



Acta universitaria

ISSN: 0188-6266

ISSN: 2007-9621

Universidad de Guanajuato, Dirección de Investigación y
Posgrado

Rodríguez Pérez, Betsabé; Canales Martínez, María Margarita;
Penieres Carrillo, José Guillermo; Cruz Sánchez, Tonatiuh Alejandro
Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos
Acta universitaria, vol. 30, e2435, 2020, Diciembre
Universidad de Guanajuato, Dirección de Investigación y Posgrado

DOI: <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41669751013>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEM
redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos

Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis

Betsabé Rodríguez Pérez^{1*}, María Margarita Canales Martínez², José Guillermo Penieres Carrillo³,

Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez¹

¹Laboratorio de Bioprospección Microbiológica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. C.P. 54714. *Correo electrónico: berope380@hotmail.com

²Laboratorio de Farmacognosia, Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

³Laboratorio de Química Verde, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor de correspondencia

Resumen

En México, los propóleos se ofertan por su actividad antioxidante y su actividad antimicrobiana, por lo cual es necesario realizar su análisis utilizando la norma de calidad mexicana. El objetivo del presente estudio fue analizar la composición química de ocho propóleos mexicanos colectados de diferentes municipios de los estados de México, Michoacán, Guanajuato, Veracruz y Puebla, para evaluar su actividad antioxidante y también su actividad antimicrobiana contra cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Las muestras provenientes de los municipios del Estado de México y Michoacán presentaron flavonoides, fenoles y terpenos que les confieren una mayor actividad antioxidante y acción antimicrobiana. Las muestras de los municipios de Puebla, Veracruz y Guanajuato contienen terpenos en bajas cantidades, provocando disminución de la actividad biológica e incumplimiento de las especificaciones de calidad. Se demostró la importancia del estudio de la composición química de los propóleos que se asocia a su actividad biológica en pruebas específicas.

Palabras clave: Propóleos mexicanos; composición química; actividad antioxidante; actividad antimicrobiana.

Abstract

In Mexico, propolis is offered for its antioxidant activity and antimicrobial activity, so it is necessary to perform its analysis using quality standards. The objective of the present study was to determine the chemical composition of eight propolis from different municipalities of the states Estado de Mexico, Michoacan, Guanajuato, Veracruz, and Puebla. To demonstrate its biological activity, the antioxidant activity was evaluated, and with reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* the antimicrobial activity was evaluated. The samples from the municipalities of the states Estado de Mexico and Michoacan presented flavonoids, phenols, and terpenes which confer both an increased antioxidant activity and antimicrobial action. Samples from the municipalities of the states of Puebla, Veracruz, and Guanajuato contain terpenes in low quantities, resulting in decreased biological activity and non-compliance with quality specifications. The importance of studying the chemical composition of propolis associated with its biological activity in specific tests was demonstrated.

Keywords: Mexican propolis; chemical composition; antioxidant activity; antimicrobial activity.

Recibido: 13 de noviembre de 2018

Aceptado: 27 de mayo de 2019

Publicado: 15 de enero de 2020

Como citar: Rodríguez-Pérez, B., Canales-Martínez, M. M., Penieres-Carrillo, J. G., & Cruz-Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria* 30, e2435. doi. <http://doi.org/10.15174/au.2020.2435>

Introducción

El propóleo es un material resinoso que elaboran las abejas *Apis mellifera* a partir de resinas de distintas especies botánicas y que son modificadas con sus secreciones salivales para transportarlas al interior de la colmena con el fin de utilizarlo como material de construcción, bloqueo de agujeros y grietas, como defensa química contra los microorganismos y como embalsamador de intrusos que han muerto en la colmena y que son demasiado grandes para ser eliminados por ellas (Bankova, 2005; Bankova et al., 2016; Silva-Carvalho, Baltazar & Almeida-Aguiar, 2015)).

La actividad biológica de los propóleos se debe a su composición química, la cual depende de la vegetación de donde las abejas recolectan la resina, la ubicación geográfica del apíario, el clima y la época de recolección. Diferentes estudios demuestran que contienen en promedio 55% de resinas y bálsamos, de 30% a 40% de cera de abeja, de 5% a 10% de aceites esenciales o volátiles, 5% de polen y de otros materiales orgánicos y minerales (Peña, 2008; Sforcin & Bankova, 2011).

Los propóleos colectados en Europa, Norte de América y Norte de Asia tienen su origen en los álamos y abedules, encontrando flavonoides como pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina, acacetina y apigenina como su principal componente. En Inglaterra, Irlanda y China se muestra una composición muy similar a la observada en el continente europeo, con la diferencia de la presencia del éster fenetílico del ácido caféico (CAPE, por sus siglas en inglés), flavonoides (3-O-[(S)-2-metilbutiroil]pinobanksina y 6-cinamilcrisina (Bankova, de Castro & Marcucci, 2000). Las zonas tropicales, como Brasil, Venezuela, Uruguay, México y Cuba, se caracterizan por poseer una alta biodiversidad botánica, pero no presentan álamos y abedules, ya que estos árboles no son especies nativas de estos países y, por tanto, las abejas tienen que buscar otras fuentes de exudados y resinas para la elaboración de propóleos.

La fracción resinosa del propóleo está integrada por compuestos fenólicos y flavonoides que son muy importantes a nivel terapéutico (Sosa-López, Cabrera & Álvarez, 2016) y que presentan un efecto sinérgico que es esencial para las actividades biológicas benéficas tanto en humanos como en animales: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, inmunomoduladora, entre otras (Fischer et al., 2007; Graça, Nunes, Dandle, Cavaco & Antunes, 2014; Soto-Vásquez, 2015).

Los flavonoides son compuestos conformados por dos anillos fenilo, A y B, unidos a través de un anillo C de pirano con grupos funcionales adicionales, lo que genera diferentes tipos de flavonoides, como las chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles, proantocianidinas, antocianidinas, flavandioles, isoflavonas y auronas, compuestos que le dan las características antioxidantes, antimicrobianas, cicatrizantes, antiinflamatorias (Cheng, Han, Wu & Lou, 2014; Falcone, Ruis & Casati, 2012; Limón et al., 2010; Panché, Diwan & Chandra, 2016), antiparasitarias, citotóxicas (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila & Bravo, 2014) o insecticidas (Morgado et al., 2014).

Por otro lado, se estima que existen más de 300 compuestos químicos que se han detectado en los propóleos de diversos orígenes de la República Mexicana y que el contenido de fenoles y flavonoides es un parámetro importante que determina la calidad de su actividad biológica; por ello, las normas de calidad nacionales e internacionales establecen valores mínimos de aceptación, cuanto mayor sea el porcentaje de estos compuestos, mejor será la calidad del producto (Hernández-Zarate et al., 2017; Lotti et al., 2010).

La evaluación de la actividad antioxidante de los propóleos es importante (Silva-Carvalho, Baltazar & Almeida-Aguiar, 2015) por ser de origen natural para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades de origen oxidativo (Farré, Frasquet & Sánchez, 2004) como ateroesclerosis (Fang et al., 2013), cáncer (Hernández et al., 2007), diabetes mellitus (Rivera-Yáñez et al., 2017), hipertensión arterial y daño

renal (Teles et al., 2015), enfermedades hepáticas (Elejalde, 2001), por su capacidad de inhibir radicales libres y por quelación de iones metálicos (Geckil, Ates, Durmaz, Erdogan & Yilmaz, 2005).

Zavaleta, Muñoz, Blanco, Alvarado-Ortiz & Loja (2005) reportan que la actividad antioxidante no siempre está en relación con la concentración de polifenoles, sino a la posición del(las) grupo(s) hidroxilo en los anillos A y B y las características estructurales son relevantes (Limón et al., 2010; Quiñones, Miguel & Aleixandre, 2012; Vargas-Sánchez et al., 2014b) y, en menor medida, por los ácidos grasos insaturados provenientes de la abeja. Estudios realizados por Quiñones et al. (2012) y Vargas-Sánchez et al. (2014a) han demostrado que los flavonoides catequina o queracetina poseen una mayor capacidad para neutralizar radicales libres y evitan la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) por el grupo fenólico presente en su estructura.

La actividad antimicrobiana es una de las propiedades fundamentales de los propóleos, su acción bacteriostática y bactericida está basada en la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática, y principalmente se le atribuye a flavonoides como pinocembrina, queracetina naringenina, acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol y pinobanksina (Vargas-Sánchez et al., 2014b), así como alteración en los canales iónicos a consecuencia de reacciones de fosforilación y desfosforilación, disminuyendo la inhibición de la motilidad bacteriana, factor importante en la virulencia, y que ha sido demostrado por Farnesi, Aquino-Ferreira, De Jong, Bastos & Soares (2009).

En México se han realizado estudios del efecto antifúngico contra cepas de *Candida albicans*, indicando que el ácido cafeico, flavonoides y ésteres fenólicos son los principales responsables de esta actividad biológica, provocando cambios en la morfología del hongo (Londoño et al., 2010; Quintero-Mora et al., 2008).

Tolosa & Cañizares (2002) obtuvieron y caracterizaron extractos etanólicos de propóleos de diferentes localidades de Campeche, evaluando su acción antimicrobiana sobre *S. aureus*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* y *S. pyogenes*. La especie bacteriana más sensible fue *P. aeruginosa* con una concentración mínima bactericida promedio de 3.33 mg/mL y para *S. typhi* de 9.82 mg/mL. Además, identificaron compuestos como fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides, flavonoides, lactonas, saponinas y aminas.

En 1989, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó un estudio a los productos naturales con alto contenido de fenoles y flavonoides, como los propóleos, porque contribuyen a reforzar la prevención y reducir el riesgo de padecer enfermedades metabólicas, cardiovasculares, entre otras (Bedascarrasbure, 2006; Farré et al., 2004).

En México, el apicultor recolecta propóleos y los oferta con fines antimicrobianos, por lo que es importante realizar el análisis de su composición química para determinar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, compuestos relacionados con la calidad y actividad biológica de esta resina, como lo establecen las normas de calidad. Si la actividad biológica es baja o nula, los propóleos serán de baja calidad, teniendo así un impacto económico para el apicultor. Actualmente, los propóleos son estudiados y utilizados en la industria farmacéutica, agrícola, cosmética y alimentaria, principalmente, ya que se buscan nuevas alternativas para desarrollar tratamientos contra enfermedades infecciosas provocadas por la multi-resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos o antifúngicos convencionales y encontrar soluciones que ofrezcan alternativas terapéuticas a un bajo costo.

El objetivo del presente estudio fue analizar la composición química de ocho propóleos de cinco estados de la República Mexicana, para evaluar su actividad antioxidante y también su actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*,

para fundamentar su utilización como una alternativa en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas y su posible uso en diferentes enfermedades metabólicas.

