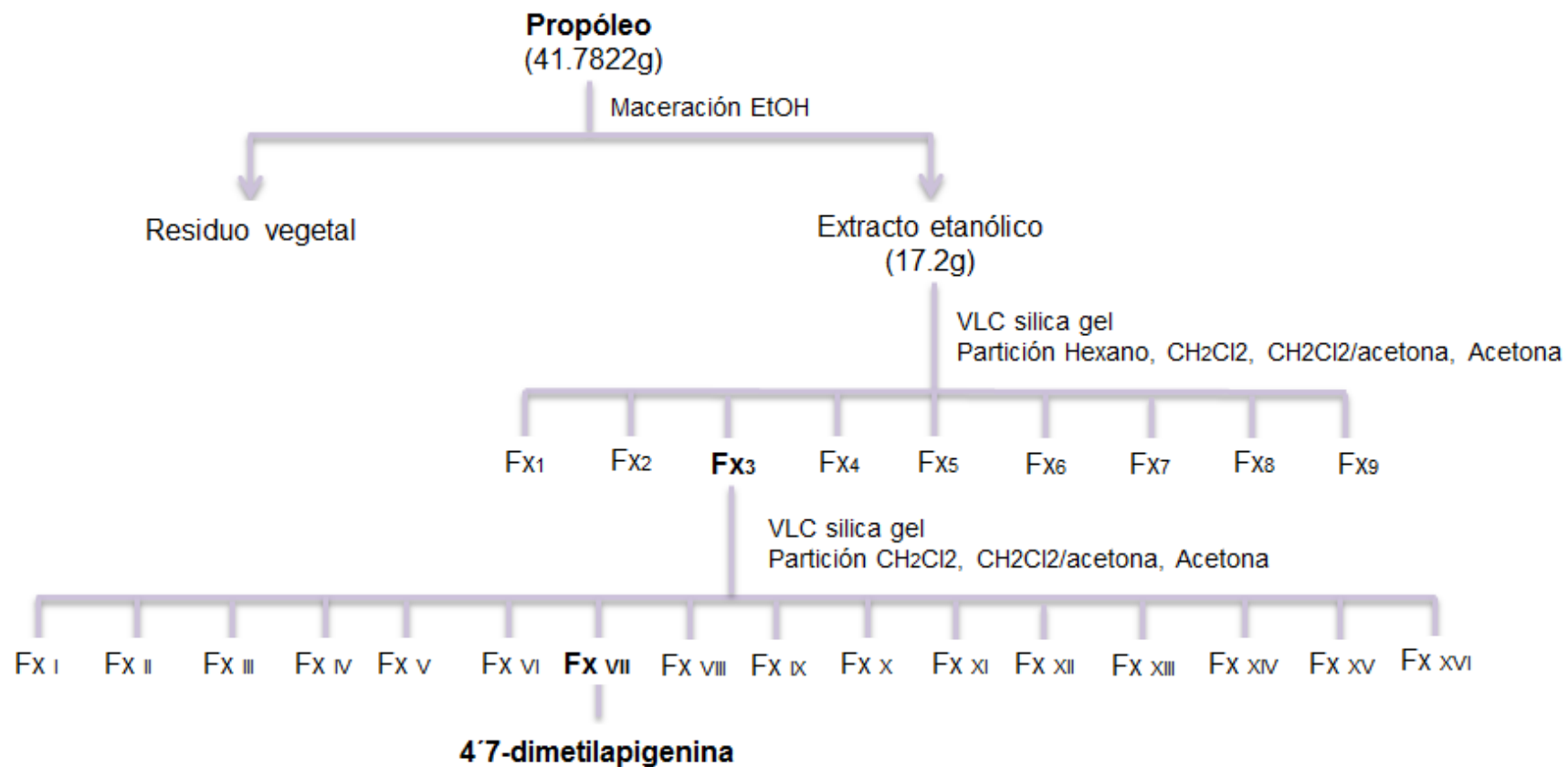


Diagrama 1. Resumen del procedimiento experimental del estudio químico del EEP de Tres Marías, Edo. de Morelos

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En México existe una diversidad vegetal, la cual da origen a una gran variedad de propóleos que no han sido estudiados desde el punto de vista químico y farmacológico. Por esta razón, se seleccionó el propóleo recoletado en el apiario de Tres Marías, Estado de Morelos.

