

UNIVERSIDAD DE SONORA
UNIDAD REGIONAL NORTE
CAMPUS CABORCA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**“Determinación de la Actividad Antibacteriana
Y Antioxidante en Propóleos de dos regiones
de Sonora”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

MONICA GUADALUPE SALCIDO GALLEGO

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para evaluar la Tesis de Monica Guadalupe Salcido Gallego, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico.

M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda

Presidente

M.C. María del Carmen García Moraga

Secretaria

M.C. Moisés Navarro Navarro

Primer Vocal

Q.B. Rafael de la Rosa López

Segundo Vocal

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias y en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Ciencias Químico Biológicas (URCentro). Se contó con apoyo interno con la **Clave *PI05-URN08***

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de lograr una de las metas más importantes en mi vida, terminar mi carrera.

A la Universidad de Sonora, mi querida escuela, la cual se convirtió como mi segunda casa y mi refugio todo este tiempo, quedará grabada para siempre en mi corazón y en mi mente.

A mi director de tesis M.C Ramón Efraín Lugo Sepúlveda, por su gran ayuda y apoyo a este proyecto, pero sobre todo por su invaluable paciencia, todos sus consejos, sus enseñanzas, por brindarme su confianza, y creer en mí, compartir juntos el amor por el chocolate, su amistad, y tantas cosas que vivimos como grupo de trabajo, al sacar adelante este proyecto, MUCHAS GRACIAS!! Se lo agradezco de corazón, por siempre.

A mis asesores, Q.B. Rafael de la Rosa López y M.C. María del Carmen García Moraga, por su gran apoyo en la revisión y mejoramiento del trabajo.

Al M.C. Moisés Navarro Navarro, por su labor en el procedimiento de la evaluación de actividad antibacteriana

Al Dr. Carlos Velázquez Contreras por su colaboración con el Laboratorio de Inmunología en la realización de la evaluación de actividad antibacteriana.

A la M.C. Dora Edith Valencia, por su tiempo con el método de DPPH y ayuda en la realización de cálculos.

Al M.C. Eligio Espinoza Ojeda, por su gran apoyo a través de toda la carrera, por sus consejos y enseñanzas, por toda la ayuda que me brindó, MUCHAS GRACIAS!!

Al personal del laboratorio, Víctor Lizandro Ortiz Tiznado (Chico) y Lucia López Ornelas por su amistad todos estos años.

A todos mis maestros, por todos sus conocimientos, sus consejos, por todos los momentos que compartimos a lo largo de toda la carrera.

A mis amigos: Jorge Luis Parra Luna, que gracias a nuestra promesa hoy con esto concluyo llena de satisfacción mi carrera. A Irma Alicia García Ruíz y su insistencia a no dejarme vencer, por tanto decirme que me titulara, esto va para ti... A Ivan Edgardo de la Vara Morales, mi pareja de baile estrella, a tu amistad, tantos escenarios compartidos, y ser mi amigo!!!

DEDICATORIA

A mis abuelos Rodolfo y Aída

A mi nana Mariana

Dedicada también a la memoria de Concepción Salcido (Q.D.E.P)

**A mis Padres Adalberto Salcido y Ma. Josefina Gallego
Por su apoyo, esfuerzo y sacrificio.**

A mis hermanos, ADALBERTO Y JESUS DIEGO

A mi gran Amor, Ramón Lavander (M o n c h o), por estar todo este tiempo a mi lado, tenerme paciencia y llenar mi espacio de amor y felicidad.

Y en especial, a quien es mi razón de existir, de luchar y seguir adelante, nuestra alegría! Mi hermosa hija, “Mi estrella”,

MONICA MICHELLE



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Que Son los Propóleos	1
1.2 Actividad Antibacteriana	5
1.3 Actividad Antioxidante	6
2. ANTECEDENTES	13
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo General	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. PARTE EXPERIMENTAL	18
4.1 Material Biológico	18
4.2 Extracto Metanólico	19
4.3 Actividad Antibacteriana	19
4.4 Actividad Antioxidante	26
4.4.1 Fenoles Totales	26
4.4.2 Capacidad Antioxidante	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Actividad Antibacteriana	28
5.2 Cantidad de Compuestos Fenólicos	32
5.3 Capacidad Antioxidante	32

6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	37
8. RECOMENDACIONES	38
9. BIBLIOGRAFÍA	39
10. APÉNDICE	43
10.1 Obtención de Extractos Metanólicos de Propóleos (EMP)	43
10.2 Método Microdilución en Caldo	45
10.3 Método de Folin-Ciocalteu	58
10.4 Técnica de DPPH	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Variedad de componentes químicos del propóleo.	3
2. Estructura química básica de los flavonoides. Se le pueden adicionar grupos tales como oxhidrilos, metilos, azúcares etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides.	8
3. Estructura química de los compuestos purificados y caracterizados de los propóleos de Ures, Sonora. (A) pinocembrina, (B) 3-O-acetato de pinobanksina, (C) Crisina.	10
4. Contenido de fenoles totales en propóleos sonorenses, PC (Propóleos de Caborca), PU (Propóleos de Ures) y PPA (Propóleos de Pueblo de Álamos) se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando una mezcla de pinocembrina/galangina como estándar para la curva de calibración.	11
5. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de propóleos sonorenses por el método DPPH. Los extractos se probaron en concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL. Como referencia se utilizó Vitamina C (VIT C) a una concentración de 70 µM.	12
6. Ubicación geográfica de las dos regiones de Sonora: Magdalena de Kino y Sonoyta. Se utilizó GPS para determinar las coordenadas: 30° 36' 41.8" LN; 110° 57' 32.7" LW; y una altitud de 770m sobre el nivel del mar, para Magdalena de Kino y para Sonoyta 51' 43.9" LN; 112° 50' 36.2" LW.	20
7. Diagrama de flujo.	21
8. Imágenes de recolección en Sonoyta Sonora	22
9. Obtención del Extracto Metanólico de Propóleos.	23
10. Actividad antibacteriana en propóleos de dos regiones de Sonora. Muestras PM y PS, frente a cultivos bacterianos tratados con diferentes dosis de propóleos durante 48h. (■) 400µg/mL, (▲) 200µg/mL, (▼) 100µg/mL, (◆) 50µg/mL, (●) 0.0µg/mL, (□) gentamicina. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media ± desviación estándar de análisis triplicados.	30

Figura	Página
11. Contenido de fenoles totales en propóleos de dos regiones de Sonora. Propóleos de Magdalena de Kino PM y Propóleos de Sonoyta PS mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar en la curva de calibración.	33
12. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de dos regiones de Sonora. Propóleos de Magdalena PM y Propóleos de Sonoyta PS, por el método del DPPH, utilizando VIT C como control. Las determinaciones se realizaron por triplicado.	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Concentración mínima inhibitoria 90% (MIC ₉₀) (µg/mL) de los EMP frente a cepas de colección, de propóleos de Ures, Caborca y Pueblo de Álamos.	16
2. Porcentaje de Inhibición del desarrollo de los microorganismos en estudio frente a diferentes concentraciones del EMP de Magdalena a las 24 horas de incubación.	31
3. Porcentaje de Inhibición del desarrollo de los microorganismos en estudio frente a diferentes concentraciones del EMP de Sonoyta a las 24 horas de incubación.	31

ABREVIATURAS

AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
CAPE	Éster Fenílico del Ácido Caféico
Cf	Concentración Final
Ci	Concentración Inicial
CMH	Caldo Mueller Hinton
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
EEP	Extracto Etanólico de Propóleos
EMP	Extracto Metanólico de Propóleos
LN	Latitud Norte
LW	Longitud Oeste
MeOH	Metanol
Na_2CO_3	Carbonato de Sodio
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de Sodio Tetrahidratado
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Tungstato de Sodio Dihidratado
NF-Kb	Factor de Transcripción Nuclear
PM	Propóleos de Magdalena de Kino
PS	Propóleos de Sonoyta

ABREVIATURAS

UFC	Unidad Formadora de Colonias
Vf	Volumen Final
Vi	Volumen Inicial
VIT C	Vitamina C

RESUMEN

En la búsqueda de alternativas preventivas y terapéuticas, ha llevado estudiar diversos compuestos de productos naturales como los propóleos que han resultado ser más efectivos que los medicamentos convencionales. El uso indiscriminado de antibióticos ha generado resistencia sobre algunas bacterias, la cual a los propóleos no se les ha descrito ninguna, como compuestos bioactivos de los propóleos, los fenoles limitan el riesgo de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Los propóleos tienen como principal ventaja que no causan efectos secundarios.

En el presente estudio se determinó la actividad antibacteriana y la actividad antioxidante donde se cuantificó el contenido de fenoles totales y la capacidad captadora de radicales libres en propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta, en el estado de Sonora.

En este estudio, para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron cepas de colección de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* 25922 y *Vibrio cholerae* no. O1, por el método de microdilución en caldo, donde los propóleos de Magdalena PM inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, que es una bacteria gram positiva, por tiempos más prolongados en comparación con los propóleos de Sonoyta PS

En la actividad antioxidante, Magdalena presentó un mayor contenido de fenoles totales con 377.17mg/g realizado por el método de Folin-Ciocalteu y un porcentaje de 36.56% de capacidad antioxidante determinado con el método

de DPPH, a diferencia de Sonoyta que solo mostró 166.94mg/g de fenoles totales y solo el 9.28% en capacidad antioxidante.

Como conclusión, los propóleos de Magdalena tienen una mayor actividad antibacteriana y antioxidante con respecto a los propóleos de Sonoyta, por que difieren cualitativamente y cuantitativamente en componentes, por lo que se recomienda para futuras investigaciones realizar una determinación de sus constituyentes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Que Son los Propóleos

Los propóleos son sustancias resinosas altamente adhesivas, recolectadas y transformadas por las abejas *Apis mellifera*, a partir de yemas y brotes de las hojas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas) durante su actividad de pecoreo. La utilizan para sellar los agujeros, fijar los paneles de miel, pulir las paredes interiores y proteger la entrada contra los intrusos. Pueden ser de color amarillo claro a castaño oscuro, rojos y verdes, sabor amargo, ligeramente picante o insípido, consistentes o gomosos.¹

Durante el proceso de recolección, transporte y almacenamiento a la colmena, ellas adicionan sustancias enzimáticas y salivales de la hipofaringe y de glándulas cereras, presentes en el esternito del abdomen de la abeja.² Estas utilizan los propóleos para distintos fines: para cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, el embalsamado de intrusos, evitar enfermedades y vibraciones en su interior, cumpliendo además con una función antibiótica, manteniendo un ambiente estéril en ella. Las abejas llegan a embalsamar los cuerpos de ratones y mariposas que hayan podido entrar a la colmena, impidiendo así su putrefacción; es su material de defensa para mantener la colmena aséptica.³

Se dice que el propóleos es una sustancia muy compleja, ya que lo constituye una variedad de componentes químicos. En la actualidad se han

aislado más de 180 compuestos, teniendo como principales componentes a los flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres. Se caracteriza por tener 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% de polen, todo esto dependiendo del lugar de recolección, estación del año, clima y vegetación.¹⁻⁸ (Ver Figura 1)

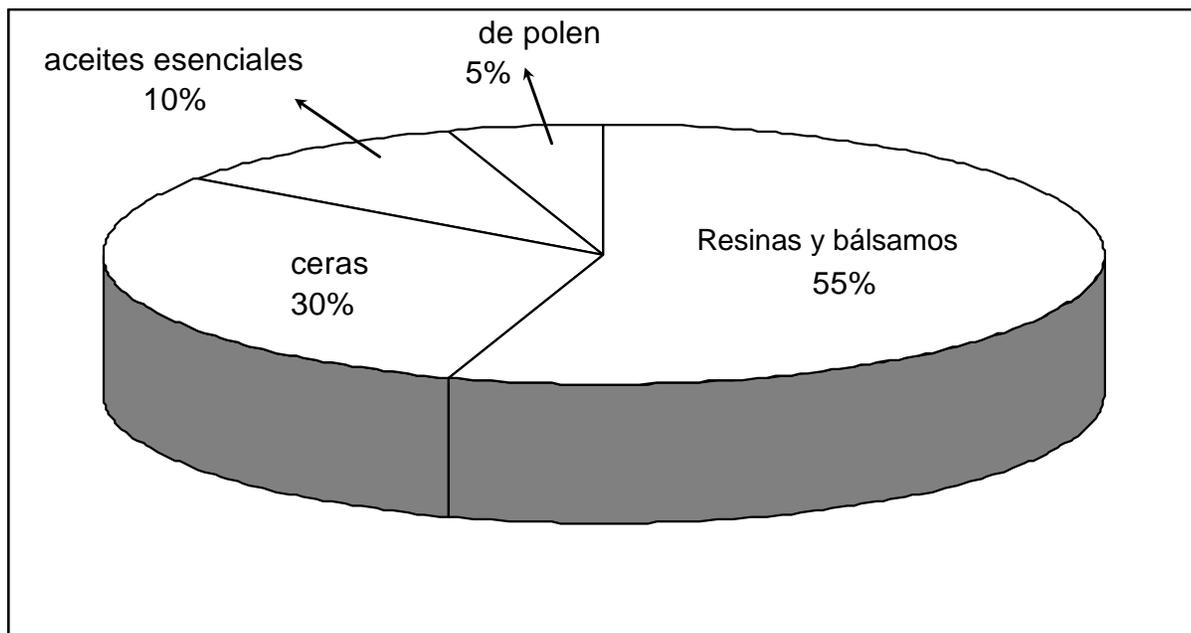
Algunos autores reportan alrededor de 18 diferentes tipos de componentes, señalando como principales flavonoides, flavonas, flavones y flavanonas.⁴

En los propóleos europeos se han encontrado más de 160 compuestos identificados como responsables de sus propiedades farmacéuticas.