Materiales y Métodos

Recolección de propóleos

La recolección de los propóleos en greña se efectuó por los apicultores en apiarios de los municipios de Cuautitlán Izcalli, Estado de México ($19^{\circ} 41'$ norte, $99^{\circ} 11'$ oeste, 2260 m s.n.m.) (abril, 2013); El Oro, Estado de México ($19^{\circ} 43'$ norte, $99^{\circ} 58'$ oeste, 3200 m s.n.m.) (septiembre, 2013); Villa del Carbón, Estado de México ($19^{\circ} 54'$ norte, $99^{\circ} 39'$ oeste, 2600 m s.n.m.) (septiembre, 2012); Tlalpujahua, Michoacán ($19^{\circ} 18'$ norte, $100^{\circ} 08'$ oeste, 2500 m s.n.m.) (mayo, 2013); San José Iturbide, Guanajuato ($21^{\circ} 07'$ norte, $100^{\circ} 32'$ oeste, 2100 m s.n.m.) (abril, 2013); Tianguismanalco, Puebla ($19^{\circ} 04'$ norte, $98^{\circ} 35'$ oeste, 2220 m s.n.m.) (noviembre, 2010 y noviembre, 2012); y Tlacotalpan, Veracruz ($18^{\circ} 36'$ norte, $95^{\circ} 39'$ oeste, y 1000 m s.n.m.) (noviembre, 2012). Despues de la recolección, se mantuvieron protegidos de la luz y en refrigeración (4°C) hasta su utilización.

Caracterización del propóleo en greña

Las pruebas realizadas en el presente trabajo se realizaron con base a los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana: Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento: NOM-003-SAG/GAN-2017 (Diario Oficial de la Federación [DOF], 2017); a excepción del estudio cromatográfico.

Existen otras normas de calidad a nivel mundial que evalúan parámetros de calidad, que pueden aplicarse a cualquier muestra de propóleo sin importar su origen vegetal y el contenido de metabolitos secundarios de las plantas; estos incluyen el contenido de ceras, contenido de agua, impurezas mecánicas, contenido de cenizas, punto de fusión o resinas solubles en etanol (Bankova *et al.*, 2016; Rodríguez, 2015). El contenido de ceras se relaciona con la época de recolección, la manipulación del apicultor, la especie de abeja propolizadora o el método de obtención (Delgado, Andrade & Ramírez, 2015). La humedad excesiva puede favorecer el desarrollo de mohos y levaduras; las impurezas mecánicas pueden depreciar la calidad del producto; la cantidad de cenizas se relaciona con la presencia de contaminantes como metales (plomo, hierro, cobre) (Palomino, Martínez, García, Gil & Durango, 2010). En este trabajo no se evaluaron estos parámetros físicos y químicos debido a que los propóleos fueron obtenidos utilizando mallas plásticas como lo indica la normativa mexicana, por lo que presentan mejor calidad, con pocas impurezas y libres de contaminantes, pero se considera importante realizar estas evaluaciones para futuras investigaciones.

Especificaciones físicas

Previo a las pruebas organolépticas, las muestras se acondicionaron eliminando las impurezas visibles que acompañan al propóleo, tales como virutas de madera, restos de abejas, pinturas, vegetales, entre otros. La evaluación del color se realizó mediante la observación de la muestra empleando un microscopio estereoscópico y diferenciando las tonalidades predominantes presentes en esta. La descripción del aroma fue por la detección de dos tipos: olor a madera (resinoso) o a cera (balsámico). El sabor se identificó como dulce, amargo, picante o insípido. La consistencia se evaluó al tocar la muestra con los dedos, describiéndola como maleable o rígida. Estas pruebas fueron realizadas por el personal responsable de la evaluación de los propóleos del Laboratorio de Análisis de Propóleos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con base en la normatividad mexicana y que cuentan con la preparación suficiente para realizarlos.

Obtención del Rendimiento de los extractos secos

El rendimiento de los extractos se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco inicial del propóleo (Gutiérrez, 2011). El cálculo del rendimiento de cada propóleo estudiado se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra (g)}} \times 100$$

Especificaciones químicas

Preparación de los extractos etanólicos (EEP)

La preparación de los extractos etanólicos se realizó mediante el siguiente procedimiento: se pesaron 50 g de la muestra seca en una balanza analítica (marca AND, modelo HR200, Japón), enseguida se agregaron 150 mL de alcohol etílico al 70%, posteriormente, la mezcla se sometió a extracción en un ultrasonicador (Branson, CPX1800H, Danbury, Estados Unidos), el producto se filtró utilizando un sistema de filtración al vacío. Finalmente, el filtrado se concentró utilizando un rotovapor (Science MED, SM100-PRO, Finlandia) posteriormente se dejó la muestra a sequedad utilizando una bomba de vacío y el extracto seco se protegió de la luz y se refrigeró a 4 °C hasta su utilización (DOF, 2017; Trusheva, Trunkova & Bankova, 2007).

Contenido de compuestos fenólicos

La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por el ensayo de Folin-Ciocalteu. Los reactivos y solventes utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Las muestras por evaluar se prepararon a una concentración de 0.05 mg/mL. Para la determinación se construyó una curva de calibración de 6.25 µg/mL a 200 µg/mL empleando al ácido gálico como estándar (Sigma-Aldrich). El procedimiento fue el siguiente: a 1 mL de extracto etanólico de propóleo (EEP) se adicionaron 6 mL de agua destilada, 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reaccionar durante 5 min; después, se añadieron 1.5 mL de Na₂CO₃ al 20% y se aforó con agua destilada a 10 mL. La mezcla se dejó reaccionar por 2 h; al terminar este tiempo, se midieron las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (DLAB, SP-UV1000, China). El contenido de fenoles se expresó en porcentaje (%) (DOF, 2017).

Contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó por el método colorimétrico del cloruro de aluminio (AlCl₃). Los reactivos y solventes utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Para llevar a cabo esta determinación, se realizó una curva de calibración de 1 µg/mL a 90 µg/mL utilizando quercentina como estándar de referencia. El procedimiento fue el siguiente: a 1 mL de la solución del EEP (0.05 mg/mL) se añadió 1 mL de metanol grado reactivo más 1 mL de AlCl₃ al 2% y se dejó reaccionar por 10 min. Al terminar el tiempo de reacción, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (DLAB, SP-UV1000, China). Los resultados se expresaron en porcentaje (%) (DOF, 2017).

Propiedades antioxidantes

Índice de oxidación

El índice de oxidación se determinó de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017 (DOF, 2017). El procedimiento fue el siguiente: a 20 mg de EEP se añadieron 5 mL de alcohol etílico al 70%, se dejó reaccionar por 1 h y a continuación se aforó a 100 mL con agua destilada, se agitó y filtró a gravedad

utilizando papel Whatman No. 4. Se tomó una alícuota de 10 mL de la solución anterior y se aforó a 100 mL con agua destilada. Nuevamente, se tomó una alícuota de 2 mL de la solución anterior y se añadió 1 mL de H₂SO₄ al 20% y se agitó por un minuto. Finalmente, se agregó una gota de KMnO₄ 0.1N, sin tocar las paredes, y se registró el tiempo (en segundos) que tardó en desaparecer el color violeta del KMnO₄.

Capacidad antioxidant (CA₅₀)

La evaluación de la capacidad antioxidant se determinó por la concentración requerida por la muestra para disminuir la absorbancia del DPPH• al 50% expresada en µg/mL, utilizando el método del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•).

Las concentraciones por evaluar fueron de 1 µg/mL a 250 µg/mL a partir de una concentración inicial de 1 mg/mL. Como control negativo se utilizó metanol y como control positivo quercetina a las mismas condiciones que los EEP. El procedimiento fue el siguiente: se tomaron 250 µL del EEP y se añadió 750 µL de la solución de DPPH• (100 µM). Se protegió de la luz, dejando reaccionar la mezcla durante 30 min; al término de este tiempo, se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (DLAB, SP-UV1000, China). Se calculó el porcentaje de reducción mediante la siguiente fórmula:

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

La baja absorbancia de la mezcla de reacción indica alta actividad antioxidant (Barrón-Yáñez, García-Mateos, Soto-Hernández, Colinas-León & Kite, 2011; DOF, 2017).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

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

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La evaluación antimicrobiana se realizó empleando los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Candida albicans* ATCC 10231, proporcionados por el Laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Preparación de la suspensión de microorganismos

La suspensión de los microorganismos se realizó de la siguiente manera. Se tomó una asada de las colonias a evaluar y se sumergió en caldo Mueller-Hinton (MH) (Bioxon, Ciudad de México, México) para las bacterias y caldo Sabouraud (Bioxon, Ciudad de México, México) para la levadura. Las muestras se incubaron a 37 °C por 24 h para las bacterias y a 37 °C por 48 h para la levadura. Se estandarizó al tubo 0.5 del nefelómetro de MacFarland: (1-2) x 10⁸ UFC/mL utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (DLAB, SP-UV1000) a una longitud de onda de 625 nm con lecturas de absorbancia entre 0.08-0.12 (Barry *et al.*, 2009.; Londono *et al.*, 2010; Rex *et al.*, 2009).

Microdilución en caldo

La microdilución en caldo se realizó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM) utilizando la técnica de microdilución en caldo. Para lograr lo anterior, se realizaron diluciones seriadas del EEP de 0.012 mg/mL a 30 mg/mL en caldo MH (Bioxon, Ciudad de México, México). Como testigo positivo se empleó caldo MH con microorganismo y un testigo negativo con caldo MH sin el microorganismo. Para detectar la actividad respiratoria del microorganismo, se utilizó una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC) que genera un pigmento rojo (formazán) en presencia del microorganismo. Este procedimiento se realizó de la siguiente manera: 50 µL de TCC se añadieron a cada pozo inoculado, se mezcló utilizando un agitador de placas y se incubó a 37 °C por 30 min. Transcurrido este tiempo, se observó la formación de un precipitado insoluble de color rojo que representó la CMI. Donde no existió desarrollo, la solución permaneció de color claro, indicando la CBM o CFM. Para confirmar los resultados, se determinó si el efecto era bactericida o fungicida, al tomar una muestra del cultivo con un asa y sembrarla en una placa de agar MH que se mantuvo en incubación durante 37 °C por 24 h para las bacterias y por 48 h para el caso de la levadura. Se consideró que el crecimiento en la placa era indicativo de un efecto bacteriostático o fungistático, en tanto que la ausencia del mismo correspondía a un efecto bactericida o fungicida (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016; Koneman, Allen, Dowell & Sommers, 2006; Quintero-Mora *et al.*, 2008;).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las especificaciones químicas se analizaron mediante la prueba estadística de análisis de varianza (Anova), empleando un nivel de significancia de $p < 0.05$ utilizando el programa estadístico GraphPadPrism 7.04.

Resultados

Especificaciones físicas

Las características físicas están relacionadas con la fuente vegetal, el método de recolección y el clima de la región donde es recolectado. La tabla 1 muestra la vegetación más abundante en los sitios circundantes a las colmenas de cada localidad de donde se obtuvieron las muestras de propóleos analizadas en este estudio.