A la fecha se han estudiado numerosas muestras de propóleo recolectadas alrededor del mundo (Bankova et al., 2000; Salatino et al., 2011), sin embargo, hay pocos estudios conducentes a determinar la composición química y las propiedades farmacológicas de propóleos mexicanos (Velázquez, 2012). En nuestro laboratorio, el propóleo es objeto de un estudio sistemático, debido a su uso en la medicina tradicional y complementaria y a la falta de información científica que se encuentra en la literatura para los propóleos producidos en México. El conocimiento de la composición química de los propóleos es de vital importancia para correlacionarla con las actividades biológicas que aportan los mismos.

Para la realización del estudio fitoquímico, la muestra de propóleo se sometió a un proceso de extracción por maceración utilizando como disolvente etanol (1000 mL) y se utilizó un baño ultrasónico. El extracto etanólico se sometió a sucesivos fraccionamientos por cromatografía, que permitieron el aislamiento de un compuesto de tipo flavonoide. Este compuesto se caracterizó por técnicas espectroscópicas como la 4',7-dimetilapigenina.

6.1 Identificación de la 4',7-dimetilapigenina.

A partir de la fracción secundaria Fx VII, el compuesto P3MC01 se aisló como un sólido amarillo que se recrystalizó de acetona. En las Figuras 6 y 7 se muestran los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C registrados para la 4',7-dimetilapigenina. En el Cuadro 4 se resumen los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto P3MC01.

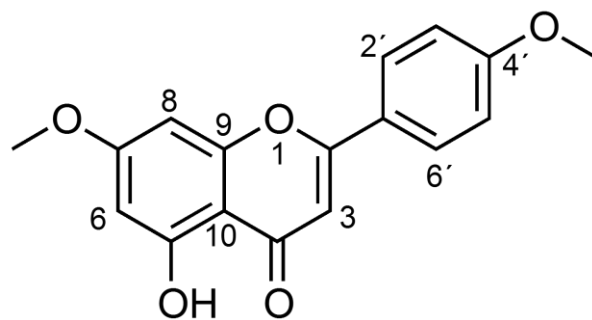


Figura 5. Estructura química de la 4',7-dimetilapigenina

Cuadro 4. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C y ^1H , para 4',7-dimetilapigenina

C	^1H (δ)^a	^{13}C (δ)^a
2	-	161.56
3	6.57 (s)	104.33
4	-	182.40
5	-	157.67
6	6.36 (d $J=2.0$ Hz)	98.01
7	-	165.40
8	6.48 (d $J=2.0$ Hz)	92.60
9	-	162.20
10	-	105.54
1'	-	123.56
2'y 6'	7.84 (d $J=8.0$ Hz)	128.01
3'y 5'	7.04 (d $J=8.0$ Hz)	114.48
4'	-	163.99
7-OCH ₃	3.88	55.7
4'-OCH ₃	3.88	55.5