Desde la antigüedad, los propóleos han sido conocidos principalmente con fines medicinales, con propiedades tales como: antioxidante (dado por su comportamiento similar a la vitamina E sobre la estabilización de la peroxidación lipídica)⁶ anticarcinógeno, antiinflamatorio, cicatrizante analgésico, antiviral, antifúngico, y una gran capacidad antibacteriana la cual se le atribuye a los flavonoides.⁷

Los propóleos son una fuente natural de antioxidantes, que protegen las lipoproteínas séricas de la oxidación. Sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad anti radicalaria particularmente frente a radicales alcoxi y en menor grado, a superóxido además de su efecto inhibidor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad.⁷

La presencia de metabolitos secundarios en los propóleos son los que le confieren las propiedades terapéuticas tal es el caso de los aceites esenciales cuyas propiedades fundamentales son su poder antiséptico, desinfectante y antihelmíntico.



Fuente: Farré R., Frasset I., Sanchez A., 2004.

FIGURA 1: Variedad de componentes químicos en los propóleos

Las plantas de las cuales recolectan propóleos las abejas son distintas para cada región. Este se clasifica de acuerdo a su origen botánico. Por ejemplo, hay propóleos ricos en polen de especies de *Eucalyptus*, *Populus* y *Baccharis*.⁸

Se sabe que en la zona templada (Europa, Norte de América y Norte de Asia) los propóleos provienen de exudados de brotes de álamos pertenecientes al género *Populus spp*, los que han mostrado un alto contenido de flavonoides.⁹⁻¹⁰

Existen propóleos verdes de Brasil y de Chile central en los que predomina polen de *Baccharis*.⁸ Algunos autores reportan, que el origen de los propóleos de Uruguay son: *Eucalyptus globules*, *Populus sp*, *Betula sp* y *Salix sp*.¹¹

En zonas tropicales (África, América del Sur, México, Cuba) se caracterizan por la ausencia de álamos, por lo que los propóleos de estas regiones contienen compuestos químicos diferentes.⁹ En Cuba existen propóleos donde la fuente predominante es la especie *Clusia*.⁸

Las regiones áridas y semiáridas se caracterizan por climas secos y altas temperaturas. En el desierto de Sonora predominan las especies de *Ambrosia deltoidea* (chicurrilla, huizapol) y *Encelia farinosa* (hierba ceniza, incienso)⁹

Los propóleos se recogen de las colmenas por medio de trampas o raspado, siendo el atrapado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación, la recolección se hace antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales, al inicio de la estación lluviosa, cuando la propolización parece más activa. Se obtiene una producción anual de 10–300gr/colmena.⁷

1.2 Actividad Antibacteriana

El uso indiscriminado de antibióticos ha generado resistencia bacteriana, por lo cual es preciso tener alternativas preventivas y terapéuticas, como los propóleos a los cuales no se les ha descrito resistencia alguna.¹²

Las propiedades antibacterianas de los propóleos se le han atribuido como principalmente a los flavonoides tales como la pinocembrina, galangina, pinobanskina y al éster fenético del ácido cafeico (CAPE),¹³ el cual es un componente activo de los propóleos que ejerce una gran variedad de cambios biológicos en diversos sistemas.¹⁴

Distintos propóleos han sido evaluados frente a bacterias gram positivas, entre ellas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, y gram negativas como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*, teniendo una mayor efectividad sobre las primeras.

Los compuestos cinámicos y flavónicos de propóleos, que alteran las membranas e inhiben la motilidad bacteriana, probablemente contribuyan a esta acción y al sinergismo observado con algunos antibióticos.⁷

Según los estudios, el microorganismo más sensible de los ensayados, hasta hoy, corresponde a *Staphylococcus aureus*.¹⁵ El uso de los flavonoides contra infecciones bacterianas o fúngicas tiene como objetivos matar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas.¹⁵

Estudios a propóleos argentinos reportan que el 50% de las muestras inhibieron en más de 12mm cepas de *S. aureus*, concluyendo que el diámetro del halo de inhibición depende del contenido de flavonoides de los EEP utilizados.¹⁶

En el estudio realizado por Moreno,¹² el efecto antibacteriano de propóleos argentinos, colombianos y cubanos, en *Streptococcus mutans*, uno de los principales microorganismos implicados en el desarrollo de la caries dental, convirtiendo a esta patología en un problema de salud pública. En dicho estudio los propóleos mostraron inhibición en la unión de este microorganismo a la superficie del esmalte, actuando sobre la enzima glucosiltransferasa que ha sido reconocida como un factor de virulencia en la patogenicidad de la caries dental.¹⁷

Existen pocos estudios relacionados con el mecanismo bioquímico de acción antibacteriana de compuestos presentes en los propóleos. Algunos autores reportan que los compuestos presentes en diversos propóleos inducen un daño directo o indirecto a la membrana citoplasmática de *Staphylococcus aureus*, como es el caso del flavonoide galangina. También, que algunos propóleos son más fuertes que otros frente a células de *S. aureus* que se encuentran desarrollando en la fase exponencial tardía.¹⁸

1.3 Actividad Antioxidante

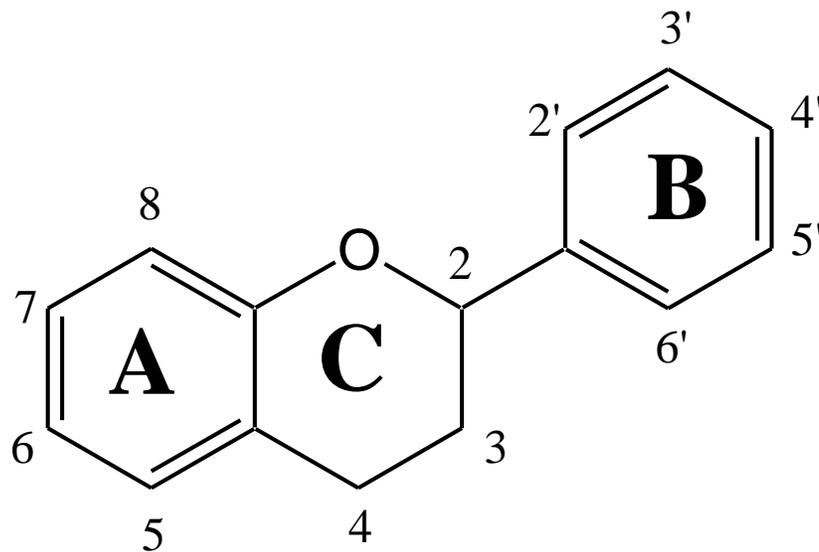
Como principales componentes bioactivos de los propóleos están los compuestos fenólicos y flavonoides, que son comunes en las plantas, ambos protegen de la radiación solar a los tejidos vegetales.¹⁹

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, cumárico y cinámico, comunes en los vegetales y en los propóleos.

Los flavonoides están conformados por una estructura básica que consiste de 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, metoxilo, azúcares, etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides (Ver figura 2). 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.¹⁹

Algunos ejemplos de ellos son: apigenina, quercetina, kaempferol, pinocembrina, galangina, crisina y hesperidina que son los más comunes en plantas y en propóleos. Otras fuentes de donde las podemos obtener es del té, ciertas verduras como cebolla, brócoli, apio, repollo, zanahoria, y algunas frutas como: manzana y naranja.¹⁹

Como antioxidantes, los fenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo.²⁰



Fuente: Acosta S. Ana Lilian, 2007

FIGURA 2: Estructura química básica de los flavonoides. Se le pueden adicionar grupos tales como oxhidrilos, metoxilo, azúcares etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides.

Tanto los flavonoides como el CAPE, han sido objeto de diversas evaluaciones farmacológicas. El CAPE inhibe la síntesis de eicosanoides y del óxido nítrico, lo que se podría tratar de un efecto indirecto debido a la inhibición de radicales libres o de algún promotor de la óxido nítrico sintetasa. Galangina es un flavonoide relevante y posiblemente junto al compuesto anterior dan una mayor actividad inhibitoria de radicales libres.

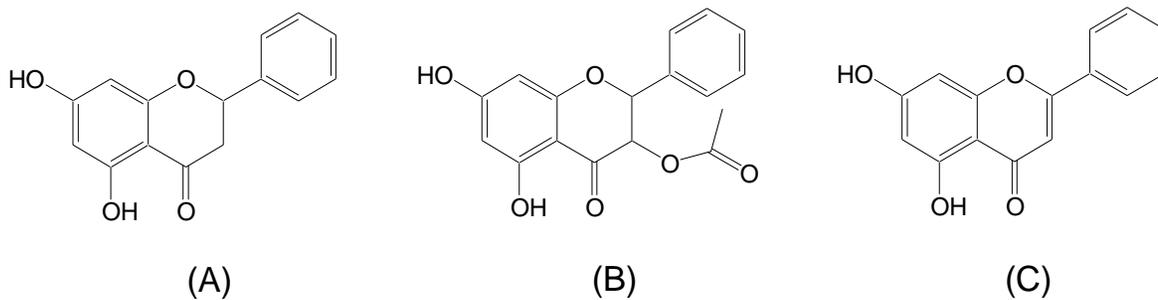
Un estudio sobre la composición de los propóleos del Perú demostró tener actividad antioxidante poco potente, correlacionado con la baja concentración de CAPE.⁸

Un estudio realizado a propóleos, de los departamentos de la provincia de Santiago de Estero, Argentina, mostraron ser de buena calidad, debido al contenido de fenoles y flavonoides presentes.¹⁶

En estudios realizados en Sonora, se han aislado e identificado los flavonoides pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina y crisina, como componentes bioactivos de los propóleos (Ver figura 3).⁹

Se realizó un estudio a propóleos sonorenses, de Ures, Caborca y Pueblo de Álamos. Los propóleos de Ures obtuvieron un mayor contenido de fenoles totales con 311.1mg/g, seguido por propóleos de Caborca con 255.3mg/g y por ultimo propóleos de Pueblo de Álamos con solo 148.5mg/g de propóleos.²¹ (Ver figura 4)

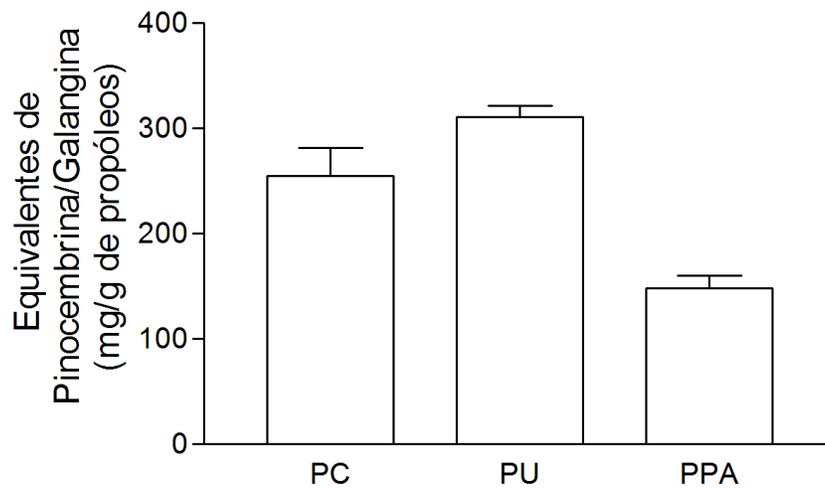
En cuanto a la capacidad antioxidante, los propóleos de Caborca mostraron mayor actividad a 86.6% que los propóleos de Ures a 23.3% y Pueblo de Álamos con únicamente 22.43% (Ver figura 5).²¹