Las muestras recolectadas en los municipios de los estados de México, Guanajuato y Puebla presentaron un color marrón con tintes verdes y amarillos; las muestras de Michoacán y Veracruz presentaron un color marrón claro con tintes amarillos y verdosos. Las muestras de Estado de México

presentaron un olor resinoso y el resto olor balsámico. El sabor de todas las muestras fue amargo. El 62.5% de las muestras presentó consistencia maleable y el resto rígidas (tabla 1), observando que existen diferencias en las características de las muestras.

Tabla 1. Vegetación circundante a las colmenas donde se extrajeron las muestras de propóleos analizadas y las características físicas de cada muestra.

Regiones de recolección	Especies de plantas predominantes	Nombre común	Color	Aroma	Sabor	Consistencia
Cuautitlán Izcalli, Estado de México	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalipto				
	<i>Ricinus communis</i> L.	Higuerilla	Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Maleable
	<i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	Cepillo o escobillón rojo				
El Oro y Villa del Carbón, Estado de México	<i>Pinus</i> sp	Pino				
	<i>Pinus teocote</i> Schltld.	Ocote				
	<i>Quercus rugosa</i> Née	Encino	Marrón con tintes amarillos	Balsámico	Amargo	Maleable
	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Fresno				
Tlalpujahua-Senguo, Michoacán	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalipto				
	<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	Pino	Marrón verdoso, tintes amarillos	Balsámico	Amargo	Maleable
	<i>Pinus</i> sp	Pino				
Tianguismanalco, Puebla	<i>Quercus rugosa</i> Née	Encino	Marrón verdoso, tintes amarillos	Balsámico	Amargo	Rígida
San José Iturbide, Guanajuato	<i>Opuntia ficus-indica</i> L.	Nopal				
	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	Huizache	Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Maleable
	<i>Prosopis glandulosa</i> Torr.	Mezquite				
	<i>Schinus molle</i> L.	Pirul				
Tlacotalpan, Veracruz	<i>Quercus rugosa</i> Née	Encino				
	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Fresno				
	<i>Salix alba</i> L.	Sauce	Marrón verdoso, tintes amarillos	Resinoso	Amargo	Rígida
	<i>Populus alba</i> L.	Álamo				
	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Naranjo				
	<i>Citrus limonum</i> Risso	Limón				

Fuente: Elaboración propia (INAFED, 2015; INEGI, 2009).

En la figura 1 se muestran las tonalidades de los propóleos en greña a simple vista (1A a 8A) y las tonalidades más definidas de cada muestra, al utilizar un microscopio estereoscópico (1B a 8B). La extracción del propóleo en greña con etanol al 70% se realizó en las condiciones establecidas por la norma de calidad, para evitar alteraciones en los metabolitos secundarios (DOF, 2017). Las tonalidades de las muestras van del ámbar claro al café como se muestran en la figura 1 (1C a 8C).

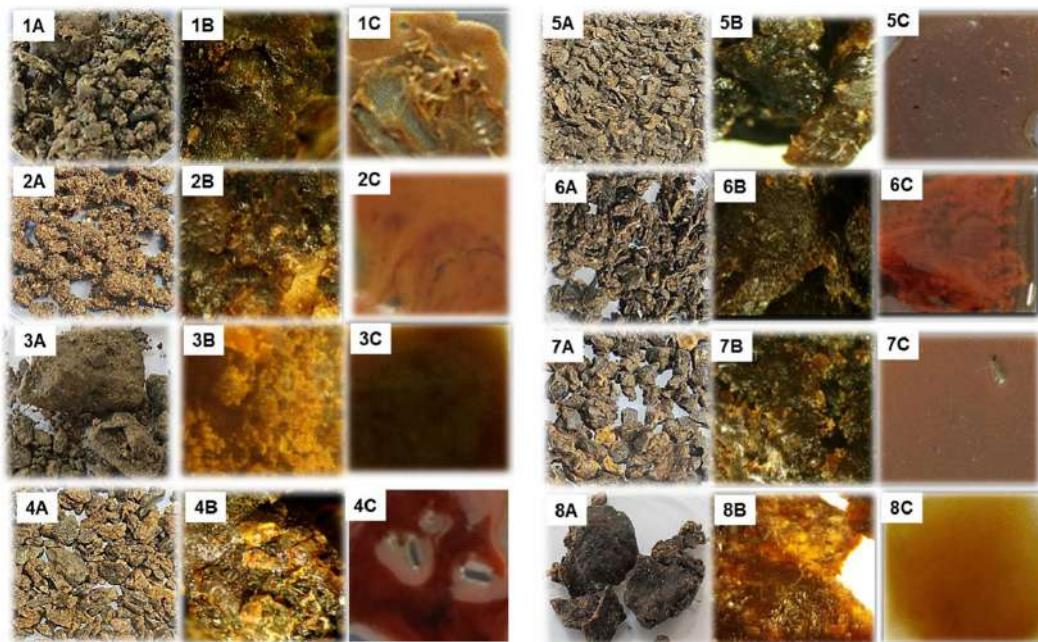


Figura 1. Aspecto de los propóleos obtenidos de las diferentes regiones de la República mexicana. A: Propóleo en greña; B: Vista microscópica (0.8X); C: Extracto etanólico. (1): Cuautitlán Izcalli, Estado de México; (2) Villa del Carbón, Estado de México; (3) El Oro, Estado de México; (4) Tlalpujahua-Senguo, Michoacán; (5) Tianguismanalco 2010, Puebla; (6) Tianguismanalco 2012, Puebla; (7) San José Iturbide, Guanajuato; (8) Tlacotalpan, Veracruz.

Fuente: Elaboración propia.

Especificaciones químicas

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis químico de los ocho propóleos estudiados y el rendimiento de los extractos. Se pueden observar dos grupos, uno formado por las muestras del Estado de México (Cuautitlán Izcalli) y Michoacán, que presentaron niveles altos de fenoles y flavonoides, y el otro constituido por las muestras del Estado de México (Villa del Carbón y El Oro), Guanajuato, Veracruz y Puebla, con niveles más bajos.

Tabla 2. Especificaciones químicas de ocho propóleos de la República Mexicana aplicando la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017.

Muestra	Rendimiento (%)	Fenoles (%)	Flavonoides (%)	Índice de oxidación (s)	Capacidad antioxidant (μg/mL)
Cuautitlán Izcalli, Estado de México	50.9	19.1 ± 2.90 ^a	4.04 ± 2.7 ^a	168 ± 1.8 ^a	86.6 ± 0.003 ^a
Villa del Carbón, Estado de México	30.9	6.9 ± 0.001 ^b	0.67 ± 1.8 ^b	283 ± 0.0016 ^b	52.6 ± 0.01 ^b
El Oro, Estado de México	38.5	6.4 ± 0.003 ^b	1.94 ± 2.4 ^c	70 ± 0.0013 ^c	48.0 ± 0.015 ^b
Tlalpujahua-Senguo, Michoacán	43.2	18.3 ± 0.003 ^a	2.87 ± 2.6 ^d	377 ± 0.0029 ^d	26.0 ± 0.02 ^c
Tianguismanalco 2010, Puebla	39.4	5.0 ± 0.001 ^c	0.34 ± 0.5 ^e	2975 ± 2.4 ^e	189.3 ± 0.24 ^d
Tianguismanalco 2012, Puebla	34.2	4.0 ± 0.002 ^c	0.29 ± 0.4 ^e	3347 ± 1.4 ^f	277.9 ± 1.04 ^e
San José Iturbide, Guanajuato	25.5	5.2 ± 0.001 ^c	0.99 ± 0.7 ^b	1479 ± 0.0002 ^g	83.5 ± 0.03 ^a
Tlacotalpan, Veracruz	39.4	1.2 ± 0.0002 ^d	0.51 ± 0.5 ^b	2894 ± 1.24 ^e	950.4 ± 1.09 ^f
Parámetro establecido en la NOM	No establecido en la NOM	Mínimo 5%	Mínimo 0.5%	Mínimo 22 s	Hasta 100 μg/mL

Fuente: Elaboración propia. * Cada valor es la media ± desviación estándar, n = 3.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La cantidad de compuestos fenólicos de las muestras de Puebla, 2012, y Veracruz no cumplen las especificaciones de la norma de calidad. Respecto a la cantidad de flavonoides, las dos muestras de Puebla no presentan una cantidad superior a 0.5%, por lo que no cumplen con esta norma. Estos resultados difieren con lo reportado por Lozina, Peichoto, Acosta & Granero (2010), quienes mencionan que las tonalidades de los extractos etanólicos están relacionadas con el contenido de los compuestos fenólicos y flavonoides, porque las muestras de Puebla presentan un color ámbar y la muestra de Veracruz, un color amarillo.

Por otro lado, la cantidad de estos metabolitos y la capacidad antioxidante del propóleo están relacionadas. Una determinación rápida de esta actividad es el índice de oxidación para detectar la presencia de compuestos de naturaleza fenólica, o con grupos funcionales oxidables (Delgado *et al.*, 2015) al utilizar permanganato de potasio ($KMnO_4$) como agente oxidante de color violeta intenso, que se vuelve incoloro al reducirse el catión Mn^{7+} en una solución ácida (Graham, 2004; Palomino *et al.*, 2010; Skoog, Holler & Crouch, 2005). Los resultados muestran que ninguna muestra cumple con lo establecido en la norma de calidad mexicana (mínimo 22 s), al obtener tiempos con rangos de 70 s a 1479 s, observando diferencias significativas entre los propóleos.

Para la capacidad antioxidante (CA_{50}) se emplea el radical DPPH• monitoreando su reducción por un antioxidante con la disminución en la absorbancia y cambio de coloración de morado a amarillo. Los resultados de la capacidad antioxidante de los diferentes propóleos estudiados indican que las muestras del Estado de México, Michoacán y Guanajuato cumplen los requisitos de la norma de calidad con valores por debajo de los 100 μg/mL, lo que indica la presencia de compuestos antioxidantes.

Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los resultados del análisis de cada muestra de propóleo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se muestran en las tablas 3 a 9, donde se indican aquellos compuestos que tuvieron una identificación certera (> 90%) con relación a la base de datos del equipo. Se detectaron ácidos grasos, alcoholes, cetonas, flavonoides, terpenos e hidrocarburos en diferente abundancia porcentual. En las figuras 2 a 8 se muestran los chromatogramas obtenidos para cada muestra analizada.