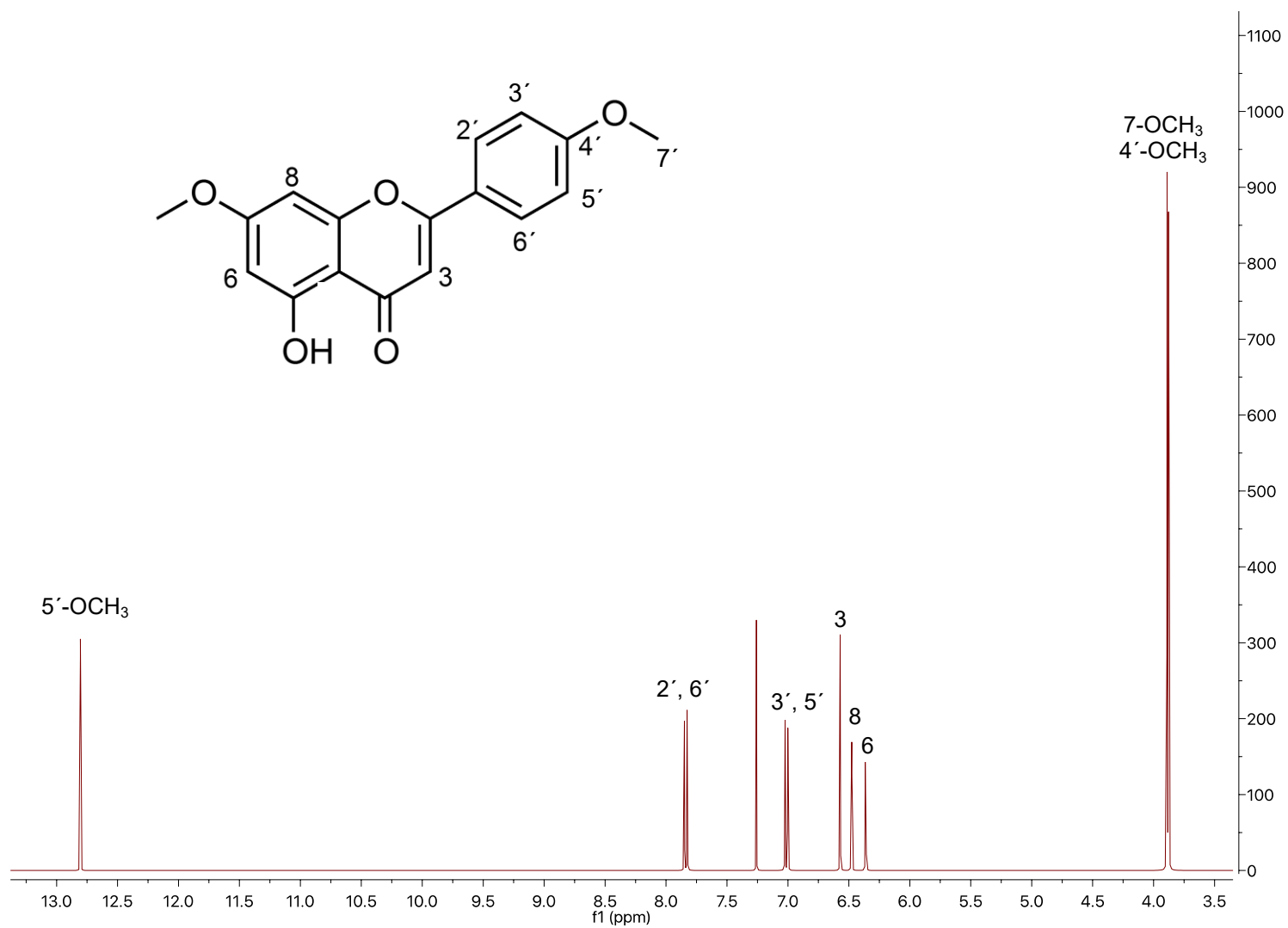


Figura 6. Espectro de RMN-¹H de la 4',7-dimetilapigenina (CDCl₃, 400 MHz)