Fuente: Lugo S. R., 2003

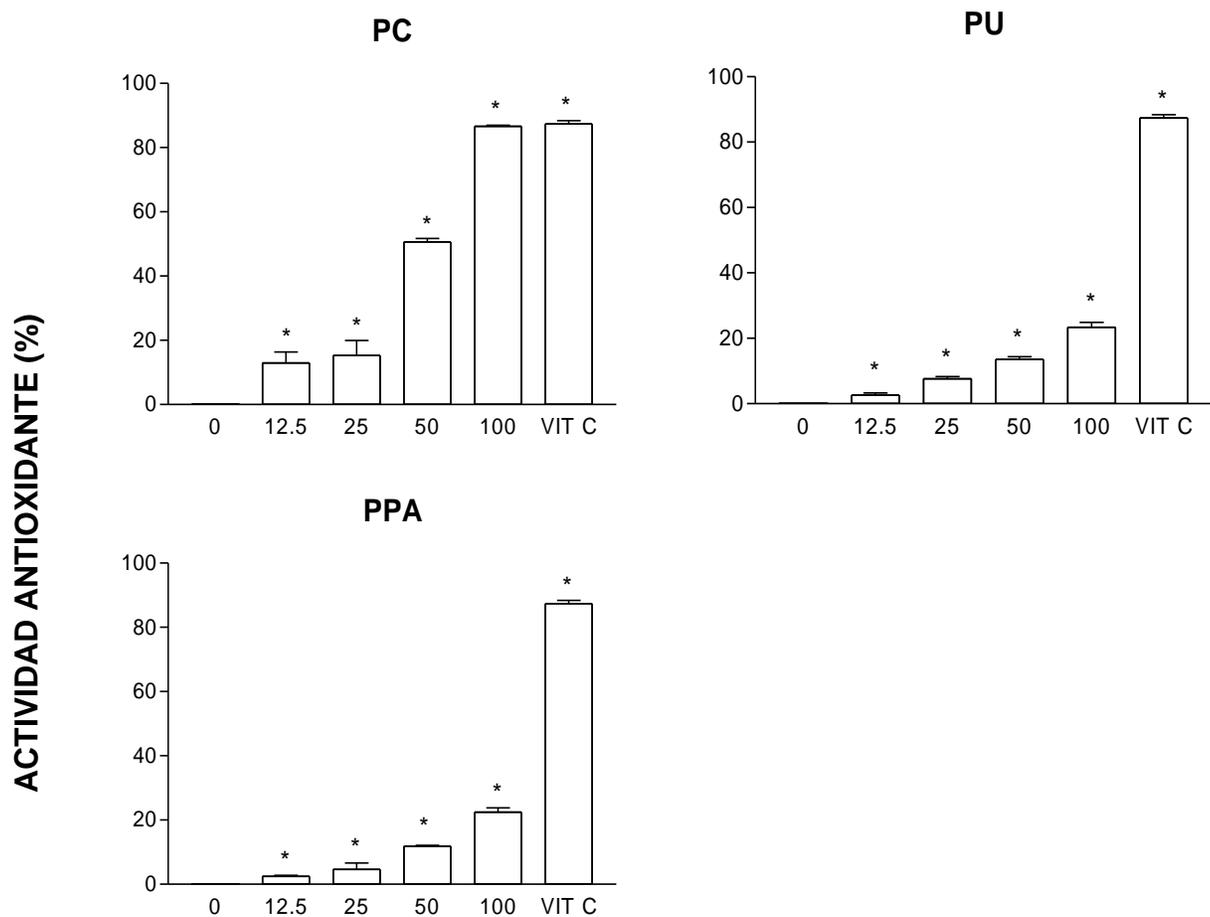
FIGURA 3: Estructura química de los compuestos purificados y caracterizados de los propóleos de Ures, Sonora. (A) pinocembrina, (B) 3-O-acetato de pinobanksina, (C) Crisina.

FENOLES TOTALES



Fuente: Acosta S. Ana Lilian, 2007

FIGURA 4. Contenido de fenoles totales en propóleos sonorenses, PC (Propóleos de Caborca), PU (Propóleos de Ures) y PPA (Propóleos de Pueblo de Álamos) se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando una mezcla de pinocebrina/galangina como estándar para la curva de calibración.



Fuente: Acosta S. Ana Lilian, 2007

FIGURA 5: Actividad antioxidante de extractos metanólicos de propóleos sonorenses por el método DPPH. Los extractos se probaron en concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100µg/mL. Como referencia se utilizó Vitamina C (VIT C) a una concentración de 70µM.

2. ANTECEDENTES

Desde tiempos remotos se han utilizados los productos de la apicultura para tratar distintas dolencias; en el primer libro médico: “Libro de preparación de medicamentos para todas las partes del cuerpo humano”, en el papiro de Ebers (hace más de 1700 años a.C), se mencionan los propóleos como medicina. En el antiguo Egipto los utilizaban como uso medicinal y como parte integrante de los ungüentos y cremas de embalsamar. Hipócrates (460-377 a.C) los prescribió para el tratamiento de las úlceras de la piel y Aristóteles para el tratamiento de abscesos y heridas. En la edad media se utilizaba en ungüentos como antisépticos, cicatrizantes de heridas y en solución para la desinfección bucal.²²

El termino propóleos proviene del griego (pro: delante o en defensa de y polis: ciudad; delante de la ciudad, es decir, de la colmena) “defensa de la ciudad”.²³

Se ha mencionado que el propóleos es un componente muy común en los cosméticos denominados naturales, como lociones, cremas, bálsamos, aceites de masaje, champús, jabones, barras de labios o filtros solares.²³

Estudios recientes han demostrado que los propóleos son más efectivo que algunos medicamentos convencionales sobre diversos organismos patógenos, con la ventaja que no causa efectos secundarios.²⁴ Se hizo un estudio preliminar del efecto radioprotector de diferentes propóleos cubanos en que las radiaciones a las que son sometidos los enfermos de cáncer dejan una serie de secuelas que suelen ser, en ocasiones fatales. Dentro de los efectos adversos se encuentran: la

depresión del sistema inmune, las lesiones epidérmicas que pueden convertirse en daños más profundos con complicaciones sistémicas. Se ensayaron los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de dos muestras recolectadas en diferentes zonas de la provincia de Pinar del Río (Cuba) en ratones, los cuales fueron tratados con dosis de 50mg/kg antes de ser irradiados con dosis mortales de cobalto 60. Los propóleos mostraron actividad radioprotectora en los ratones, algunas referencias sugieren que el efecto protector de este producto natural se deba a su acción antioxidante y secuestradora de radicales libres. El uso de los propóleos frente a las radiaciones se mostró más efectivo que su uso en el tratamiento de la enfermedad radiante.²⁴

Se realizaron estudios a extractos de propóleos de varias regiones de México, evaluando la actividad fungicida frente a cepas de *Candida albicans*, mostrando algunos más alta actividad biológica que otros. Trabajos previos han demostrado que las diferencias en la actividad biológica de diversos extractos de propóleos se deben a su composición química, señalando como principales responsables al ácido cafeico, los flavonoides y los ésteres fenólicos.²⁵

Uno de los compuestos aislados de los propóleos con actividad antiproliferativa más estudiado es CAPE, el cual ha mostrado ser un potente y específico inhibidor del factor de activación de transcripción nuclear NF- κ B, (este factor tiene un papel central sobre el control de la expresión de varias citocinas inflamatorias, así como del complejo principal de histocompatibilidad y sobre moléculas de adhesión involucradas en metástasis tumoral). Además es un potente antimitogénico, anticarcinógeno, antiinflamatorio y posee propiedades

inmunomoduladoras. Estos hechos han mostrado a CAPE como un componente activo de los propóleos.⁹

Resultados de investigación realizada a propóleos de Caborca, Ures y Pueblo de Álamos Sonora, demostraron que los propóleos provenientes del estado de Sonora poseen compuestos capaces de inhibir la proliferación de líneas celulares transformadas (actividad antiproliferativa) y de neutralizar radicales libres (actividad antioxidante). Su composición química comprende principalmente constituyentes de tipo flavonoide siendo pinocembrina, pinobanksina, acetato de pinobanksina, crisina y galangina los compuestos mayoritarios presentes en las tres muestras de propóleos evaluadas, lo cual permite sentar las bases para el desarrollo de futuras investigaciones.²¹

En la evaluación de la actividad antibacteriana a propóleos sonorenses, así como de sus principales constituyentes hecha por Moisés Navarro en su tesis de maestría,¹⁸ las muestras de propóleos de Ures y Caborca presentaron una fuerte actividad antibacteriana, principalmente contra las bacterias gram positivas (Ver Tabla 1). Una gran cantidad de reportes indican que los extractos de propóleos presentan mayor actividad antibacteriana en gram positivas. Se ha sugerido que el lipopolisacárido presente únicamente en bacterias gram negativas, puede ser una barrera que impida la actividad de los compuestos antibacterianos presentes en los propóleos.¹⁸

Hasta ahora no se ha demostrado que exista una sustancia individual o una clase particular de sustancias responsables de la actividad biológica y se considera que tiene una actividad sinérgica entre diferentes compuestos.²⁵

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria 90% (MIC₉₀) (µg/mL) de los EMP frente a cepas de colección, de propóleos de Ures, Caborca y Pueblo de Álamos.

CEPAS	PROPÓLEOS µg/mL		
	Ures	Caborca	Pueblo de Álamos
GRAM POSITIVOS			
<i>S. aureus</i> 6538P	100	200	>400
<i>S. aureus</i> 25923	100	200	>400
<i>S.aureus</i> 29213	200	200	>400
<i>L.monocytogenes</i> 7644	400	>400	>400
<i>E. faecalis</i> 29212	>400	>400	>400
GRAM NEGATIVOS			
<i>P. aeruginosa</i> 27853	>400	>400	>400
<i>E. coli</i> 25922	>400	>400	>400

Fuente: Navarro Moisés, 2007

3. OBJETIVOS

Para llevar a cabo la presente investigación, se plantearon los siguientes objetivos.

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana y actividad antioxidante en propóleos de dos regiones de Sonora.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtención de propóleos de las regiones de Magdalena de Kino y Sonoyta.
- 2) Obtención de los extractos metanólicos.
- 3) Conocer la concentración mínima inhibitoria de los extractos de propóleos.
- 4) Determinar la cantidad de compuestos fenólicos en los extractos de propóleos.
- 5) Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos por medio colorimétrico.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material Biológico

Se evaluaron muestras de propóleos de dos regiones de Sonora: Magdalena de Kino y Sonoyta (Ver figura 6) (Ver figura 7 para diagrama de flujo).

Durante el mes de abril del 2009 se colectaron propóleos en la ciudad de Magdalena de Kino, Sonora, de las colmenas ubicadas a orillas de la carretera internacional México–Nogales (30° 36' 41.8" LN; 110° 57' 32.7" LW; y una altitud de 770m sobre el nivel del mar), pertenecientes al Sr. Luis Eduardo González, la muestra fue obtenida por el método de raspado, se utilizó una espátula de acero inoxidable para remover las resinas adheridas a las paredes de la colmena (Ver figura 8). Se cubrió de la luz y se refrigeró hasta su uso. El peso de la muestra fue de 52g, de color café oscuro, con un olor picoso, agrio. Las especies vegetales predominantes en esa región: hierba del bazo (*Encelia frutescens*), mezquite (*Prosopis spp.*), palo verde (*Parkinsonia microphylla*), uña gato (*Uncaria tomentosa*).

Lo mismo para Sonoyta, en abril del 2009 se colectaron los propóleos en las colmenas ubicadas a 31° 51' 43.9" LN; 112° 50' 36.2" LW; a una altitud de 386m sobre el nivel del mar. La muestra fue obtenida por el método de raspado, se utilizó una espátula de acero inoxidable para remover la resina adherida a las paredes de la colmena. Se cubrió de la luz y se refrigeró hasta su uso. Su peso fue de 39g, de color café claro sin presentar un olor específico. Como flora

predominante: palo verde (*Parkinsonia microphylla*), gobernadora (*Larrea tridentada*), palo fierro (*Olneya tesota*), mezquite (*Prosopis spp.*) cardón o sahuevo (*Pachycereus pringle*).

4.2 Extracto Metanólico

Se tomaron las dos muestras de propóleos, previamente molidas (Ver figura 9) y cada una se colocó sobre un matraz erlenmeyer y se les adicionó 300mL de MeOH, la mezcla se agitó por 24h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró sobre una tela de algodón con la finalidad de eliminar todo tipo de sólidos, restos de polen, tierra, madera etc. De ahí, se filtró nuevamente a través de papel filtro, para concentrar los extractos totales en el matraz de un rotavapor bajo presión reducida a una temperatura aproximada de 40°C secándose al alto vacío (1×10^{-4} mmHg), obteniendo un sólido el cual se cubrió de la luz, y se almacenó a 8°C.⁹ (Ver apéndice 8.1)

4.3 Actividad Antibacteriana

La evaluación antibacteriana se realizó en colaboración con el Laboratorio de Inmunología del Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras del Departamento de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad de Sonora, Unidad Centro, utilizando el método de microdilución en caldo asesorado por el M.C Moisés Navarro Navarro.¹⁸



FIGURA 6: Ubicación geográfica de las dos regiones de Sonora: Magdalena de Kino y Sonoyta. Se utilizó GPS para determinar las coordenadas: 30° 36' 41.8" LN; 110° 57' 32.7" LW; y una altitud de 770m sobre el nivel del mar, para Magdalena de Kino y para Sonoyta 51' 43.9" LN; 112° 50' 36.2" LW.