Tabla 3. Constituyentes del propóleo de Cuautitlán Izcalli, Estado de México caracterizado por CG-EM

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	10.259	0.45	Palmitato de etilo	Ácido graso	Fragancias en cosméticos, saborizante	NCBI (2018)
2	11.025	0.47	Éster etílico del ácido oleico	Ácido graso	Cebador de feromonas en las abejas	Leoncini <i>et al.</i> , 2004
3	12.467	58.48	Pinocembrina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidante, antiparasitaria.	López, Ming & Neil, 2002; Rasul <i>et al.</i> 2013
4	13.162	9.55	Tectocrisina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria	During & Larondelle, 2013
5	13.298	2.6	1-(3-aminopropil)azaciclotridecan-2-ona	Cetona	Anticancerígena, analgésica, plaguicida	García <i>et al.</i> 2007

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Constituyentes del propóleo de Villa del Carbón, Estado de México, caracterizado por CG-EM.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	4.71	1.97	Borneol	Terpeno	Antimicrobiana	Jiang <i>et al.</i> 2011; Santoyo <i>et al.</i> 2005
2	10.948	0.84	Ácido vaccénico	Ácido graso	Promotor del factor de crecimiento	Sanhueza, Nieto & Valenzuela, 2002
3	12.456	3.78	Pinocembrina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidante, antiparasitaria	López, Ming & Neil, 2002; Rasul <i>et al.</i> 2013
4	16.361	1.48	Taraxasterol	Terpeno	Antiinflamatoria	Zhang, Xiong & Liu, 2012

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Constituyentes del propóleo de El Oro, Estado de México, caracterizado por CG-EM.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	4.265	3.18	Alcohol feniletílico	Alcohol	Antimicrobiana	NCBI (2018)
2	6.087	3	2-Metoxy-4-vinilfenol	Fenol	Antimicrobiana, antioxidante	López-Mejía, López-Malo & Palou, 2014

3	8.206	0.25	Cadideno: 7-epi- α -cadineno	Terpeno	Antimicrobiano	NCBI (2018)
4	8.449	0.36	Cadideno: cadina-3,9-dieno	Terpeno	Antimicrobiano	NCBI (2018)
5	8.592	1.07	(1E) -1-Etiliden-7a-metilperhidroindeno	Hidrocarburo	Lipogénesis	NCBI (2018)
6	10.159	1.89	Ácido palmítico	Ácido graso	Lipogénesis	NCBI (2018)
7	10.408	0.35	Hexadecanal	Ácido graso	Producción de lípidos y ácidos grasos	NCBI (2018)
8	10.954	0.58	Ácido oleico	Ácido graso	Cardioprotector	NCBI (2018)
9	10.978	0.48	Metil éster del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico	Ácido graso	No referido	No referido
10	11.031	0.52	Ácido esteárico	Ácido graso	Tensoactivo	NCBI (2018)
11	11.263	0.4	1,19-Eicosadieno	Hidrocarburo	Antibacteriano	NIST Cho <i>et al.</i> 2009
12	12.111	10.23	Cardamonina	Chalcona	Antimicrobiana	
13	12.283	0.7	3-Pentadecilfenol	Fenol	Inhibidor de la acetilcolinesterasa; tratamiento para el Alzheimer	Stasiuk, Bartosiewicz & Kozubek, 2008
14	12.45	22.67	Pinocembrina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidantia, antiparasitaria	López, Ming & Neñí, 2002; Rasul <i>et al.</i> 2013
15	12.8	11.95	Tectocrisina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidantia, antiinflamatoria	During & Larondelle, 2013
16	13.37	2.23	Sakuranetina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidantia, antiinflamatoria	Shimizu <i>et al.</i> 2012

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Constituyentes del propóleo de Tlalpujahua-Senguo, Michoacán, caracterizado por CG-EM.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	7.903	0.45	Ácido dodecanóico (ácido laúrico)	Ácido graso	Antimicrobiana, antiviral	Mora, 2003; Ruzin & Novick, 2000
2	8.586	0.47	(1E) -1-Etiliden-7a-metiloctahidro-1H-indeno	Hidrocarburo	Lipogénesis	PubChem, 2018

3	10.265	1.68	Palmitato de etilo	Ácido graso	Fragancias en cosméticos, saborizante	NIST, 2011
4	10.722	15.75	Aromadendreno	Terpeno	Antimicrobiana	Mulyaningsih, Sporer, Zimmermann, Reichling & Wink, 2010
5	10.96	0.95	Ácido oleico	Ácido graso	Antimicrobiana, modulador hormonal, antioxidante	Barbosa & Mandarim de-Lacerda, 2010; Dilika, Bremner & Meyer, 2000; Naughton, Hanson, Mathai & McAinch, 2018
6	11.037	5.37	Éster etílico del ácido oleico	Ácido graso	Cebador de feromonas en las abejas	Leoncini <i>et al.</i> , 2004
7	11.957	27.06	Esclareno	Terpeno	Antibacteriana	Gaviria, Quijano, Pino & Madriñán, 2011
8	12.117	10.53	Cardamonina	Chalcona	Antimicrobiana	Cho <i>et al.</i> 2009
9	12.159	0.72	1,1,7-Trimetildecahidroespiro[ciclopropa[e]azuleno-4,2'-oxirano]	Terpeno	Antagonista de calcio	NIST, 2011
10	12.45	7.61	Pinocembrina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidante, antiparasitaria	López, Ming & Neil, 2002; Rasul <i>et al.</i> 2013
11	12.628	0.73	Eicosano	Hidrocarburo	No referido	No referido
12	14.847	0.36	3,5,7,4'-Tetrametoxiquercetina	Flavonoide	No referido	No referido
13	16.023	4.15	Lupenona	Terpeno	Antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, antipirética, antiparasitaria	Ahn & Oh, 2013

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Constituyentes del propóleo de Tianguismanalco 2012, Puebla, caracterizado por CG-EM.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	7.915	1.25	Ácido dodecanoico (ácido laúrico)	Ácido graso	Antimicrobiana, antiviral	Mora, 2003; Ruzin & Novick, 2000
2	10.259	0.62	Palmitato de etilo	Ácido graso	Fragancias en cosméticos, saborizante	NIST, 2011
3	10.687	0.93	11-Nonadecanol	Alcohol	Antimicrobiana; citotóxica	Kuppuswamy, Jonnalagadda & Arockiasamy, 2013
4	10.948	4.97	Ácido vaccénico	Ácido graso	Promotor del factor de crecimiento	Sanhueza <i>et al.</i> , 2002
5	11.025	1.40	Ácido oleico	Ácido graso	Antimicrobiana, modulador de las respuestas hormonales, antioxidante	Barbosa & Mandarim de Lacerda, 2010; Dilika <i>et al.</i> 2000; Naughton <i>et al.</i> 2018 Giriwono <i>et al.</i> 2013; Inoue <i>et al.</i> 2005;
6	14.58	17.85	Geranilgeraniol	Terpeno	Antibacteriana, antiinflamatoria, antiparasitaria.	Menna-Barreto <i>et al.</i> 2008
7	16.011	15.70	Lupenona	Terpeno	Antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, antipirética, antiparasitaria	Ahn & Oh, 2013; Polanco-Hernández <i>et al.</i> 2013; Talla <i>et al.</i> 2013
8	16.213	12.67	α-Amirina	Terpeno	Antioxidante, analgésica, hiperglucemiant e hipolipemiante	Almeida <i>et al.</i> 2012
9	16.533	16.31	Lupeol	Terpeno	Antimicrobiana, antiparasitaria, antiinflamatoria, antioxidante	Gallo & Sarachine, 2009; Santiago & Mayor, 2014

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Constituyentes del propóleo de San José Iturbide, Guanajuato, caracterizado por CG-EM.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	7.897	4.4	Ácido laúrico	Ácido graso	Antimicrobiana, antiviral	Mora, 2003; Ruzin & Novick, 2000
2	10.147	1.15	Ácido palmítico	Ácido graso	Lipogénesis	NCBI (2018)
3	10.319	0.33	Aromadendreno	Terpeno	Antimicrobiana	Mulyaningsih <i>et al.</i> , 2010
4	12.432	5.02	Selineno	Terpeno	Antimicrobiana	Pino, Meléndez & Stashenko, 2009; Sitarek <i>et al.</i> 2017

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Constituyentes del propóleo de Tlacotalpan, Veracruz, caracterizado por CG-EM.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	5.132	0.21	Verbenona	Terpeno	Antimicrobiana	Santoyo <i>et al.</i> (2005); Jiang <i>et al.</i> (2011)
2	11.809	0.46	Ferruginol	Fenol y terpeno	Antitumoral, antibacteriana, gastroprotector	Flores <i>et al.</i> (2001)
3	13.293	1.42	Escualeno	Terpeno	Antibacteriana	NIST, 2011
4	16.231	9.76	12-Oleaneno	Terpeno	Antibacteriana	Muhammad <i>et al.</i> (2000)
5	16.385	5.19	4,8a-Dimetil-6-(1-metiletenil)-3,5,6,7,8,8a-hexahidro-2(1H)-naftalenona	Hidrocarburo	No referido	No referido
6	16.504	5.98	Cicloartenol	Terpeno	Biosíntesis de estanoles y esteroles, antiinflamatoria	Machado <i>et al.</i> (2016)

Fuente: Elaboración propia.

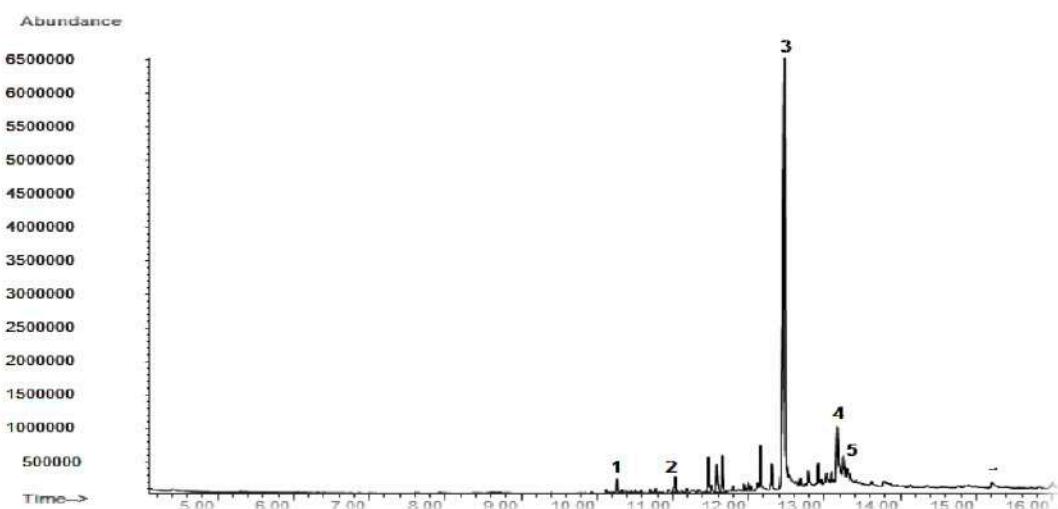


Figura 2. Cromatograma de gases correspondiente al propóleo de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Fuente: Rodríguez (2015).