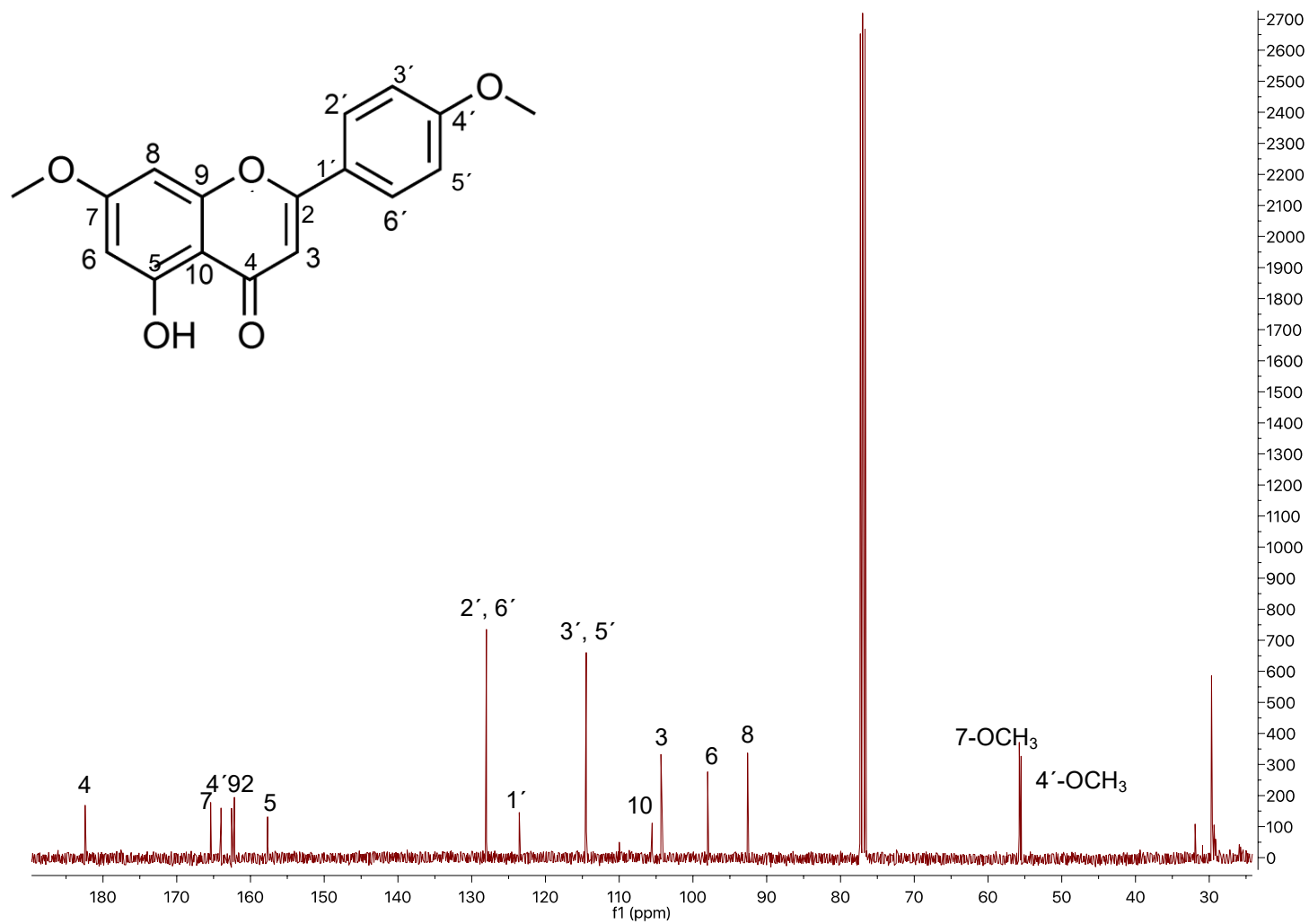


Figura 7. Espectro de RMN- ^{13}C de la 4',7-dimetilapigenina (CDCl₃, 100 MHz)

7. CONCLUSIONES

A partir del extracto etanólico de propóleo recolectado en Tres Marias, Edo. de Morelos, se aisló y caracterizó el flavonoide 4',7-dimetilapigenina.

La presencia de la 4',7-dimetilapigenina explica de forma parcial las actividades biológicas, entre las que destacan: antiinflamatoria, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, entre otras (Salatino et al., 2011).

Con base en los resultados obtenidos se pudo corroborar que la zona geográfica de recolección de la muestra, influye directamente en la composición de los propóleos, ya que esto depende del origen y las condiciones térmicas (Toreti et al., 2013), siendo de interés conocer las necesidades de los productores, indicando cuales son los beneficios que otorga y permita su comercialización frente a apicultores.