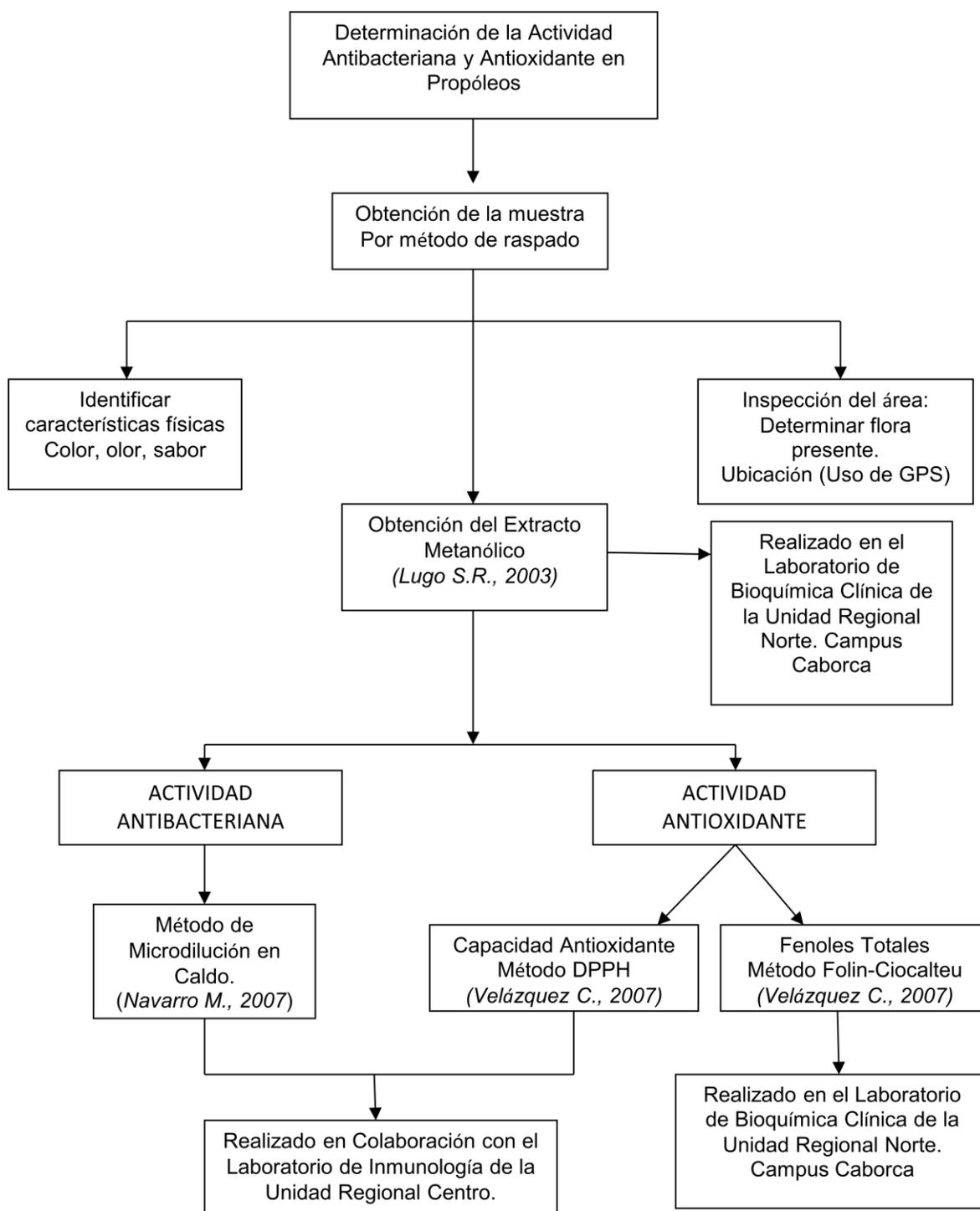


FIGURA 7: Diagrama de Flujo



FIGURA 8: Imágenes de recolección en Sonoyta Sonora.

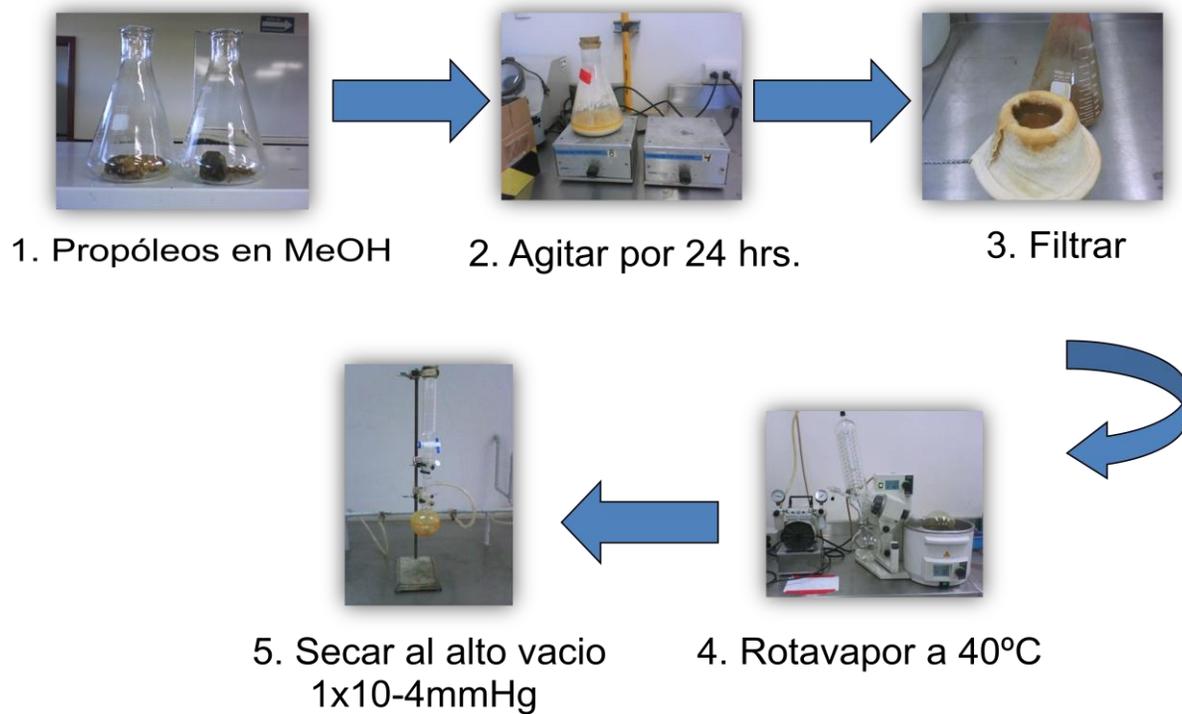


FIGURA 9: Obtención del Extracto Metanólico de Propóleos

Se realizaron soluciones concentradas de EMP y soluciones de trabajo para llevar a cabo la determinación. (Ver apéndice 8.2)

Soluciones Concentradas y de Trabajo de EMP

Una alícuota de EMP se llevó a un volumen final de 1mL con dimetilsulfoxido (DMSO) para obtener una concentración aproximada de 50,000µg/mL.¹⁸

A partir de las soluciones concentradas, se realizaron diluciones en caldo de Mueller Hinton (CMH), para obtener soluciones de trabajo para los propóleos de 400, 200, 100, 50 y 0µg/mL.¹⁸

Cepas Bacterianas

Se ensayaron las cepas de colección: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* 25922 tomadas del cepario del Departamento de Ciencias Químico y Biológicas y *Vibrio cholerae* no. O1 donada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Inóculo Bacteriano

Se preparó de bacterias con un desarrollo de 12 horas en agar Mueller Hinton (AMH), con solución salina estéril, hasta lograr una densidad óptica de 0.095 ± 0.002 , igual a la lectura de DO del estándar 0.5 del nefelómetro de

MacFarland²⁶ se ajustó a 630nm. El inóculo equivale a 10^8 UFC/mL. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BioRad-Benchmark.¹⁸ (Ver apéndice 8.2)

Determinación de la Actividad Antibacteriana

Se tomaron por triplicado 200 μ L de cada una de las concentraciones de propóleos y se depositaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano. A un primer conjunto de pozos se le adicionó inóculo bacteriano y otro conjunto se preparó sin bacterias. Además se prepararon tres pozos con 200 μ L de caldo de cultivo conteniendo al antibiótico gentamicina (12 μ g/mL), tres pozos con 200 μ L de caldo de cultivo con la máxima concentración de solvente al que las bacterias estuvieron expuestas en los pozos de prueba, y tres más con caldo de cultivo como control de esterilidad. Los pozos de prueba y los controles se inocularon con 15 μ L de una suspensión bacteriana previamente estandarizada. Después de la inoculación, la placa se incubó a 36°C y se leyó la densidad óptica a 630nm (DO_{630}) de los pozos a las 0, 6, 12, 24 y 48h. Con las lecturas se realizaron curvas de desarrollo bacteriano, graficando tiempo contra DO_{630} .¹⁸ (Ver apéndice 8.2)

Concentración Mínima Inhibitoria.

Se define como la concentración más baja de propóleos o compuesto que inhibe el desarrollo bacteriano después de 24h a 36°C, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:¹⁸

$$\frac{(\text{DO}_{630} \text{ bacterias sin tratamiento} - \text{DO}_{630} \text{ concentración de prueba})}{\text{DO}_{630} \text{ bacterias sin tratamiento}} \times 100$$

Análisis Estadístico

Las medias y las desviaciones estándar de las lecturas de DO en las curvas de desarrollo se graficaron utilizando el paquete graph Pad Prism V 3.02.¹⁸

4.4 Actividad Antioxidante

4.4.1 Fenoles Totales

Los compuestos fenólicos fueron determinados haciendo reaccionar las muestras con el reactivo de Folin-Ciocalteu de la marca Phenol TS Spectrum.²⁷⁻²⁹

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de tungstato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y molibdato de sodio tetrahidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en ácido fosfórico y ácido clorhídrico.

Los componentes del reactivo de Folin-Ciocalteu son reducidos a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación de fenoles totales en medio alcalino proporcionado por el carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro de la marca Fermont. La coloración azul se mide a 760nm y refleja la cantidad de fenoles presentes en la muestras. Para construir la curva de calibración, se utilizó ácido gálico de Productos Químicos Monterrey, y se expresó en mg de ácido gálico por

g de extracto (mgGA/g extracto)³⁰ en un espectrofotómetro genesys 20 de la marca Thermo Scientific.³¹⁻³² (Ver apéndice 8.3)

4.4.2 Capacidad Antioxidante

Para realizar esta evaluación se utilizó el método del DPPH³³ (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) que es una fuente de radicales libres, cuando se genera es de color azul intenso, al ser estabilizado por una sustancia antioxidante su color cambia a amarillo pálido. Este cambio se detecta a 517nm.²¹ Como blanco control se utilizó etanol absoluto de la marca J.T. Baker y como control estándar una solución v/v (1:1) de DPPH 150µM disuelto en etanol la cual representó el 0% de actividad antioxidante. Así mismo se utilizó como control de referencia Vitamina C (70µM) marca Sigma disuelta en etanol absoluto (J.T. Baker).

Los extractos metanólicos de propóleos se evaluaron a concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5µg/mL. La mezcla de reacción contenía 0.6mL de DPPH (Aldrich) y 0.6mL de las muestras a probar. La mezcla se agitó e incubó por 30 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 517nm contra el blanco control en un espectrofotómetro AquaMate Plus de la marca Thermo Scientific. Los resultados fueron expresados en porcentaje tomando en cuenta la proporción de degradación de DPPH comparada con el control estándar de acuerdo a la siguiente fórmula: ¹⁸ (ver apéndice 8.4)

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 100 = \% \text{ de inhibición}$$

$$100\% - \% \text{ de inhibición obtenido} = \% \text{ de actividad antioxidante}$$

5. RESULTADOS

En abril del 2009 las muestras de propóleos fueron colectadas, en la ciudad de Magdalena de Kino (30° 36' 41.8" LN; 110° 57' 32.7" LW; y una altitud de 770m sobre el nivel del mar), y en la ciudad de Sonoyta (30° 42' 26.7" LN; 112° 50' 36.2" LW; a una altitud de 386m sobre el nivel del mar), se cubrieron de la luz con papel aluminio, bolsa plástica, refrigerándose hasta su uso. Los propóleos se molieron con una espátula de acero, se colocaron en un matraz erlenmeyer, se le adicionó una cantidad de 300mL de metanol, y se dejó en agitación por 24 horas, obteniendo una mezcla homogénea amarilla, para los propóleos de Sonoyta y café oscuro para los propóleos de Magdalena. Posteriormente se realizó un filtrado con la finalidad de eliminar las impurezas, como polen, tierra y materiales sólidos. El filtrado se concentró en un rotavapor modelo R-210/R-215 de la marca BUCHI a temperatura de 40°C y bajo presión reducida. Se obtuvo un sólido viscoso amarillo para Sonoyta y café oscuro para Magdalena, los cuales se almacenaron en viales color ámbar.

Una vez obtenidos los extractos se procedió a realizar las evaluaciones.

5.1 Actividad Antibacteriana

En la actividad antibacteriana se evaluaron los extractos metanólicos de PM y PS, frente a cepas de bacterias gram positivas y gram negativas como:

Staphylococcus aureus ATCC 6538P, *Escherichia coli* 25922 y *Vibrio cholerae* no.O1. (Ver figura 10) para los resultados obtenidos.

El EMP de la muestra de Magdalena presentó una mayor actividad antibacteriana con una CMI de 200µg/mL durante 48 horas frente a *S. aureus* 6538P, que es una bacteria gram positiva en comparación del EMP de Sonoyta que mostró una CMI de 400µg/mL por solo 24 horas. En cambio, en las bacterias gram negativas, Magdalena presentó una CMI de 400µg/mL en 48 horas para *V. cholerae* O1 y en las muestras de Sonoyta, los EMP mostraron una CMI de 400µg/mL en 24 horas también para *V. cholerae* O1 respectivamente. Ninguno de los dos EMP presentó CMI para *E. coli* 25922. Las concentraciones de DMSO en cada uno de los ensayos, no afectó en el desarrollo bacteriano. (Ver Tabla 2 y 3).