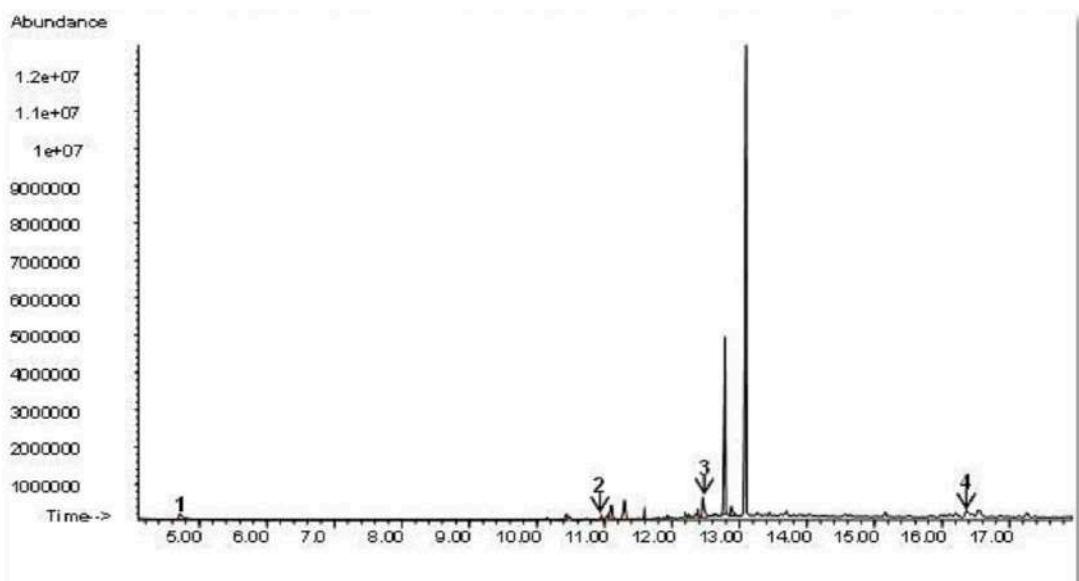


Figura 3. Cromatograma de gases correspondiente del propóleo de Villa del Carbón, Estado de México.

Fuente: Rodríguez (2015).

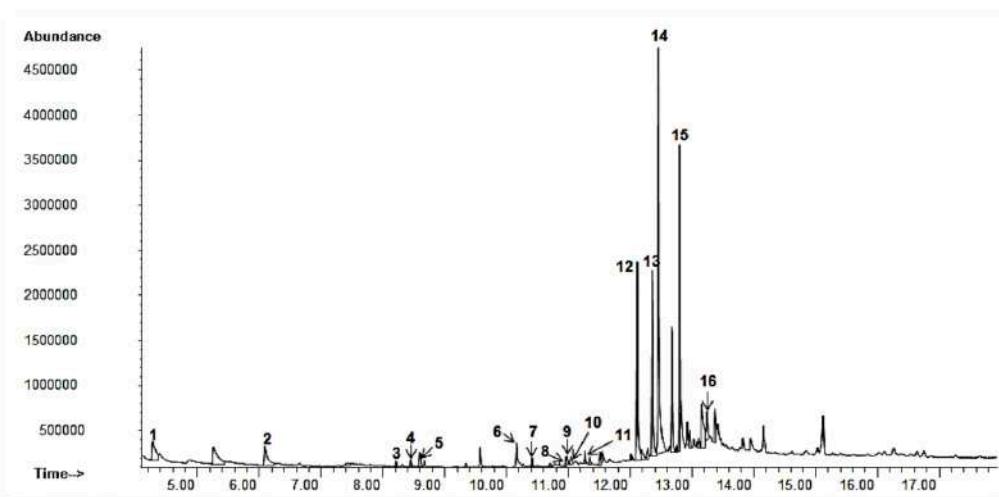


Figura 4. Cromatograma correspondiente del propóleo de El Oro, Estado de México.
 Fuente: Rodríguez (2015).

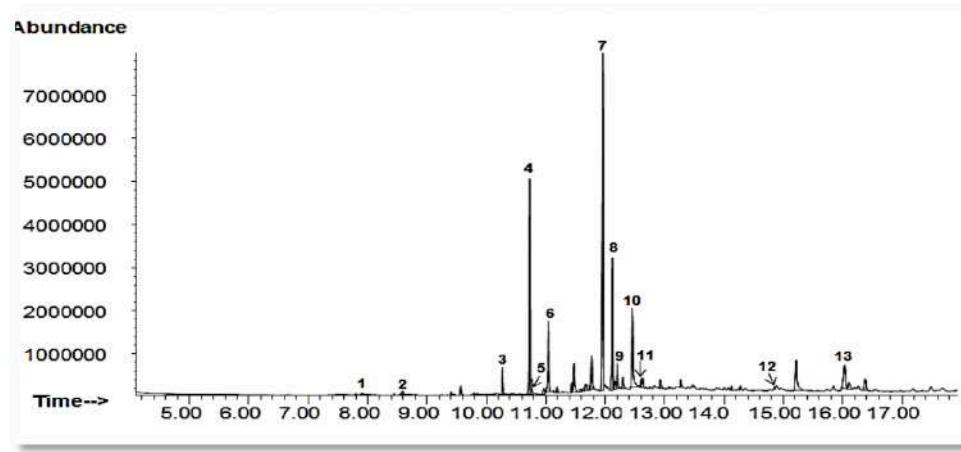


Figura 5. Cromatograma de gases correspondiente al propóleo de Tlalpujahua-Senguo, Michoacán.
 Fuente: Rodríguez (2015).

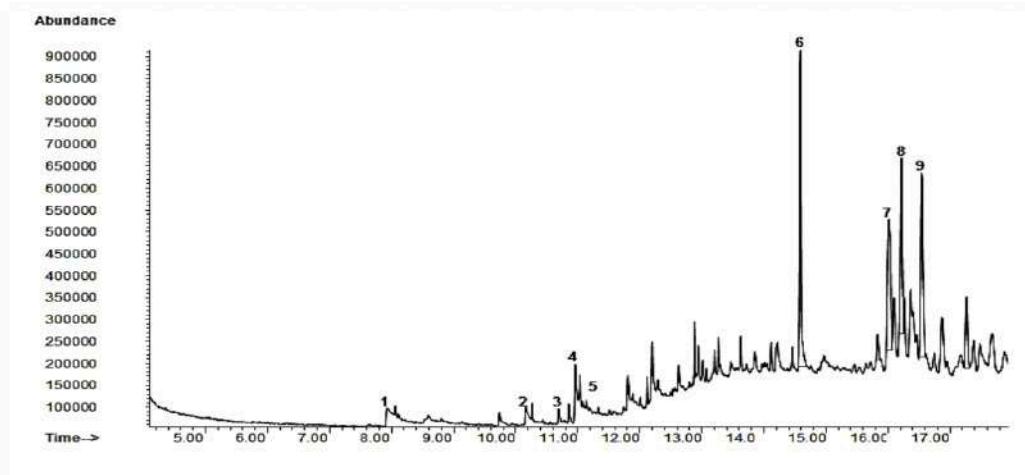


Figura 6. Cromatograma de gases correspondiente al propóleo de Tianguismanalco 2012, Puebla.
 Fuente: Rodríguez (2015).

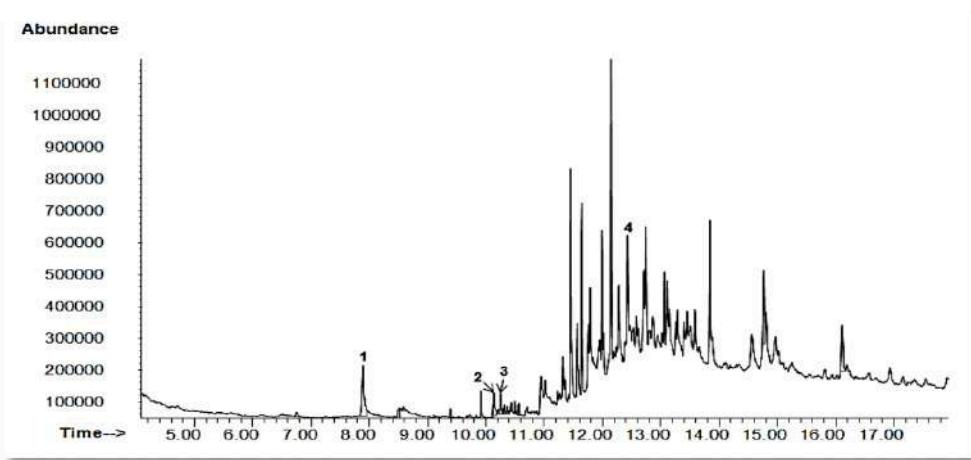


Figura 7. Cromatograma de gases correspondiente al propóleo de San José Iturbide, Guanajuato.
 Fuente: Rodríguez (2015).

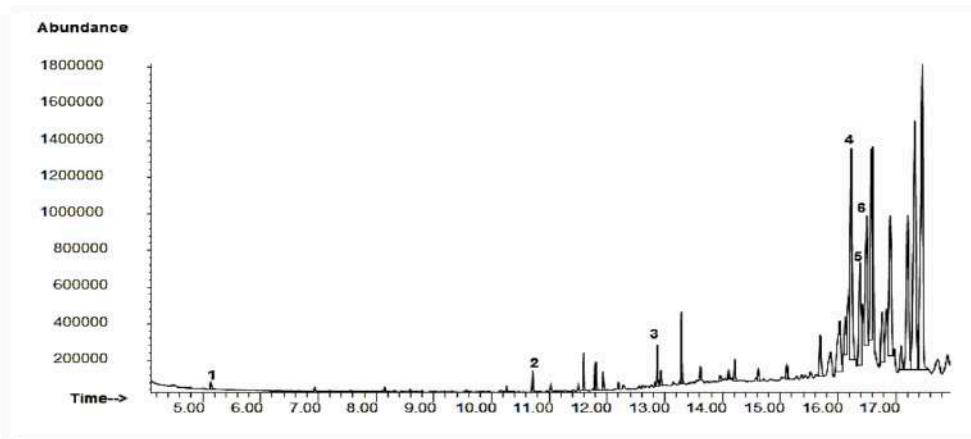


Figura 8. Cromatograma de gases correspondiente al propóleo de Tlacotalpan, Veracruz.
 Fuente: Rodríguez, 2015.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana se presentan en la tabla 10. En la figura 9 se ejemplifica la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) para el caso de *S. aureus* frente al extracto de propóleo de Michoacán y de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. En los pozos donde hay microorganismos, se observa disminución en el color y la formación de un botón rojo en el fondo de la concavidad representando la CMI y, donde no hay desarrollo, la solución permanece de color amarillo y representa la CMB. En la figura 10 se muestra la confirmación del resultado bacteriostático y bactericida.

Se observó que todas las muestras presentan actividad antimicrobiana frente a los tres microorganismos evaluados. Las muestras de Puebla y Veracruz presentan una baja actividad antimicrobiana, al requerir concentraciones elevadas del extracto para actuar sobre los microorganismos.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de los propóleos frente a cepas de referencia de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*.

Muestra	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	ATCC 6538 CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	ATCC 8739 CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	ATCC 10231 CMI (mg/mL)	CMF (mg/mL)
Cuautitlán Izcalli, Estado de México	0.19	0.37	3.75	15.00	0.75	1.50
Villa del Carbón, Estado de México	0.46	0.93	7.50	30.00	24.00	> 24.00
El Oro, Estado de México	0.93	1.87	7.50	30.00	1.80	7.50
Tlalpujahuá- Senguo, Michoacán	0.37	0.75	7.50	30.00	0.75	3.00
Tianguismanalco 2010, Puebla	30.00	> 30.00	15.00	30.00	7.50	30.00
Tianguismanalco 2012, Puebla	15.00	30.00	15.00	>30.00	3.75	15.00
San José Iturbide, Guanajuato	0.46	0.93	3.75	15.00	12.00	24.00
Tlacotalpan, Veracruz	30.00	> 30	15.00	30.00	15.00	30.00

Fuente: Elaboración propia.