8. PERSPECTIVAS

Continuar el estudio químico del EEP de propóleo de Tres Marías, Edo. de Morelos e identificar los compuestos minoritarios.

Determinar la capacidad antioxidante y antibacteriana del EEP de propóleo de Tres Marías, Edo. de Morelos y los compuestos aislados

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ A. Ialenti, A. Ianzano, S. Moncada, M. Di Rosa, Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide, *Eur. J. Pharm.* 211 (1995) 177 - 182.
- ❖ Akrouf, A., Gonzalez, L.A., El Jani, H., Madrid, P.C., 2011. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem. Toxicol.* 49, 342-347.
- ❖ Al-Ghamdi MS (2001): The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella Sativa*. *J. Ethnopharmacol.* 76: 45-48
- ❖ Araujo, M.A., Libério S.A., Guerra, R.N., Ribeiro, M.N., Nascimento, F.R. (2001). Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Rev. Bras. Farmacogn.* Vol. 22, n.1, 208-219
- ❖ Asakawa, Y. (1995) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Springer, Wien) 65, p 1.
- ❖ Atta-ur-Rahman (1991) *Studies in Natural Products Chemistry: Bench-Top Bioassay for the Discovery of Bioactive Natural Products an update* (Vol. 9). Structure and Chemistry (Part-B). Elsevier Science Publishers, B.V., Netherland.
- ❖ Azas N, Laurencin N, Delmas F, Di Giorgio C, Gasquet M, Laget M, et al. Synergistic in vitro antimalarial activity of plant extracts used as traditional herbal remedies in Mali. *Parasitol Res* 2002;88:165-71.
- ❖ Bailac, P.N., Dellacasa, A.D., Firpo, N., Ponzi, M.I., 1999. *An. Assoc. Quim. Arg.* 87, 149.
- ❖ Bankova, V. (2000). Determining quality in propolis samples. *J Am Apither Soc*, 7(2).
- ❖ Bankova, V., Kuleva, L., 1989. Phenolic compounds of propolis from different regions of Bulgaria. *Zhivotnovud. Nauki* 26, 94-98.
- ❖ Bankova, V., Popov, S., Marekov, N., 1981. Flavonoids from propolis, 1 ed. *Bulg. Acad. Sci.*, pp. 104-110.
- ❖ Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.-G., 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* 57, 530-533.
- ❖ Bankova, V., Popova, M., Tsusheva, B., Bogdanov, S., Sabatini, A.G., Marcucci, M., 2007. Propolis: from folk medicine to modern preparations. *Mitsubachi Kagaku* 27, 63-70.

-
- ❖ Bankova, V.S., Popov, S.S., Marekov, N.L., 1995. Chemical composition and plant origin of propolis. *Bulg. Chem. Commun.* 28, 372-382.
 - ❖ Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 80, 67-73.
 - ❖ Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2001. Recent progress in pharmacological research on propolis. *Phytother. Res.* 15, 561-571.
 - ❖ Barbosa, P.B., Fascio, M., Martins, D., Roque, N.F., 2003. Triterpenes of *Croton betulaster* (*Euphorbiaceae*). *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 307-308.
 - ❖ Bedascarrasbure, E.L., Maldonado, L.M., Alvarez, A.R., van der Horst, A., Rodriguez, E., 2001. Content of flavonoids in the Argentinian propolis. *Mitsubachi Kagaku* 22, 75-78.
 - ❖ Ben Sghaier, M., Chraief, I., Skandrani, I., Bouhlel, I., Boubaker, J., Kilani, S., Neffati, A., Mahmoud, A., Mohamed Hammami, M., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2007. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of *Teucrium ramosissimum* (*Lamiaceae*). *Chem. Biodiversity* 4, 1480–1485
 - ❖ Bogdanov, S. (2014). Propolis : Composition , Health , Medicine : A Review. *Bee Product Science*, (February), 1–40.
 - ❖ Bogdanov, S., 2005. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1-18.
 - ❖ Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O., Savoia, D., 2000. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 174-177.
 - ❖ Brass C, Shainhouse JZ, and Steven DA (1979) Variability of Agar Dilution Replicator Method of yeast Susceptibility Testing. *Antimicrob. Agents Chemother* 15: 763
 - ❖ Bruneton, J., 1991. *Fitoquímica y farmacognosia*. Editorial Acriba, S.A
 - ❖ Burdock, G. a. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363.
 - ❖ Castaldo, S., Capasso, F., 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73, S1-S6.
 - ❖ Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT--Food Sci. Technol.* 39, 756-761.
-