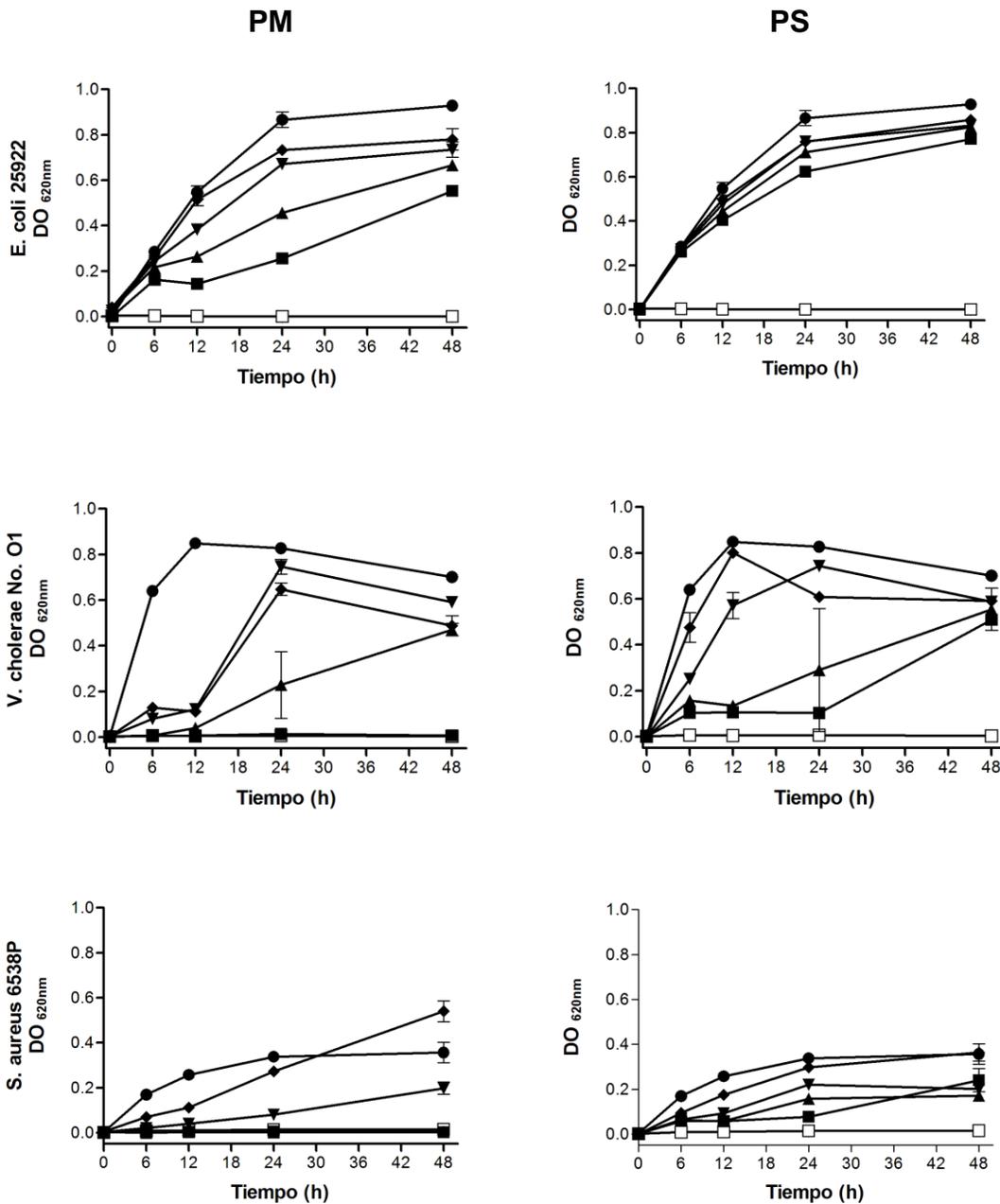


FIGURA 10: Actividad antibacteriana en propóleos de dos regiones de Sonora. Muestras PM y PS, frente a cultivos bacterianos tratados con diferentes dosis de propóleos durante 48h.(■) 400μg/mL, (▲) 200μg/mL, (▼) 100μg/mL, (◆) 50μg/mL, (●) 0.0μg/mL, (□)gentamicina. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media ± desviación estándar de análisis triplicados.

Tabla 2. Porcentaje de Inhibición del desarrollo de los microorganismos en estudio frente a diferentes concentraciones del EMP de Magdalena a las 24 horas de incubación.

Microorganismo	400µg/mL	200µg/mL	100µg/mL	50µg/mL
<i>E. coli</i> 25922	72	52	28.5	22
<i>V. cholerae</i> no O1	98	83	15	30
<i>S. aureus</i> 6538P	99	99.5	78	26

Tabla 3. Porcentaje de Inhibición del desarrollo de los microorganismos en estudio frente a diferentes concentraciones del EMP de Sonoyta a las 24 horas de incubación.

Microorganismo	400µg/mL	200µg/mL	100µg/mL	50µg/mL
<i>E. coli</i> 25922	34	23	19	17
<i>V. cholerae</i> no O1	88	84	15	30
<i>S. aureus</i> 6538P	79	57	40	23

5.2 Cantidad de Compuestos Fenólicos.

En la evaluación de fenoles totales, se puede observar (Ver figura 11) que, Magdalena PM obtuvo el mayor contenido de fenoles totales con 377.17mg/g, seguido de Sonoyta PS con 166.94mg/g la cual se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar en la curva de calibración.

5.3 Capacidad Antioxidante

La actividad antioxidante se obtuvo mediante la capacidad captadora del DPPH. Se probaron los extractos metanólicos de PM y PS a concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100µg/mL, utilizando la vitamina C (VIT C) como control a una concentración de 70µM y como control negativo etanol absoluto (0).

Los resultados presentan que los EMP de la muestra de Magdalena tiene una actividad antioxidante de 36.56% en su máxima concentración que es de 100µg/mL y los EMP de Sonoyta únicamente mostraron el 9.28%, por lo que esto indica que los EMP de Magdalena tienen una mayor capacidad captadora de radicales libres, comparándola con la vitamina C que representó el 100% como control (Ver figura 12) para los resultados obtenidos.

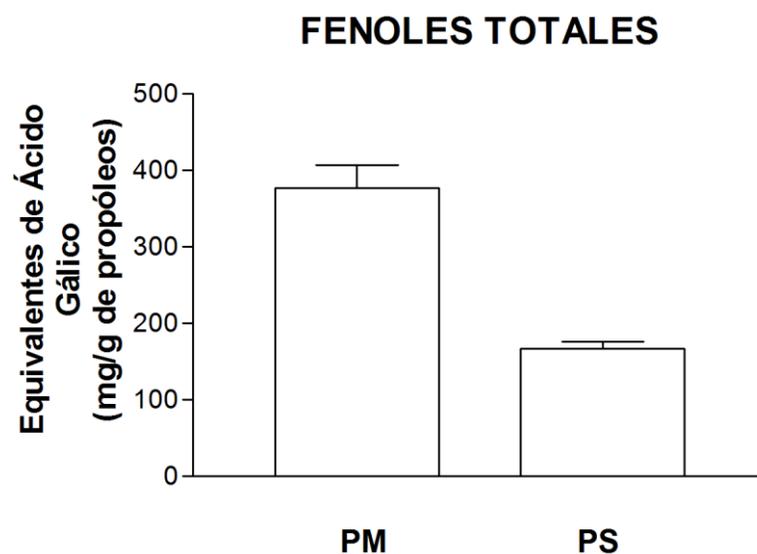


FIGURA 11: Contenido de fenoles totales en propóleos de dos regiones de Sonora. Propóleos de Magdalena de Kino PM y Propóleos de Sonoyta PS mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar en la curva de calibración.

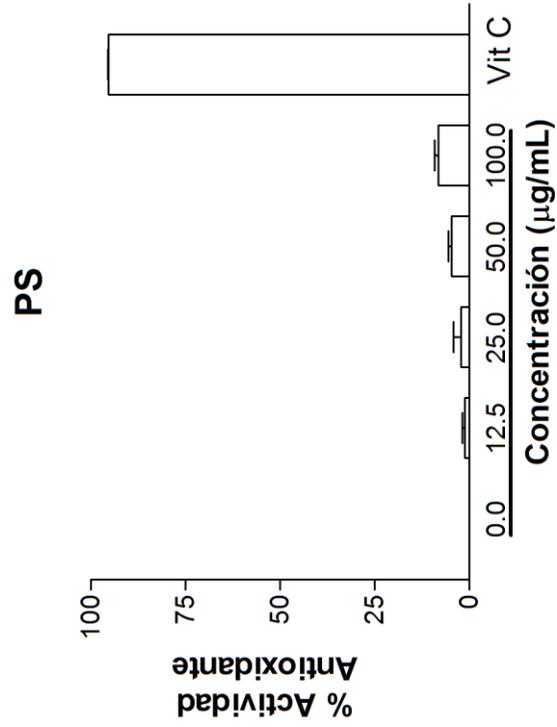
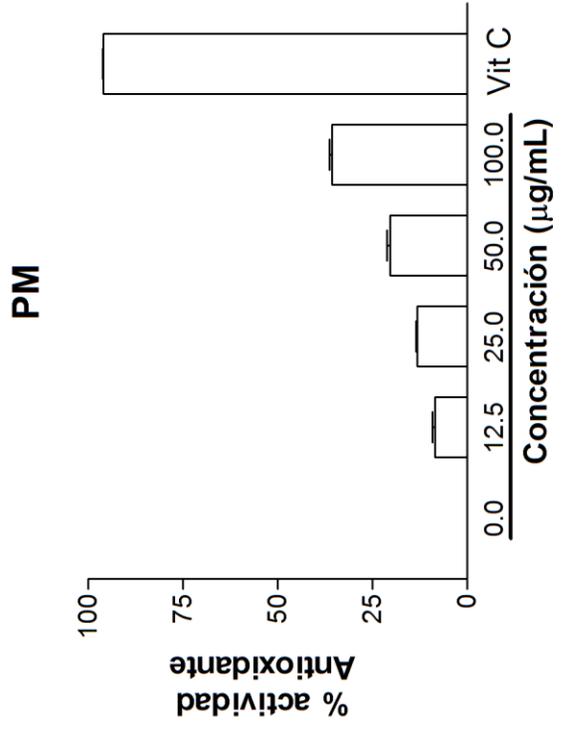


FIGURA 12: Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de dos regiones de Sonora. Propóleos de Magdalena PM y Propóleos de Sonoyta PS, por el método del DPPH, utilizando Vitamina C como control. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

6. DISCUSIÓN

En la búsqueda de otra alternativa que pueda sustituir el uso de medicamentos convencionales, surgen diversos estudios realizados a una resina altamente adhesiva que es transformada por las abejas a base de plantas y sustancias salivales. Entre sus distintas propiedades como antiinflamatorio, antiviral, cicatrizante, anticarcinógeno, analgésico, en este estudio se resaltan principalmente su capacidad antioxidante y antibacteriana.

En la tesis de maestría de Lugo S, R, describe a los distintos tipos de propóleos por su origen botánico, a su vez clasifica a los propóleos sonorenses como de regiones áridas y semiáridas, por tener un clima con temperaturas altas, veranos secos, inviernos fríos y con lluvia. Por lo que en la tesis de maestría realizada por Navarro M., menciona que la actividad biológica de los propóleos es un reflejo de las características cualitativas y cuantitativas de sus constituyentes las que difieren de región en región.

En el presente estudio realizado a dos localidades de la región noroeste de Sonora, los EMP de Magdalena son los que muestran una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas y gram negativas como *S. aureus* 6538P, *E. coli* 25922 y *V. cholerae* O1 que los EMP de Sonoyta. Navarro y colaboradores reportan a los propóleos de Caborca y de Ures con mayor actividad antibacteriana en comparación con los propóleos de Pueblo de Álamos. En los fenoles totales, Magdalena presenta un mayor contenido con 377.17mg/g de propóleos, que es muy similar al contenido de propóleos de Ures con 311.1mg/g,

reportados en el estudio realizado por Acosta S, Ana. En actividad antioxidante, Magdalena presenta el mayor porcentaje con 36.56% en comparación con el EMP de Sonoyta, pero no mayor al porcentaje reportando por Acosta S, Ana en su tesis de maestría para propóleos de Caborca que es del 86.6%, por lo tanto, Magdalena al igual que Ures y Pueblo de Álamos presentan una actividad antioxidante mucho menor. Así como la región de Ures se encuentra cercana al cauce del río Sonora en Magdalena de Kino atraviesa el río Magdalena lo que podría esperarse que los propóleos de Magdalena sean muy similares a los propóleos de Ures, en cuanto a constituyentes por encontrarse en condiciones semejantes pues ambos presentan una mayor actividad antibacteriana y menor actividad antioxidante en comparación con propóleos de clima árido (propóleos de Caborca).