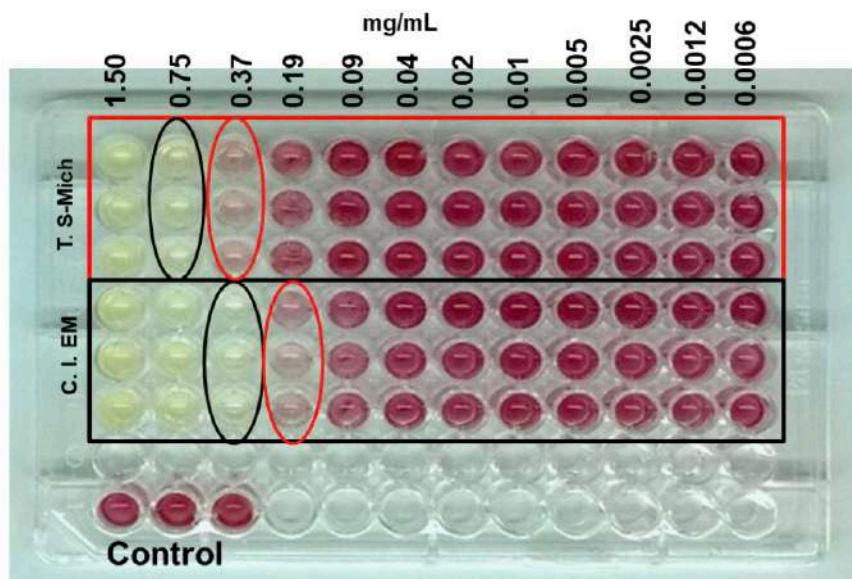


Figura 9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (rojo) y Concentración Mínima Bactericida (negro) de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente al propóleo de Tlalpujahuá-Senguo (Michoacán) y de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, por microtécnica de dilución en caldo.

Fuente: Elaboración propia.

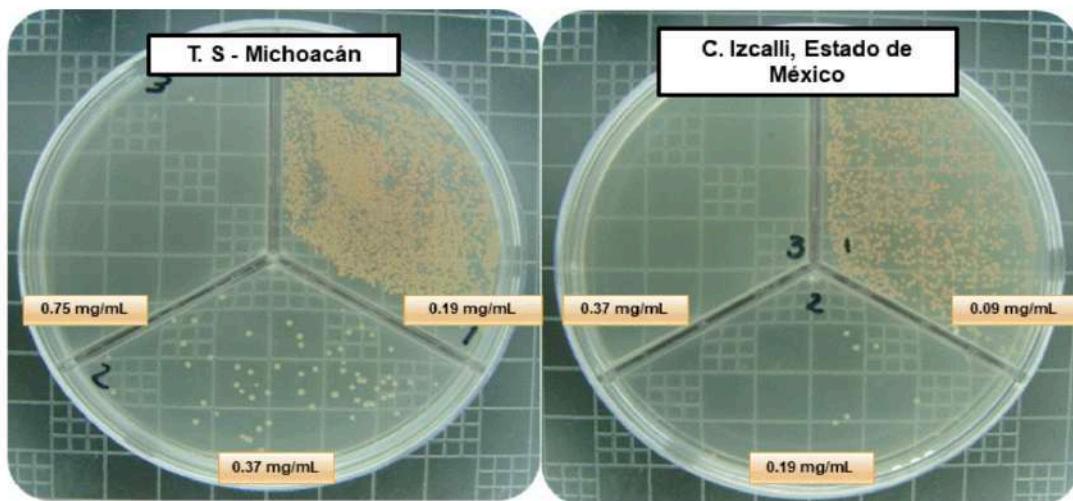


Figura 10. Confirmación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente al propóleo de Tlalpujahua-Senguo (Michoacán) y de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

La gran diversidad vegetal y climática de México son factores que han propiciado la producción de propóleos con una gran variedad de colores, aromas y sabores, características que en conjunto se denominan propiedades organolépticas (Ramírez-Arriaga, Martínez-Bernal, Ramírez & Martínez-Hernández, 2016).

Estudios realizados en muestras de propóleos de los diferentes estados de la República Mexicana muestran una gran variación en colores, texturas, grados de humedad, dependientes del lugar de origen, la vegetación y el tipo de clima (Delgado *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2016).

Los propóleos en greña estudiados presentaron tonalidades en marrón verdoso con tintes amarillos, parámetro que no puede estandarizarse por ser dependiente del origen vegetal. El aroma en su mayoría fue balsámico, que se relaciona con compuestos aromáticos y volátiles de mezclas complejas entre alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres o terpenos, estos últimos presentes en especies de la familia Pinaceae (Salamanca, Correa & Principal, 2007) localizados alrededor de los apiarios de El Oro y Villa del Carbón en el Estado de México, de Michoacán y de Puebla.

La principal fuente botánica de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, es de árboles de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.), higuerilla (*Ricinus communis* L.) y cepillo (*Callistemon citrinus*), como lo reporta Londoño *et al.* (2010), y le proporcionan aroma resinoso al propóleo.

La variación en la vegetación presente en cada localidad hace que sea importante utilizar métodos palinológicos con el fin de determinar qué flora fue visitada por las abejas para recolectar la materia prima (resina, cera y polen) para formar los propóleos (Ramírez-Arriaga *et al.*, 2016; Vargas-Sánchez, Peñalba-Garmendia, Sánchez-Escalante, Torrescano-Urrutia & Sánchez-Escalante, 2016).

Por otro lado, el índice de oxidación en los propóleos es influenciado por el contenido de compuestos fenólicos (Bedascarrasbure, 2006). Los resultados indican que ninguna muestra cumple con lo establecido en la norma de calidad mexicana (mínimo 22 s), considerando que es una prueba visual, la

cual presenta inconvenientes básicos como la distinción de colores por el ojo humano y, como factor añadido, el subjetivismo. Es por ello que se realiza la determinación de la actividad antioxidante por técnicas espectrofotométricas (Skoog *et al.*, 2015). Al comparar los resultados de la cantidad de flavonoides de este estudio (0.29% a 2.87%) con los reportados por Hernández-Zarate *et al.* (2017), en propóleos de Guanajuato (1.32% a 37%) existe diferencia en la cantidad de flavonoides que se atribuye al tipo de vegetación de la cual las abejas recolectan las resinas, principalmente. Kumazawa, Hamasaka & Nakamaya (2004) indican la diferencia observada en la composición química de propóleos de diferentes orígenes geográficos y lo difícil que resulta esto al evaluar la calidad de un propóleo.

Por otro lado, es de consideración la estructura química de los flavonoides para una mayor capacidad antioxidante, como son: la presencia en el anillo B de la estructura catecol u *ortho*-dihidroxí; la presencia de un doble enlace en la posición 2 y 3 del anillo C, y la presencia de un grupo hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo A (Limón *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2012; Vargas-Sánchez *et al.*, 2014b).

Los propóleos de Cuautitlán Izcalli, Estado de México y de Michoacán presentaron el mayor porcentaje de fenoles y flavonoides. En las tres muestras del Estado de México y de Michoacán se detectó la presencia de pinocembrina (5,7-dihidroxiflavanona), que es uno de los principales flavonoides aislados de plantas de zonas templadas como *Pinus* sp., *Eucalyptus* sp. (Rasul *et al.*, 2013) y árboles de la especie de *Populus* (álamos) reportados por primera vez por Lugo-Sepúlveda, Martínez-Robinson, Morales, De la Rosa & Noriega (2009). Este flavonoide se caracteriza por presentar dos grupos hidroxilo libres en posiciones 5 y 7 (anillo A), confiriéndole la actividad antioxidante.

En este sentido, Lugo-Sepúlveda *et al.* (2009) indican que la Yerba blanca (*Encelia farinosa*) es la principal fuente botánica de los propóleos de Sonora, logrando identificar cuatro flavonoides principales: pinocembrina, xantomicrol, crisina y galangina en la planta y en los propóleos de Caborca, Sonora, con gran potencial antioxidante.

Los principales compuestos detectados en las muestras de Puebla fueron triterpenos pentacíclicos como el lupeol, la luponona y la β -amirina, provenientes de las resinas del tronco de los pinos (Ormeño & Fernández, 2012) y que han sido identificados en propóleos de Brasil vinculados a actividades antiinflamatorias, anticancerígenas y antivirales (Bracho, Rodríguez & Llanes, 2009), pero que mostraron baja actividad antioxidante.

Otra propiedad de los propóleos es su actividad antimicrobiana (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014a). Los resultados de los propóleos del Estado de México indican mayor sensibilidad de *S. aureus*, debido a que las resinas colectadas por las abejas provienen de las especies del género *Eucalyptus* (Londono *et al.*, 2010), reconocido por su actividad antibacteriana (Yáñez & Cuadro, 2012)

Velázquez *et al.* (2007) evaluaron la actividad antimicrobiana de propóleos del desierto de Sonora. No se presentó efecto sobre *E. coli* y *P. aeruginosa*, únicamente sobre *S. aureus*, que se relaciona con la presencia de pinocembrina, acacetina, éster fenético del ácido cafeíco (*caffein acid phenethyl ester* [CAPE]), crisina, galangina, pinobanksina y naringenina.

En otro estudio realizado por Vargas-Sánchez *et al.* (2014a) sobre la composición química de un extracto de propóleo comercial, detectaron compuestos como el ácido cinámico, crisina, quer cetina, pinocembrina y kaempferol con potencial antimicrobiano y antioxidante para la aplicación del propóleo en la prevención del deterioro oxidativo de alimentos.

Los resultados del presente trabajo confirman la baja sensibilidad de las especies Gram negativas comparadas con las Gram positivas. La bacteria *E. coli* requiere concentraciones más elevadas de propóleo, como lo mencionan Probst, Sforcin, Rall, Fernandes & Fernandes (2011), ya que la estructura de la pared de las bacterias Gram negativas presenta una membrana externa compleja con dos bicapas lipídicas que actúan como barreras físicas entre los microorganismos y el medio ambiente, lo que evita las interacciones de la célula bacteriana con sustancias dañinas, razón por la que se requieren concentraciones mayores para su inhibición. Las bacterias Gram positivas presentan solo una membrana relativamente permeable, lo que las hace más susceptibles a las interacciones con el medio ambiente.

Los flavonoides detectados en los propóleos estudiados fueron la pinocembrina (flavanona) y la tectocrisina (flavona), y un precursor de flavonoide, la cardomonina (chalcona). Xie, Yang, Tang, Chen & Ren (2015) investigaron que las flavononas requieren la presencia de sustituyentes hidroxilo en la posición 2',4' o 2',6' en el anillo B, en la posición 5,7 del anillo A o un grupo alifático de cadena larga en la posición 6 u 8; las flavonas requieren de una cadena orto-alquilamino en C-7; las chalconas de sustituyentes hidroxilo en 2' o 4' del anillo A para ser lipofílico, para presentar actividad antioxidantante.