-
- ❖ Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EL. (1998) Haemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 3th ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1-18.
 - ❖ Corbett Y, Herrera L, Gonzalez J, Cubilla L, Capson TL, Coley PD, Kursar TA, Romero LI, Ortega-Barria E (2004): A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. *Am J Trop Med Hyg* 70: 119–124.
 - ❖ Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6), 3670–95
 - ❖ Cucuzza LS, Motta M, Miretti S, Accornero P, Baratta M. Curcuminoid-phospholipid complex induces apoptosis in mammary epithelial cells by STAT-3 signaling. *Exp. Mol. Med.* 2008;40: 647-657.
 - ❖ Cunico MM, Carvalho JLS, Auer CG (2005). Gênero *Ottonia*: uma revisão das principais características botânicas, fitoquímicas e biológicas. *Rev. Bras. Plantas Med.* 7:17-21
 - ❖ Department of Medicinal Plants, Ministry of Forests and Soil Conservation, His Majesty's Govt. of Nepal (ed.), "Medicinal Plants of Nepal," 4th ed., H. M. G. Press, Kathmandu, 1993, p. 69.
 - ❖ Díaz J. L. (1976), *Uso de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II.* Ed. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. México.
 - ❖ Dictionary of Chinese Traditional Medicine. Jiangsu College of New Medicine. Shanghai, Science and Technology press., 1986, 176.
 - ❖ Dimov, V., Ivanoska, N., Manolova, N., Nikolov N., Popov S. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infection and macrophage function. *Apidologie.* 22: 155-162
 - ❖ Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 97:654-660.
 - ❖ Dorkina EG (2004) Investigation of the hepatoprotector action of natural flavonoids. *Eksp Klin Farmakol* 67:41-42
 - ❖ Farooqui, T., Farooqui, A.A., 2010. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Curr. Nutr. Food Sci.* 6, 186-199.

-
- ❖ Farré, R., Frasquet, I., & Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45, 21–43.
 - ❖ Fraga, B. M.; Diaz, C. E.; Guadano, A.; Gonzalez-Coloma, A. J. *Agric. Food Chem.* 2005, 5200-5206
 - ❖ Franchi, G.C., Jr., Moraes, C.S., Toreti, V.C., Dausch, A., Nowill, A.E., Park, Y.K., 2012. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2012, 918956.
 - ❖ Galati, G., O'Brien, P.J., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 287–303
 - ❖ Ghorab, H., Laggoune, S., Kabouche, A., Semra, Z., Kabouche, 2013. Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Der Pharm. Lett.* 5 (2), 189–192.
 - ❖ Guimarães EF, Silva MC (2009). Uma Nova Espécie E Novos Nomes em *Piper* Seção Ottonia (Piperaceae) para o Sudeste do Brasil. *Hoehnea* 36:431-435.
 - ❖ Gupta M, Mazumder UK, Siva kumar T, Gomathi P, Sambath kumar R, Iranian J. *Pharmacol Therapeutics.*, 2004, 3, 12.
 - ❖ Hachicha, S.F., Skanji, T., Barrek, S., Ghrabi, Z.G., Zarrouk, H., 2007. Composition of the essential oil of *Teucrium ramosissimum* Desf. (Lamiaceae) from Tunisia. *Flavour Frag. J.* 22, 101-104.
 - ❖ Harborne JB, Williams CA. (2000) *Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry*, 55, 481-504.
 - ❖ Harvey, A. L. (2007). Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(5), 480–484.
 - ❖ Iglesias-Neira, J. (2009) *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*, Tesis Doctorado, Universidad Santiago de Compostela
 - ❖ Javidnia K, Miri R and Jamalia A. Composition of the essential oil of *Salvia macrosiphon* Boiss. from Iran. *Flav. Fragr. J.* (2005): 20, 542-543
 - ❖ J. O. Kokwaro, "Medicinal Plants of East Africa", Nairobi: East African Literature Bureau, 1976, p.26