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

1. Los extractos metanólicos de propóleos de Magdalena y de Sonoyta, presentaron una mayor inhibición frente a la bacteria gram positiva *S. aureus 6538P* en comparación de las bacterias gram negativas *E. coli 25922* y *V. cholerae O1*.
2. El EMP de la muestra proveniente de Magdalena tuvo una mayor CMI frente a las bacterias *S. aureus 6538P*, *E. coli 25922* y *V. cholerae O1*, que el extracto metanólico de Sonoyta.
3. Ninguno de los dos EMP logró inhibir el desarrollo de *E. coli 25922*.
4. Los propóleos de Magdalena mostraron un mayor contenido de fenoles totales con 377.17mg/g y mientras que la muestra de Sonoyta solo arrojó 166.94mg/g
5. El mayor porcentaje de actividad antioxidante lo obtuvo el extracto metanólico de la muestra de Magdalena con 36.56% y Sonoyta con 9.28% en su máxima concentración (100µg/mL).

8. RECOMENDACIONES

- ✓ Para futuras investigaciones es recomendado realizar una identificación de los constituyentes de Propóleos de Magdalena y Sonoyta.
- ✓ Realizar una concentración mínima bactericida (CMB) a EMP de Magdalena y Sonoyta.
- ✓ Evaluar la cantidad de flavonoides totales presentes en las muestras.
- ✓ Seguir realizando evaluaciones a propóleos de otras regiones de Sonora, ya que son pocos los estudios.
- ✓ Y dar a conocer los resultados obtenidos, para que los apicultores estén informados de la verdadera importancia de esta resina.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Palomino G. Lady R.,García P. Carlos M.,Gil G. Jesús H., Rojano Benjamín A., Durango R. Diego L., *Revista De la Facultad De Química Farmacéutica*. **2009** Vol. 16 Número 3, Págs. 388-395
2. Salamanca Grosso Guillermo, Correa Carvajal Ivonne L., Principal Judith. *Zootecnia Trop.*, **2007** 25(2): 95-102
3. Callejo A., Armentia A., Lombardero M., Martínez C., Rebollo S., Sedano E., de la Fuente R., Fernandez A. *Alergol Inmunol Clín*, **2001**, 16: 113-117
4. Tolosa L., Cañizares E. *Ars Pharmaceutica*, **2002** 43:1-2; 187–204
5. Kumazawa Shigenori, Ueda Reika, Hamasaka Tomoko, Fukumoto Syuichi, Fujimoto Takunori and Nakayama Tsutomu. *J. Agric. Food Chem*, **2007**, (55), 7722-7725
6. Pérez Capote María Regla, Rodríguez Torres Caridad C., León Fernández Olga Sonia., Rodríguez Susana, Álvarez Dalia, Castañeda Juana., Vega Jorge Luis, *Acta Farm Bonaerense*, **2003**,(22) 61-64
7. Farré R., Frasquet I., Sanchez A., *Ars Pharmaceutica*, **2004** 45 :1 ; 21–43
8. Peña Raúl C. *Cien. Inv. Agr.*,**2008**, 35(1) : 17-26
9. Lugo S. R., CIAD, A.C *Tesis de Maestría en Ciencias*, **2003**, Pág. 1-72
10. Unlu-Vardargulhan, Silici Sibel, Unlu Mehmet. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 24, 1011 – 1017

11. Kumazawa Shigenori, Hayashi Katsumi, Kajiya Katsuko, Ishii Takeshi, Hamasaka Tomoko and Nakayama Tsutomu. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4777-4782.
12. Moreno H. Zulma, Martinez Patricia A., Figueroa Judith. *Revista Nova*, **2007**, 1794-2470,
13. García Bernal Milagros, Medina Marrero Ricardo, Hidalgo Yanes Pedro I., Delgado Lasval María S., Truffin Truffin Emma, Gómez Marrero Rafael. *Lat. Am. J. Pharm*, **2007**, 26(1): 100-2
14. Manrique Antonio J., *Zotecnía Tropical*, **2006**, 24(1): 43-53.
15. Manrique Antonio J., Santana Weyder C., *Zotecnía Tropical*, **2008**, 26(2) : 157-166
16. Chaillou Lucrecia Lucía, Herrera Humberto Antonio, Maidana José Francisco. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas.*, **2004**, p. 011-015
17. Koo Hyun, Rosalen Pedro L., Cury Jaime A., Park Yong K., Bowen William H., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2002**, (46) 1302-1309
18. Navarro Moisés. CIAD, AC, *Tesis de Maestría en Ciencias*, **2007**, Pág. 1-59
19. Bedascarrasbure Enrique, Maldonado Luis, Álvarez Alejandro, Rodríguez Edgardo. *Act. Farm. Bonaerense*, **2004**, 23 (3): 369-72
20. Gutiérrez Avella, Ortiz García, Mendoza Cisneros, *Simposio de Metrología*, **2008**, SM2008-M220-(1108-1 - 1108-5)
21. Acosta S. Ana LÍlian, Universidad de Sonora, *Tesis de Maestría*, **2007**,

22. Lozina L., Acosta de Pérez O., Boehringer S., Teibler P., *Facultad de ciencias veterinarias*, **2004**, V-021
23. Pastor María Antonia, Martín Lucía, Gatica María Elena, Angulo Jorge, Vargas-Machuca Inmaculada, Fariña María del Carmen y Requena Luis. *Actas Dermosifiliogr.*, **2003**; 94(3): 188-90
24. Suárez D., Díaz D., Puente R., Socorro W., Bello J.L., Duran L., Barceló E., *Apiciencia*, **2000**, Vol. 2 No.2 ISSN 1608–1862
25. Quintero-Mora M. L., Londoño-Orozco A., Hernández-Hernández F., Manzano-Gayosso P., López-Martínez R., Soto-Zárate C. I., Carrillo-Miranda L., Penieres-Carrillo G., García-Tovar C.G., Cruz-Sanchez T. A., *Rev. Iberoam Micol*, **2008**, 25: 22-26
26. Muli E.M, Maingi J.M, *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **2007** V.13, N.3, 655-663
27. Skerget Mojca, Kotnik Petra, Hadolin Majda, Rizner Andreja, Simonic Marjana, Knez Zeljko. *Food Chemistry*, **2005**, (89), 191-198
28. Ahn Mok-Ryeon, Kumazawa Shigenori, Hamasaka Tomoko, Bang Keuk-Seung and, Nakayama Tsutomu. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52: 7286-7292
29. Asami Danny K., Hong Yun-Jeong, Barrett Diane M., and Mitchell Alyson E., *J. Agric. Food Chem*, **2003**, 51, 1237-1241
30. Lee Ki Won, Kim Young Jun, Lee Hyong Joo, Lee Chang Yong. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51: 7292-7295

31. Popova Milena, Bankova Vassya, Butovska Daniela, Petkov Valentin, Nikolova-Damyanova, Sabatini Anna Gloria, Marcazzan Gian Luigi, Bogdanov Stefan. *Phytochem. Anal.*, **2004** 15: 235-240
32. Popova Milena, Bankova Vassya, Bogdanov Stefan, Tsvetkova Iva, Naydenski Christo, Marcazzangian Luigi, Sabatini Anna-Gloria. *Apidologie* 38, **2007**, 306-311
33. Prior Ronald L., Wu Xianli and Schaich Karen. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4290 - 4302
34. Velázquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Dominguez Z., Robles R., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F.M., Velázquez E.F., Astiazarán H., Hernandez J., *Journal of applied Microbiology*, **2007**, 1-10

10. APÉNDICE

10.1 Obtención de Extractos Metanólicos de Propóleos (EMP)

- Las muestras previamente molidas se colocan cada una sobre un matraz erlenmeyer.
- Adicionar 300mL de MeOH.



- Agitar por 24 horas con un agitador magnético

- Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtra sobre una tela de algodón con la finalidad de eliminar todo tipo de sólidos, restos de polen, tierra, madera etc.



- Como siguiente, se filtra nuevamente a través de papel filtro.



- Se concentran los extractos totales en el matraz de un rotavapor R-210/R-215 de la marca BUCHI, bajo presión reducida a una temperatura aproximada de 40°C
- Posteriormente, se seca al alto vacío (1×10^{-4} mmHg).



- Se obtiene un sólido el cual se cubre la luz y se almacena a 8°C aproximadamente.

10.2 Métodos Microdilución en Caldo.

Material:



- Tubos falcon de 50mL
- Tubos eppendorf de 2mL
- Microespátula
- Mechero de alcohol
- Pipeta multicanal 50–200µL
- Pipeta vol. variable 20-200µL

eppendorf research

- Pipeta vol. variable 100–1000µL eppendorf research

Preparación:

- Medios de cultivo líquidos y sólidos
- Pesado y disolución de los Extractos Metanólicos de Propóleos (EMP)
- Dilución de Gentamicina 1:10

Preparación de Medios:

- Preparar 6 tubos falcon con 40mL de Caldo Mueller Hinton (CMH) cada uno. (21g de CMH en 1000mL, calentar hasta disolver y vaciar en tubos).



- Preparar 20 cajas con Agar Mueller Hinton. (15g de AMH en 1000mL, calentar hasta disolver y vaciar en cajas petri).

Nota: Trabajar en Campana

- Pesado y disolución de EMP: Tarar tubos eppendorf y pesar una alícuota del EMP:

Magdalena 50.6mg/mL, Sonoyta

51.2mg/dL.



Nota: Limpiar microespátula con etanol, para eliminar residuos al momento de cambiar de muestra.

- Agregar a cada muestra 1mL de DMSO y agitar en un vortex para que se disuelva.



- Dilución de gentamicina 1:10. La gentamicina deberá tener una concentración final en el pozo de prueba de 12mg/mL. Esta concentración es la que se alcanza en la sangre durante un tratamiento regular. Esta concentración en sangre es a la cual el microorganismo es sensible al antibiótico.
- **Preparación de la Solución de Trabajo:**

Gentamicina Solución Concentrada: 10mg/mL

$$C_i = 10,000\mu\text{g/mL}$$

$$C_f = 120\mu\text{g/mL},$$

$$Y = C_i/C_f$$

$$Y = 83.33$$

$$V_f = 1\text{mL}$$

$$Y = 83.33$$

$$V_i = X$$

$$Y = V_f/V_i \quad V_i = V_f/Y$$

$$V_i = 12\mu\text{L}$$

12μL de solución concentrada de gentamicina + 988μL de Caldo Mueller Hinton

Concentración de la solución de trabajo: 120μg/mL

En los pozos de prueba de la microplaca se realiza una dilución 1:10, mezclando 20μL de solución de trabajo con 180μL de Caldo Mueller Hinton, para obtener una concentración final en el pozo de prueba de 12μg/mL.

 **Esterilizar:**

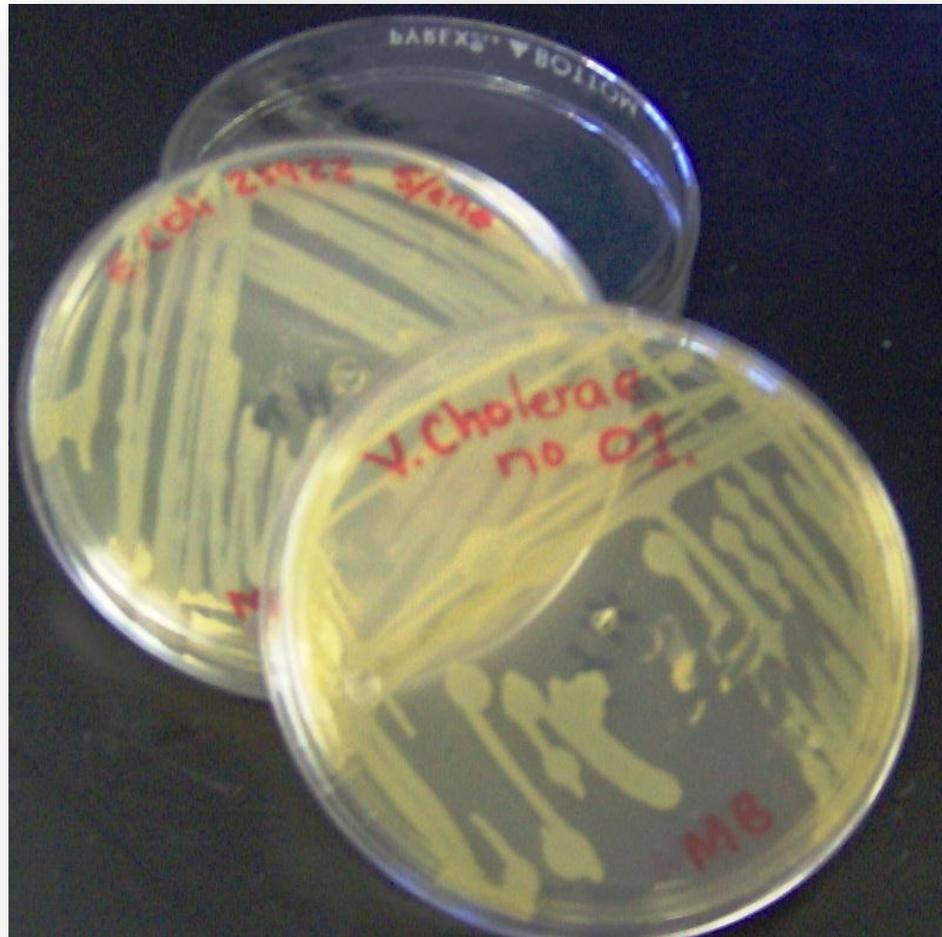
- 20 cajas Agar Mueller Hinton
- Tubos eppendorf
- Puntas para pipeta
- Solución Salina 0.85
- Dimetilsulfoxido (DMSO)



Siembra de Cepas Bacterianas:

E. coli 25922, *Vibrio cholerae* O1 y *S. aureus* 6538P. Incubar por 12–14 horas para que se encuentren en fase logarítmica.