Los mecanismos antimicrobianos de los flavonoides que han sido propuestos son inhibición de la motilidad, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de las funciones de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, inhibición de la unión y formación de biopelículas, inhibición de las porinas y atenuación de la patogenecidad (Akca et al., 2016; Xie et al., 2015).

La actividad de los propóleos contra *C. albicans* mostraron un efecto fungistático a bajas concentraciones en el propóleo de Cuautitlán Izcalli, Estado de México (1.5 mg/mL), en comparación con Quintero et al. (2008) donde reportan la actividad antifúngica de ocho extractos etanólicos de propóleos provenientes de diferentes regiones de México frente a cepas de *C. albicans*, de referencia (ATCC 10231) y 36 cepas de origen clínico, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar, realización de curvas de crecimiento en caldo glucosado de Sabouraud solo y con diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de propóleos. Los resultados mostraron que los propóleos de Cuautitlán Izcalli y Amatepec (Estado de México) tuvieron mayor actividad biológica con acción fungicida de 0.6 mg/mL frente a la levadura, y concluyen que puede ser utilizado como tratamiento alternativo de candidiasis.

Por otro lado, Flores, Moreno, Londoño & Cruz (2016) reportan la eficacia del propóleo de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, como tratamiento de las lesiones en piel en caballos producidas por *C. albicans*, debido a la capacidad de inducir la inhibición del tubo germinativo impidiendo la transición de levadura a micelio, cambios en la pared celular de las levaduras, con sitios de gemación irregulares y perturbación de la división, resultando en defectos en la textura de la pared de las células hijas (Londoño et al., 2010).

La presencia de compuestos con actividad antifúngica en los propóleos de Tlalpujahua-Senguo y El Oro, como la pinocembrina y el 2-metoxi-4-vinilfenol, provocan la sensibilidad de la levadura con una CMF de 3.0 mg/mL y 7.5 mg/mL, respectivamente, compuestos que se encuentran en especies de pinos alrededor de los apiarios, presentaron 5% o más de compuestos fenólicos y 0.5% o más de flavonoides, como lo establece la normativa mexicana. Los propóleos de Puebla y Veracruz tuvieron una disminuida actividad antimicrobiana debido a que presentan valores mínimos de estos compuestos bioactivos.

Con estos importantes datos, los resultados de este estudio muestran que los componentes químicos de los propóleos estudiados son compuestos con actividad antimicrobiana y antioxidante, y estas están relacionadas con la cantidad presente de cada compuesto en el propóleo, como lo han reportado diferentes estudios.

Varios investigadores han reportado que los mecanismos antioxidantes propuestos son mediante secuestro de radicales libres, o actuando como substrato para radicales, tales como superóxido e hidroxilo, y quelación de iones metálicos y que el mecanismo antimicrobiano involucra la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014b); sin embargo, no hay reportes relacionados con respecto al mecanismo de acción de los propóleos mexicanos, pero es evidente que los resultados anteriores sugieren que su actividad biológica se debe a la combinación y sinergia de los diferentes compuestos químicos que los integran (Lotti *et al.*, 2010; Morgado *et al.*, 2014), siendo necesario estudios en microscopía electrónica, genética y biología molecular, que nos permitan apreciar el daño estructural en los microorganismos evaluados para proponer un posible mecanismo de acción.

Conclusiones

Se realizó el estudio de la composición química de ocho propóleos de la República Mexicana, identificando la variedad de los compuestos más abundantes en cada uno. Las muestras con niveles elevados de flavonoides son las provenientes del Estado de México y Michoacán, presentando propiedades antioxidantas elevadas y actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Los propóleos de los municipios de Puebla, Guanajuato y Veracruz no contienen cantidades importantes de fenoles y flavonoides; en consecuencia, presentan una disminución en las propiedades evaluadas y no cumplen las especificaciones de la norma de calidad de México para ser ofrecidos como producto con actividad antimicrobiana.

Las propiedades biológicas de los propóleos están relacionadas con la variabilidad de los compuestos fenólicos y de flavonoides, lo que se puede relacionar con factores como la vegetación, el clima, el tipo de abeja, entre otras, por lo que se recomienda continuar con la investigación acerca del origen botánico de los propóleos de la República Mexicana. Es importante, en México, fomentar la producción y evaluación de propóleos que garantice sus propiedades, principalmente químicas y antimicrobianas, beneficiando así al sector apícola y al usuario de este producto.

Agradecimientos

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

Referencias

- Ahn, E. K., & Oh, J. S. (2013). Lupenone Isolated from *Adenophora triphylla* var. *japonica* Extract Inhibits Adipogenic Differentiation through the Downregulation of PPAR γ in 3T3-L1 Cells. *Phytotherapy Research*, 27(5), 761-766. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.4779>
- Akca, A. E., Akca, G., Toksoy Topçu, F., Macit, E., Pıldöken, L., & Özgen, I. (2016). The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An *In Vitro* Study. *BioMed Research International*, 2016, 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3627463>
- Almeida Santos, F., Torres Frota, J., Rodrigues Arruda, B., Sousa de Melo, T., de Carvalho Almeida da Silva, A. A., de Castro Brito, G. A., Chaves, M. H., & Satyanarayana Rao, V. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, 11(98), 2-8. doi: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-98>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Bankova V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15. doi: <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., Barbosa da Silva Cunha, I., Danert, C., Nogueira Eberlin, M., Falcão, S. I., Isla, M. I., Nieva Moreno, M. I., Papotti, G., Popova, M., Basso Santiago, K., Salas, A., Frankland Sawaya, A. C. H., Vilczaki Schwab, N., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., Trusheva, B., Vilas-Boas, M., Wilson, M., & Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49. doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>

Barbosa Aguilera, M., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2010). Beneficial Effects of Olive Oil Compared with Fish, Canola, Palm and Soybean Oils on Cardiovascular and Renal Adverse Remodeling due to Hypertension and Diabetes in Rat. En V. R., Preedy, & R. R., Watson, (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 787-794). London: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00082-6>

Barrón-Yáñez, R. M., García-Mateos, M. R., Soto-Hernández, M., Colinas-León, T., & Kite, G. C. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calathea secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(3), 151-157.

Bedascarrasbure, E. (2006). *Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de componentes y propiedades químicas*. Argentina: Magna.

Bracho Pérez, J. C., Rodríguez Best, C., & Llanes, F. (2009). Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(4), 439-452.

Cheng, A. X., Han, X. J., Wu, Y. F., & Lou, H. X. (2014). The Function and Catalysis of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases Involved in Plant Flavonoid Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 1080-1095. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms15011080>

Barry, A. L., Craig, W. A., Nadler, H., Reller, L. B., Sanders, C. C., & Swenson, J. M. (2009). M26-A, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 19(18), 1-29. Recuperado el 26 de febrero de 2018 de https://clsit.org/media/1462/m26a_sample.pdf.

Cho, M., Ryu, M., Jeong, Y., Chung, Y. H., Kim, D. E., Cho, H. S., Kang, S., Han, J. S., Chang, M. Y., Lee, C. K., Jin, M., Kim, H. J., & Oh, S. (2009). Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 500-505. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.124>

Delgado Aceves, M. L., Andrade Ortega, J. A., & Ramírez Barragán, C. A. (2015). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 74-87. doi: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i28.270>

Dilik, F., Bremner, P. D., & Meyer, J. J. M. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, 71(4), 450- 452. doi: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00150-7)

Diario Oficial de la Federación (DOF). (6 de octubre de 2017). *Norma Oficial Mexicana: Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.NOM-003-SAG/GAN-2017*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA). Recuperado el 6 de octubre de 2017 de http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6794/sagarpa11_C/sagarpa11_C.html

During, A., & Larondelle, Y. (2013). The O-methylation of chrysanthemic acid markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure-activity relationships of flavones. *Biochemical pharmacology*, 86(12), 1739-1746. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.003>

Elejalde Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326-335. doi: <http://dx.doi.org/10.4321/S0212-71992001000600010>

Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plants Science*, 3(222), 1-15. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>

- Fang, Y., Sang, H., Yuan, N., Sun, H., Yao, S., Wang, J., & Qin, S. (2013). Ethanolic extract of propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Lipids in Health and Disease*, 12(123), 1-6. doi: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-123>
- Farnesi, A. P., Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J. K., & Soares, A.E.E. (2009). Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 635-640. doi: <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr023>
- Farré, R., Frasquet, I., & Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45(1), 21-43. doi: <https://doi.org/10.30827/ars.v45i1.5105>
- Fischer, G., Rochedo Conceição, F., Pereira Leivas Leite, F., Alves Dummer, L., D'Avila Vargas, G., de Oliveira Hübner, S., Dellagostin, O. A., Paulino, N., Scremen Paulino, A., & Vidor, T. (2007). Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25(7), 1250-1256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.005>
- Flores, C., Alarcón, J., Becerra, J., Bittner, M., Hoeneisen, M., & Silva, M.. (2001). Extractable compounds of native trees chemical and biological study I: Bark of *Prumnopitys andina* (Podocarpaceae) and *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae). *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46(1), 61-64. doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442001000100010>
- Flores Rodríguez, I. S., Moreno Monteagudo, M., Londoño Orozco, A., & Cruz Sánchez, T. A. (2016). Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomycosis in Horses. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6, 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.61001>
- Gallo, M. B. C., & Sarachine, M. J. (2009). Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutics Sciences*, 3(1), 46-66.
- García Bernal, M., Medina Marrero, R., Hidalgo Llanes, P. I., Delgado Lasval, M. S., Truffin Truffin, E., & Gómez Marrero, R. (2007). Actividad *in vitro* del Propóleos frente a Patógenos Bacterianos aislados de Infecciones Humanas. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(1), 100-102.
- Gaviria, M., Quijano, C., Pino, J., & Madriñán, S. (2011). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Drimys granadensis* Lf. Leaves from Colombia. *Chemistry and Biodiversity*, 8(3), 532-539. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000170>
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., & Yilmaz, I. (2005). Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(1), 27-31. doi: <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2005.27.31>
- Giriwono, P. E., Shirakawa, H., Ohsaki, Y., Hata, S., Kuriyama, H., Sato, S., Goto, T., & Komai, M. (2013). Dietary supplementation with geranylgeraniol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation via inhibition of nuclear factor- κ B activation in rats. *European Journal of Nutrition*, 52(3), 1191-1199. doi: <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0429-y>
- Graça Miguel, M., Nunes, S., Dandle, S. A., Cavaco, A. M., & Antunes, M. D. (2014). Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology*, 34(1), 16-23.
- Graham Solomons, T. W. (2004). *Fundamentos de Química orgánica*. Florida, USA: Limusa.
- Gutiérrez Hernández, E. (2011). *Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de Pasteurella multocida aisladas de conejos*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.
- Hernández, J., Goycoolea, F. M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Domínguez, Z., Robles, R., Vázquez-Moreno, L., Velázquez, E. F., Astiazaran, H., Lugo, E., & Velázquez, C. (2007). Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, 73(14), 1469-1474. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2007-990244>
- Hernández Zárate, M. S., Cerón García, A., Abraham Juárez, M. R., García García, J. D., Chávez Aguayo, V. H., Zarate Castrejón, J. L., & Ávila Ramos, F. (2016). Características físico-químicas y capacidad antioxidante de los propóleos del Estado de Guanajuato. Guanajuato, México: Universidad de Guanajuato, Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato, Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Guanajuato.
- Hernández-Zárate, M. S., Abraham-Juárez, M. R., Cerón-García, A., Gutiérrez-Chávez, A. J., Gutiérrez-Arenas, D. A., & Ávila-Ramos, F. (2017). Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de propóleos