-
- ❖ J.Q. Zhang, S. Wang, Y.H. Li, P. Xu, F. Chen, Y.F. Tan, J.A. Duan, Anti-diarrheal constituents of *Alpinia oxyphylla*, *Fitoterapia* 89 (2013) 149-156.[16]
 - ❖ Koc, A.N., Silici, S., Kasap, F., Hormet-Oz, H.T., Mavus-Buldu, H., Ercal, B.D., 2011. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *Journal of Medicinal Food* 14, 128-134.
 - ❖ Krol, W., Bankova, V., Sforcin, J.M., Szliszka, E., Czuba, Z., Kuropatnicki, A.K., 2013. Propolis: properties, application, and its potential. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 807578.
 - ❖ Kumazawa, S., Shimoi, K., Hayashi, K., Ishii, T., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Identification of Metabolites in Plasma and Urine of Uruguayan Propolis-Treated Rats. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3083-3088.
 - ❖ Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide [J]. *Ann Surg*, 1995, 221(3): 220-235
 - ❖ Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W., 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 964149.
 - ❖ L. Le Marchand, *Biomed. Pharmacother.* 56, 296 (2002)
 - ❖ Lotfy, M., Badra, G., Burham, W., Alenzi, F.Q., 2006. Combined use of honey, bee propolis and myrrh in healing a deep, infected wound in a patient with diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science* 63, 171-173.
 - ❖ Lotti, C., Fernandez, M.C., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Hernandez, I.M., Rastrelli, L., 2010. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2209-2213.
 - ❖ M. Di Rosa, D.A. Willoughby, Screens for antiinflammatory drugs, *J. Pharm.* 23 (1971) 297–298
 - ❖ Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74, 105-112.
 - ❖ Marsui T, Yoshimoro C, Osajima K, Oki T, Osajima Y (1996) In Vitro Survey of [alpha]-Glucosidase Inhibitory Food Components. *Biosci Biotech Biochem* 60: 2019-2022
 - ❖ Martínez, L., Delgado., M. Rojas, N., Casillas, R. (2010). El propóleo y las técnicas para su colecta, *Notiabeja*. Núm 6.
-

-
- ❖ Martínez M. (1959), Las Plantas Medicinales de México. 4th ed. Ediciones Botas. Mexico. 347-349
 - ❖ Martini ND (2002) The Isolation and Characterization of Antibacterial Compounds from *Combretum erythrophyllum* (Burch.) Sond. PhD Thesis, Department of Pharmacology, University of Pretoria, South Africa.
 - ❖ Matloubi Moghddam F, Amin G and Safavi- Poorsohi E. Composition of stem bark essential oil from *Salvia macrosiphon* Boiss. Daru (2000) 8: 28-29
 - ❖ Meyre-Silva, C.; Cechinel-Filho, V. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus *Marrubium*. Curr. Pharm. Design 2010, 16, 3503-3518.
 - ❖ National Committee of Clinical Laboratory Standards (1993): Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 3rd ed.
 - ❖ Niwa M, Otsuji S. Tatematsu H, Liu GQ, Chen XF, Hirata Y (1986) Stereostructures of Two Biflavanones from *Stellera chamaejasme* L. Chem Pharm Bull 34: 3249-3251
 - ❖ Orsolíc, N., Benković, V., Lisčić, D., Dikić, D., Erhardt, J., Knežević, A.H., 2010. Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan. Medical Oncology 27, 1346-1358.
 - ❖ Osuna-Torres, L.; Tapia-Pérez, M. (2005) Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, Ediciones Universidad Barcelona, pp. 9
 - ❖ Pacher P, Joseph S, Beckman JS, et al. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [J]. Physiol Rev, 2007, 87: 315-424
 - ❖ Palomino G, L.R., Garcia P, C.M., Gil G, J.H., Rojano, B.A., Durango R, D.L., 2009. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). Vitae 16, 388-395.
 - ❖ Perez GRM, Gallardo NYT (2010) Antioxidant and hepatoprotective effects of methanol extract of leaves of *Satureja Macrostema*. Phcog Mag 6:125–131.
 - ❖ Pérez-Trueba, G.; Martínez-Sánchez, G. (2001) Flavonoides como Antioxidantes Naturales, Acta Farm. Bonaerense, 20 (4):297-306.
 - ❖ Pio-Correia M (1984): *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, v.5, Brasil, IBDF, Agricultura Ministério, p. 142.
 - ❖ Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia 82, 513-523.