Nota: Trabajar en campana



Cálculos para Diluciones

EMP de Magdalena

$$C_i = 50.6\text{mg/mL} = 50,600\mu\text{g/mL}$$

$$C_f = 400\mu\text{g/mL}$$

$$Y = C_i/C_f$$

$$Y = 126.5$$

$$V_f = 6\text{mL}$$

$$Y = 126.5$$

$$V_i = ? \quad Y = V_f/V_i$$

$$V_i = V_f/Y$$

$$V_i = 47\mu\text{L}$$

47 μ L de Solución Concentrada de EMP de Magdalena + 5953 μ L de CMH

EMP de Sonoyta

$$C_i = 51.2\text{mg/mL} = 51,200\mu\text{g/mL}$$

$$C_f = 400\mu\text{g/mL}$$

$$Y = C_i/C_f$$

$$Y = 128$$

$$V_f = 6\text{mL}$$

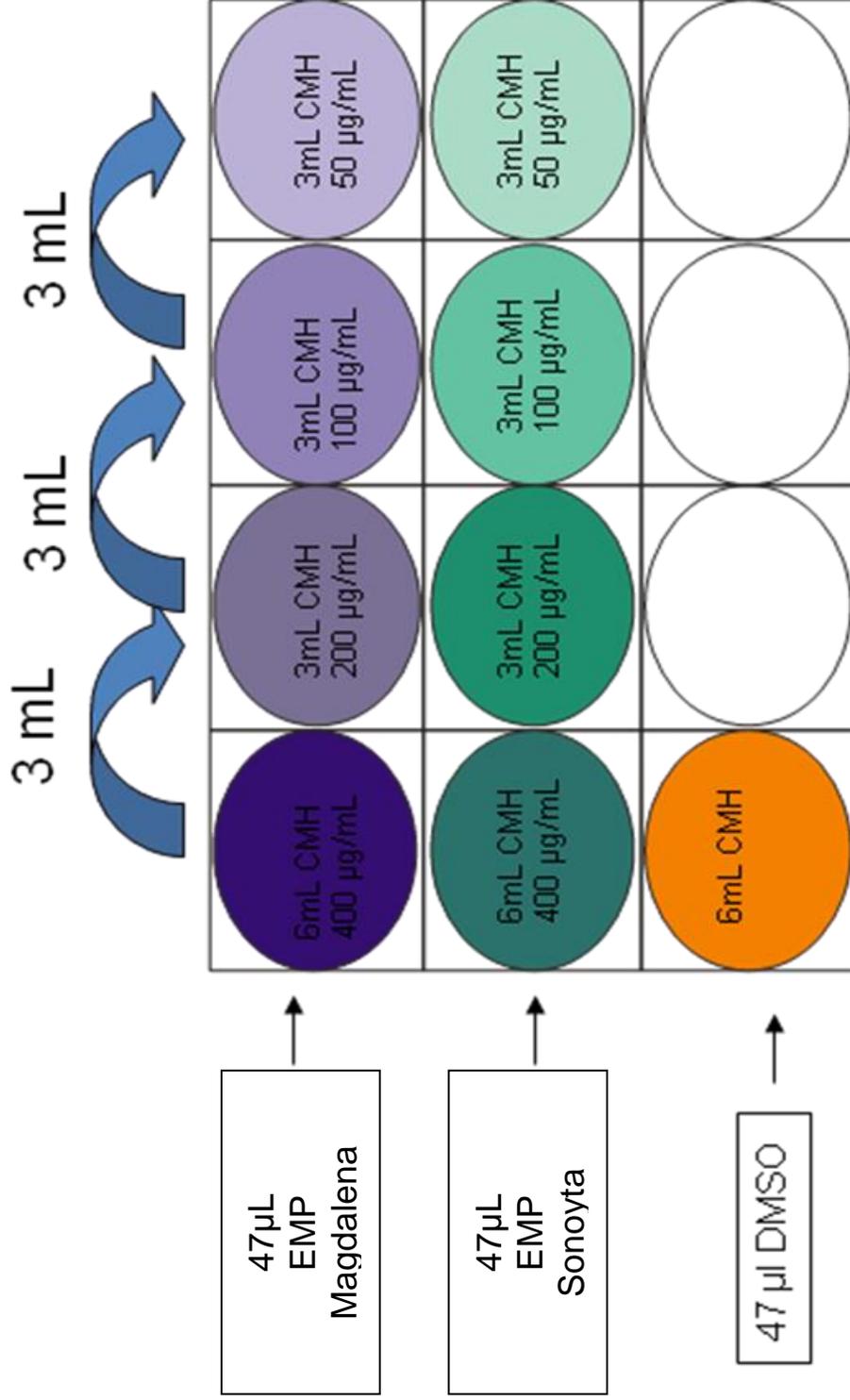
$$Y = 128$$

$$V_i = ? \quad Y = V_f/V_i$$

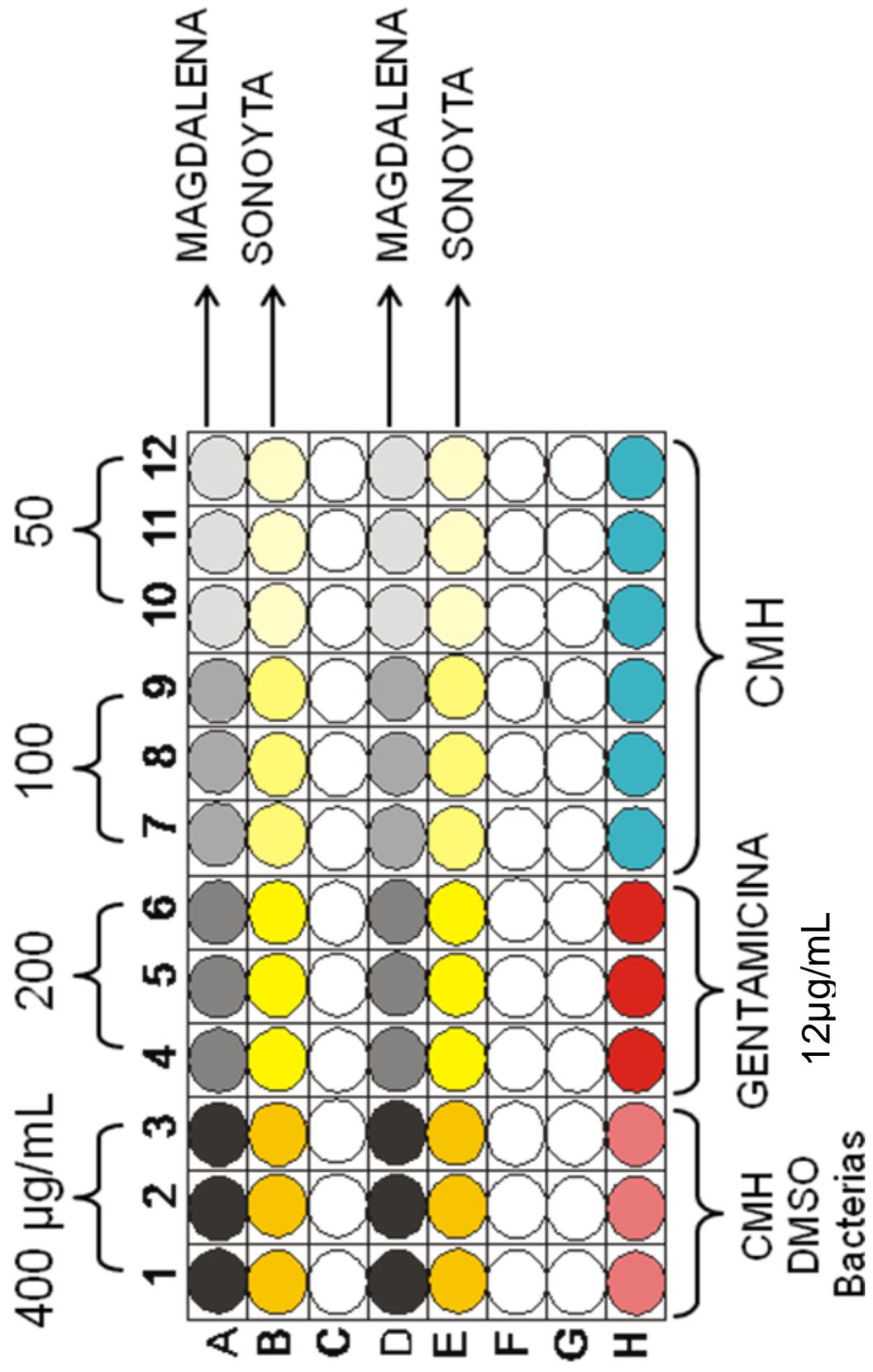
$$V_i = V_f/Y$$

$$V_i = 47\mu\text{L}$$

47 μ L de Solución Concentrada de EMP de Sonoyta + 5953 μ L de CMH

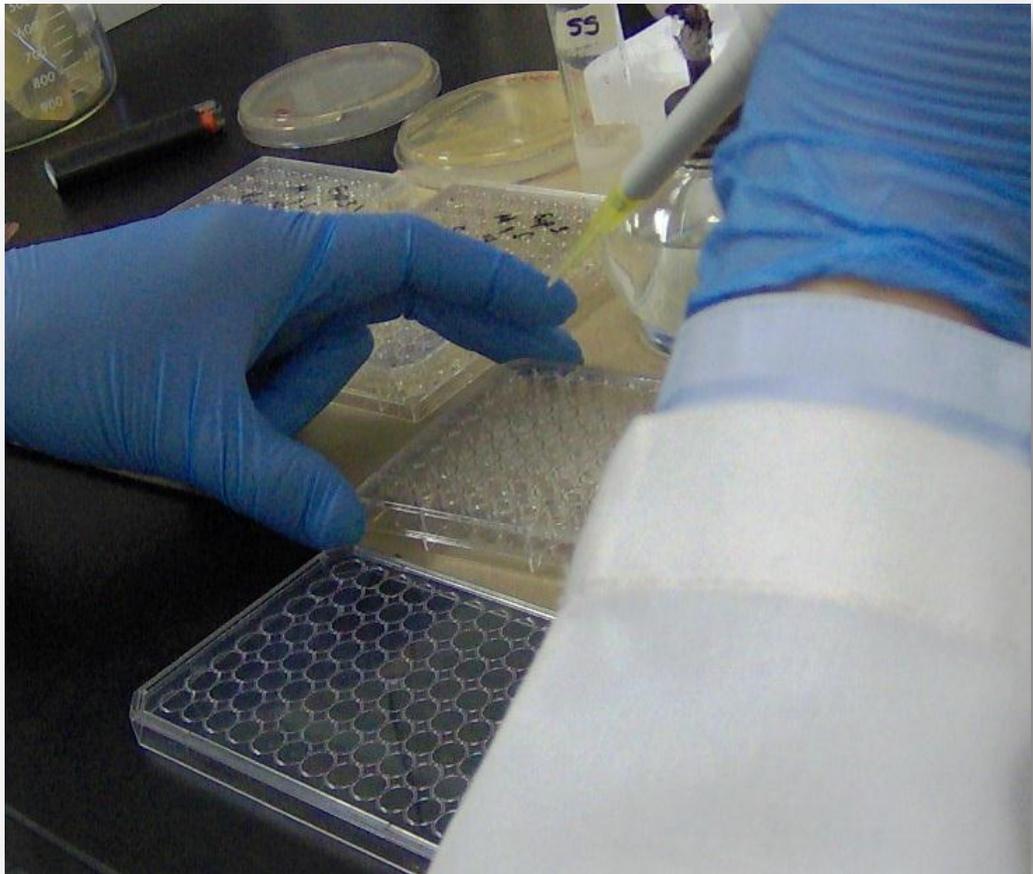


Preparar Soluciones a prueba de los EMP en CMH (Placa de 12 Pozos)



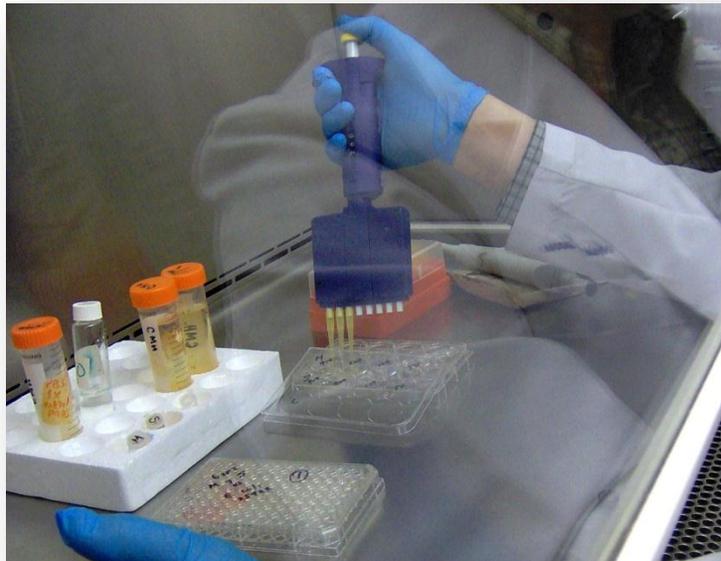
🔬 Estandarización del Inóculo Bacteriano:

Los estándares de turbidez de McFarland se utilizan para estandarizar el número de bacterias aproximado en una suspensión comparando la turbidez del estándar. El estándar usado más comúnmente en el laboratorio de microbiología para los métodos de sensibilidad de rutina es el 0,5 el cual representa 1.5×10^8 bacterias por mL.