-
- ❖ Reyna, W., (2013). Efecto de la zona y la época de colecta sobre la producción de marcadores químicos en propóleos de la region del altiplano mexicano. Tesis UNAM, México D.F.
 - ❖ Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., 2003. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. *Mutation Research* 544, 195-201.
 - ❖ Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L., 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports* 28, 925-936.
 - ❖ Sá-Nunes, A., Faccioli, L. H., & Sforcin, J. M. (2003). Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 93–97
 - ❖ Serra Bonvehí, J., Ventura Coll, F., & Escolà Jordà, R. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71(5), 529–532.
 - ❖ Shahidi, F. (1997). *Natural antioxidants: Chemistry, health effects, and applications*. Urbana, IL: AOCS Press.
 - ❖ Sharma, R.N., Bhosale, A.S., Joshi, V.N., Hebalkar, D.S., Tungikar, V.B., Gupta, A.S., & Patwardhan, S.A. (1981). *Lavandula gibsonii*. A plant with insectistatic potential. *Phytoparasitica*, 9, 101–109
 - ❖ Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101(3), 1012-1018.
 - ❖ Skaltsa, H. Labdane Diterpenes from *Marrubium thessalum*. *Phytochemistry* 2009, 70, 635–640
 - ❖ Soler, E., Dellacassa, E., Moyna, P., 1986. *Phytochemistry* 25, 1343
 - ❖ Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., 2007. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 535–538
 - ❖ Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 697390.
 - ❖ Tortoriello, J., Meckes-Fischer, M., Villareal, M. L., Berlín, B., Berlín, E.A. (1995) Spasmolytic activity of medical plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the Highland of Chiapas. *Phytomedicine*. 2: 57-66.

-
- ❖ Ulubelen, A.; Topcu, G. Chemical and Biological Investigations of *Salvia* species growing in Turkey. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; vol. 20, pp. 659-718, Elsevier Press, New York, 1998.
 - ❖ Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131:645-651
 - ❖ Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F.M., Velazquez, E.F., Astiazaran, H., Hernandez, J., 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1747-1756.
 - ❖ V. J. McKelvey-Martin, M. H. L. Green, P. Schmezer, B. L. Pool-Zobel, M. P. De Meó and A. Collins, *Mutation Res.* 288, 47 (1993).
 - ❖ Wagh, V.D., 2013. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences* 2013, 308249.
 - ❖ Wang, F. and Lou, H. (2000), *Acta Pharm. Sin.* 35, 587-591
 - ❖ Wang HG, Zhou MH, Lu JJ, et al. Antitumor constituents from the leaves of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *Chem Ind Forest Prod*, 2008, 28(2): 1-5.
 - ❖ Ye, C.L., Liu, J.W., Wei, D.Z., Lu, Y.H., Qian, F., 2005. In vivo antitumor activity by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3', 5'-dimethylchalcone in a solid human carcinoma xenograft model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56, 70–74.
 - ❖ Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V., Kittikoo, P., 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* 75, 89-92

10. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- ❖ Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2012. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html> consultada el 20 de junio del 2016.
- ❖ OMS a través de (http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/) Consultado el día 26 de agosto del 2016.