Siembra del Inóculo Bacteriano en los Pozos de Prueba de la Placa de 96 Pozos.

Se recomienda añadir el 10% de volumen de inóculo bacteriano, correspondiente a los 200 μ L de un pozo de prueba por lo que puede ser 20 μ L o menos. Para este caso se colocaron 15 μ L de bacterias en suspensión.



Lectura de la Densidad Óptica (DO) de la Placa de 96 Pozos en Lector de Microplacas BioRad-Benchmark.

Al realizar las lecturas, debe tenerse la precaución de no quitar la tapa de la microplaca completamente, ya que eso impediría el correcto desarrollo de los microorganismos.



Lector de Microplacas



☞ **Incubación de la Microplaca a 36°C**

☞ **Realizar lecturas de la DO de la microplaca a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas de incubación.**

☞ **Utilización del Programa PRISM**

para graficar los resultados de las lecturas de las DO de cada una de las placas.



Lector de Microplacas BioRad-Benchmark

10.3 Método de Folin-Ciocalteu

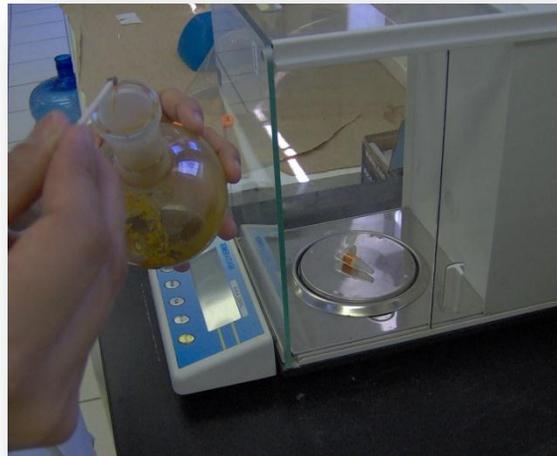
Los compuestos fenólicos, principalmente polifenoles, se determinan haciendo reaccionar los componentes con el reactivo de Folin-Ciocalteu, es característica para compuestos que tienen un grupo hidrófilo unido a un anillo de benceno. El reactivo de Folin en medio básico tiene una coloración amarilla que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. La intensidad del color azul se mide a 760nm, expresando los resultados en mg de ácido gálico por 100g de extracto de propóleos.

Reactivos:

- Reactivo Folin-Ciocalteu. (Phenol TS Spectrum)
- Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) anhidro. (Fermont)
- Ácido gálico. (Productos químicos Monterrey)
- Agua destilada

Material:

- Tubos eppendorf
- Vaso precipitado de 50mL
- Matraz aforado de 50mL
- Microespátula
- Balanza
- Puntas para pipeta



Soluciones Concentradas de EMP

Concentración de Stock 10mg/mL

Magdalena, cantidad de muestra: 13.6mg

Son 10mg en 1mL, en 13.6mg son: 1360 μ L de MeOH

Por lo tanto son: 13.6mg de EMP de Magdalena en 1360 μ L de MeOH

Sonoyta, Cantidad de muestra: 8.2mg

Son 10mg en 1mL, en 8.2mg son: 820 μ L de MeOH

Por lo tanto son: 8.2mg de EMP de Sonoyta en 820 μ L de MeOH

Diluciones

Dilución 1:40

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$C_1= 10\text{mg/mL}$$

$$V_1= ?$$

$$C_2= (10\text{mg/mL} /40)= 0.25\text{mg/mL}$$

$$V_2= 200\mu\text{L}$$

$$V_1= C_2V_2/C_1$$

$$V_1= 5\mu\text{L}$$

Por lo tanto son: 5 μ L del Stock + 195 μ L de MeOH

Dilución 1:20

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$C_1= 10\text{mg/mL}$$

$$V_1= ?$$

$$C_2= (10\text{mg/mL} /20)= 0.50\text{mg/mL}$$

$$V_2= 200\mu\text{L}$$

$$V_1= C_2V_2/C_1$$

$$\mathbf{V_1= 10\mu\text{L}}$$

Por lo tanto son: 10 μL del Stock + 190 μL de MeOH

Dilución 1:10

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$C_1= 10\text{mg/mL}$$

$$V_1= ?$$

$$C_2= (10\text{mg/mL} /10)= 1\text{mg/mL}$$

$$V_2= 200\mu\text{L}$$

$$V_1= C_2V_2/C_1$$

$$\mathbf{V_1= 20\mu\text{L}}$$

Por lo tanto son: 20 μL del Stock + 180 μL de MeOH

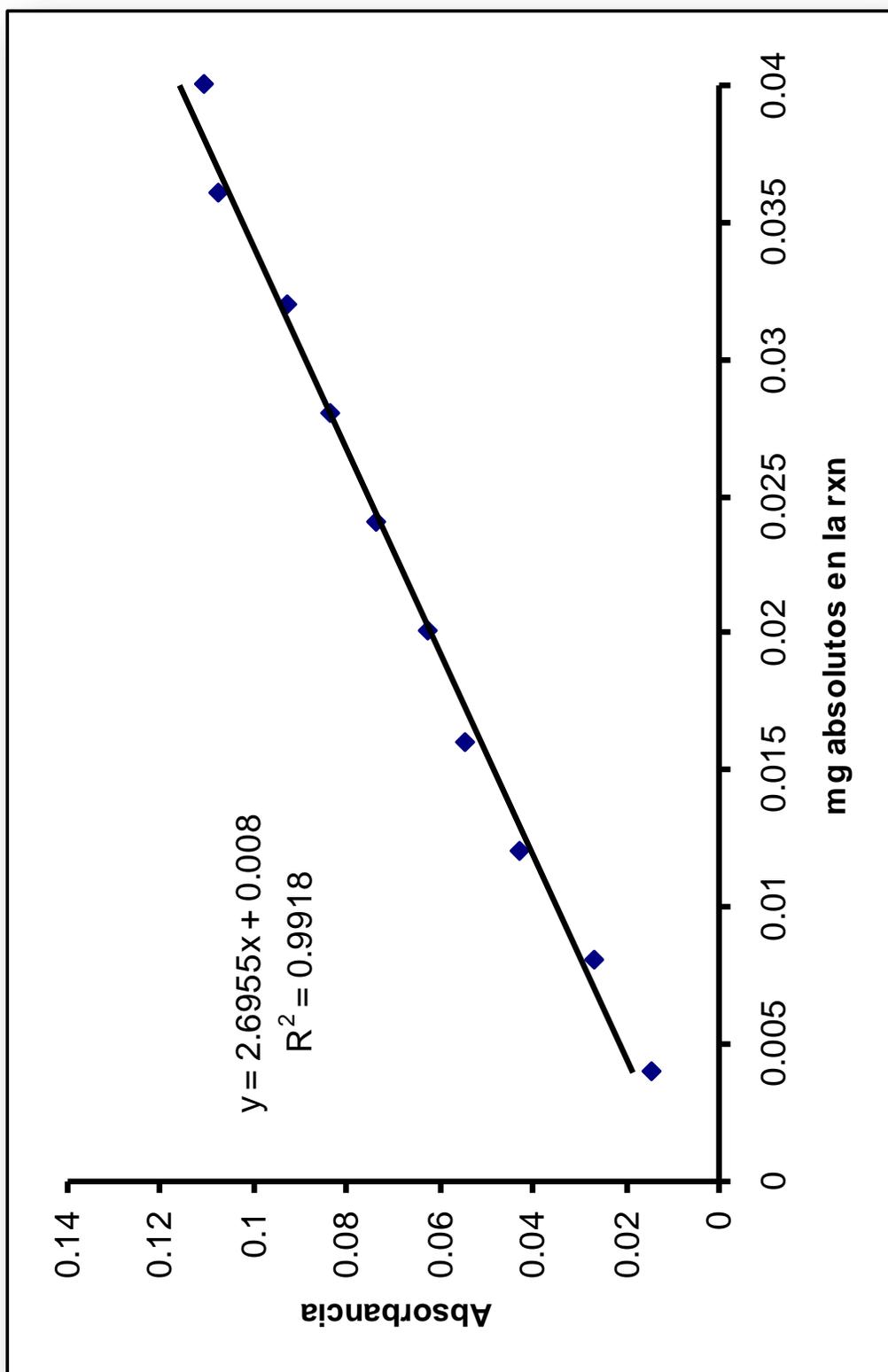
- A partir de los 200 μ L de las diluciones se realiza el siguiente proceso.

Procedimiento:

1. Agregar 40 μ L de muestra disuelta en 300 μ L de H₂O destilada.
2. Agregar 80 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu.
3. Después agregar 120 μ L de Na₂CO al 20%.
4. Agregar H₂O destilada Hasta completar 1mL (460 μ L).
5. Esperar un tiempo de reacción de 2 horas y leer la absorbancia a 760nm.



Espectrofotómetro Genesys 20 de la Marca Thermo Scientific



Curva de Calibración del ácido gálico

10.4 Técnica de DPPH

El DPPH carece de hidrógeno, por lo que se estabiliza cambiando de color al estar en contacto con una sustancia capaz de donar hidrógeno. Se utiliza este método para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia, utilizando vitamina C como control.

Reactivos:

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). (Aldrich)
- Etanol puro J.T. Baker
- L-ácido ascórbico (Vitamina C).
(Sigma)

Material:

- Tubos eppendorf
- Tubos falcon
- Microespátula
- Balanza analítica
- Pipeta volumen variable 10–100 μ L
y 100-1000 μ L
- Puntas para pipeta



Procedimiento:

1. Hacer una mezcla de reacción:
600 μ L DPPH (300 μ mol) y 600 μ L
de muestra.
2. agitar 10 segundos
3. Incubar 30 minutos en la
oscuridad



4. Leer a 517nm.

5. Graficar utilizando vitamina C (70 μ mol) como control.



Espectrofotómetro AquaMate Plus de la Marca Thermo Scientific

- Preparación DPPH 300 micromolar: se pesan 11.8mg para 100mL en Etanol.
- Vitamina C (Se prepara 140μMol para que quede 70μMol)

Stock Vitamina C 1mg/mL

176.1 ----- 1mol

0.001g.-----X =

5.67×10^{-6} mol/L

1mol ---- 1,000 000μMol

5.67×10^{-6} ----- X = 5.67μMol/mL

5.67μMol ----- 1mL

X= 5670μMol/L ----- 1000mL

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$C_1 = 5670\mu\text{Mol}$$

$$V_1 = ?$$

$$C_2 = 140\mu\text{Mol}$$

$$V_2 = 10,000\mu\text{L} (10\text{mL}) (\text{Cantidad de Vol.})$$

$$V_1 = C_2V_2/C_1$$

$$V_1 = 247\mu\text{L del Stock}$$

A V_2 se Le resta volumen del Stock

9753μL de etanol + 247μL del Stock

→ Vit C 140μMol

Soluciones Concentradas

Concentración de Stock 10mg/mL

Magdalena, cantidad de muestra: 13.6mg

Son 10mg en 1mL, en 13.6mg son: 1360 μ L de Etanol

Por lo tanto son: 13.6mg de EMP de Magdalena en 1360 μ L de Etanol

Sonoyta, Cantidad de muestra: 9.5mg

Son 10mg en 1mL, en 9.5mg son: 950 μ L de Etanol

Por lo tanto son: 9.5mg de EMP de Sonoyta en 950 μ L de Etanol.

Vitamina C Stock

1mg/mL

Se pesó 1.24mg

1mg ----- 1mL

1.24mg ----- X = 1.24mL

Por lo tanto son: 1.24mg de Vitamina C en 1.24mL de Etanol

Diluciones

A 100	}	$\mu\text{g/mL}$
B 50		2X (Preparar doble Concentración)
C 25		
D 12.5		

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$\text{A. } C_1 = 10,000\mu\text{g/mL del Stock}$$

$$V_1 = ? \quad 200\mu\text{L}$$

$$C_2 = 200\mu\text{g/mL}$$

$$V_2 = 10\text{mL} = 10,000\mu\text{L}$$

A. 200 μL de Stock + 9800 μL de Etanol

B. 5mL de A + 5mL de Etanol

C. 5mL de B + 5mL de Etanol

D. 5mL de C + 5mL de Etanol

Leer las muestras por triplicado:

Utilizar un Blanco de muestra + etanol y un Estándar de DPPH + Etanol.