- colectados en Guanajuato, México. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2(2017), 607-612.
- Inoue, Y., Hada, T., Shiraishi, A., Hirose, K., Hamashima, H., & Kobayashi, S. (2005). Biphasic Effects of Geranylgeraniol, Teprone and Phytol on the Growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1770-1774. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1770-1774.2005>
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). (2015). *Enciclopedia de los municipios y delegaciones del Estado de México*. Recuperado el 24 de junio de 2018 de <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15121a.html>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tianguismanalco, Puebla. Clave geoestadística 21175. Recuperado el 24 de junio de 2018 de http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21175.pdf
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., Zu, Y. G., & Liu, X. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(1), 63-68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R. & Sommers, H. M. (2006). *Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color*. México: Médica Panamericana.
- Kumazawa, S., Hamasaki, T., & Nakamaya, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329-339. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Kuppuswamy, K., Jonnalagadda, B., & Arockiasamy, S. (2013). GC-MS analysis of chloroform extract of *Croton bonplandianum*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), 613 - 617.
- Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A. L., Wang, M., Huang, Z., Bécard, J. M., Crauser, D., Slessor, Keith. & Robinson, G. (2004). Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 101(50), 17559-17564. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407652101>
- Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara J. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, 34, 143-154.
- Londoño Orozco, A., Ávila Acevedo, J. G., Canales Martínez, M. M., Hernández Delgado, C. T., Serrano, P. R., Flores Ortíz, C. M., Durán Diaz, A., Penieres Carrillo, J. G., García Tovar, C. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2010). Antibacterial comparative study extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(8), 1250-1254. doi: <http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2010.1250.1254>
- López, A., Ming, D. S., & Neil Towers, G. H. (2002). Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaeifolium*. *Journal of Natural Products*, 65(1), 62-64. doi: <https://doi.org/10.1021/np010410g>
- López-Mejía, O. A., López-Malo, A., & Palou, E. (2014). Capacidad antioxidante de subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(1), 50-58.
- Lotti, C., Campo Fernández, M., Piccinelli, A. L., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., & Rastrelli, L. (2010). Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(4), 2209-2213. doi: <https://doi.org/10.1021/jf100070w>
- Lozina, L., Peichoto, M. E., Acosta, O., & Granero, G. E. (2010). Estandarización y Caracterización organoléptica y físico-química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(01), 102-110.
- Lugo-Sepúlveda, R. E., Martínez-Robinson, K., Morales Ramírez, G., De la Rosa López, R., & Noriega Rodríguez, J. A. (2009). Determinación del Origen Botánico de los Propóleos Sonorenses (CABORCA) Mediante HPLC. *Invurnus*, 4(2), 24-30.
- Machado, C. S., Mokochinski, J. B., Onofre de Lira, T., de Oliveira, F. C. E., Viera Cardoso, M., Guimarães Ferreira, R., Frankland Sawaya, A. C. H., Ferreira, A. G., Pessoa, C., Cuesta-Rubio, O., Chagas Monteiro, M., Soares de Campos, M., & Reyes Torres, Y. (2016). Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-11. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6057650>
- Menna-Barreto, R. F. S., Laranja, G. A. T., Silva, M. C. C., Coelho, M. G. P., Paes, M. C., Oliveira, M. M., & de Castro, S. L. (2008). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major

- bioactive component. *Parasitology Research*, 103(1), 111-117. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0937-0>
- Mora Gil, O. L. (2003). Lauric Acid: Bioactive Component of the Palm Kernel Oil. *Palmas*, 24(1), 79-83.
- Morgado Schmidt, E., Stock, D., García, F. J., Finger, D., Frankland Sawaya, A. C. H., Nogueira Eberlin, M., Felsner, M. L., Quináia, S. P., Chagas Monteiro, M., & Reyes Torres, Y. (2014). A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. *BioMed Research International*, 2014, 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/257617>
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061-1066. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.06.018>
- Muhammad, I., El Sayed, K. A., Mossa, J. S., Al-Said, M. S., El-Ferally, F. S., Clark, A. M., Hufford, C. D., Oh, S., & Mayer, M. S. A. (2000). Bioactive 12-Oleanene triterpene and secotriterpene acids from *Maytenus undata*. *Journal of Natural Products*, 63(5), 605-610. doi: <https://doi.org/10.1021/np990456y>
- Naggara, Y. A., Sunb, J., Robertson, A., Giesyb, J. P., & Wiseman, S. (2016). Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian propolis. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 305-314. doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1233700>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018). National Library of Medicine: MESH Database. Recuperado el 22 de agosto de 2018. Enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010626>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2018). PubChem Database. CID=5373026, Recuperado el 22 de agosto de 2018.
- National Institute of Standards and Technology U.S. Department of Commerce (NIST). (2011). *Chemistry WebBook of NIST*. Recuperado el 22 de agosto de 2018. Enlace: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Naughton, S. S., Hanson, E. D., Mathai, M. L., & McAinch, A. J. (2018). The Acute Effect of Oleic-or Linoleic Acid-Containing Meals on Appetite and Metabolic Markers; A Pilot Study in Overweight or Obese Individuals. *Nutrients*, 10(10), 1-17. doi: <https://doi.org/10.3390/nu10101376>
- Ormeño, E., & Fernández, C. (2012). Los terpenos de las plantas. *Investigación y ciencia*, 428 (1), 62-69.
- Palomino García, L. R., Martínez Galán, J. P., García Pajón, C. M., Gil González, J. H., & Durango Restrepo, D. L. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1), 5373-5383. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/rfnam>
- Panché, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(e47): 1-15. doi: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Peña, R. C. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 17-26. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202008000100002>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81. doi: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5018.1840>
- Pino Benítez, N., Meléndez, E., & Stashenko, E. E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4):301-304.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Rosado, M. E., Guzmán-Marín, E., Acosta-Viana, K. Y., Giménez-Turba, A., Salamanca, E., & Peña-Rodríguez, L. M. (2013). Synergistic Effect of Lupenone and Caryophyllene Oxide against *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/435398>
- Probst, I. S., Sforcin, J. M., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., & Fernandes, J. A. (2011). Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(2), 159-167. doi: 1 <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992011000200006>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. doi: <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>

- 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-Sánchez, T. A. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), 22-26. doi: [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70006-8](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70006-8)
- Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Bernal, A., Ramírez Maldonado, N., & Martínez-Hernández, E. (2016). Análisis palinológico de mieles y cargas de polen de *Apis mellifera* (apidae) de la región centro y norte del Estado de Guerrero, México. *Botanical Sciences, Taxonomía y Florística*, 94(1), 141-156. doi: <https://doi.org/10.17129/botsci.217>
- Rasul, A., Millimouno, F. M., Eltayb, W. A., Ali, M., Li, J., & Li, X. (2013). Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International*, 2013, 1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/379850>
- Rex, J. H., Ghannoum, M. A., Andes, D., Brown, S. D., Diekema, D. J., Espinel-ingroff, A., Fowler, C. L., Johnson, E. M., Knapp, C. C., Motyl, M. R., Ostrosky-Zeichner, L., Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Walsh, T. J. (2009). M44-A2, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 29(17), 1-23. Recuperado el 26 de febrero de 2018.
- Rivera-Yáñez, C. R., Terrazas, L. I., Jiménez-Estrada, M., Campos, J. E., Flores-Ortiz, C. M., Hernández, L. B., Cruz-Sánchez, T., Garrido-Fariña, G. I., Rodríguez-Monroy, M. A., & Canales-Martínez, M. M. (2017). Anti-*Candida* Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene-An *In Vitro* Study. *Molecules*, 22(12), 1-13. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22122095>
- Rodríguez, R. B. (2015). *Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.
- Ruzin, A., & Novick, R. P. (2000). Equivalence of Lauric Acid and Glycerol Monolaurate as Inhibitors of Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2668-2671. doi: <https://doi.org/10.1128/jb.182.9.2668-2671.2000>
- Salamanca Grosso, G., Correa Carvajal, I. L., & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25(2), 95-102.
- Sanhueza, C. J., Nieto, K. S., & Valenzuela, B. A. (2002). Ácido linoleíco conjugado: un ácido graso con isomería trans potencialmente beneficioso. *Revista Chilena de Nutrición*, 29(2), 98-105. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182002000200004>
- Santiago, L. A., & Mayor, A. B. (2014). Lupeol: An antioxidant triterpene in *Ficus pseudopalma* Blanco (Moraceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2): 109-118. doi: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60218-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60218-5)
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F. J., & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection*, 68(4), 790-795. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.790>
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>
- Shimizu, T., Lin, F., Hasegawa, M., Nojiri, H., Yamane, H., & Okada, K. (2012). The potential bioproduction of the pharmaceutical agent sakuranetin, a flavonoid phytoalexin in rice. *Bioengineered*, 3(6), 352-357. doi: <https://doi.org/10.4161/bioe.21546>
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-29. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/206439>
- Sitarek, P., Rijo, P., Garcia, C., Skała, E., Kalembera, D., Białas, A. J., Szemraj, J., Pytel, D., Toma, M., Wysokińska, H., & Śliwiński, T. (2017). Antibacterial, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Essential Oils from Hairy and Normal Roots of *Leonurus sibiricus* L. and Their Chemical Composition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-12. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/7384061>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. USA: Cengage Learning Editores.
- Sosa-López, A. A., Cabrera, M. G., & Álvarez, M. Y. (2016). Vegetación de origen como parámetro de caracterización microbiana de los propóleos. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(1), 3-23.

- Soto-Vásquez, M. R. (2015). Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. In *Crescendo Institucional*, 6(2), 22-32. doi: <https://doi.org/10.21895/inres.2015.v6n2.03>
- Stasiuk, M., Bartosiewicz, D., & Kozubek, A. (2008). Inhibitory effect of some natural and semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. *Food Chemistry*, 108(3), 996-1001. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.011>
- Talla, E., Dabole, B., Taiwe, G. S., Ngo Bum, E., Mbafor, J. T., Atchade, A. D. T., Malik, R., Zulfiqar, A., Sidiki, N., Nguimbou, R. M., & Choudhary, M. I. (2013). Antinociceptive Pentacyclic Triterpenoids from the Cameroonian Brown Propolis. *Pharmacología*, 4(3), 218- 227. doi: <http://dx.doi.org/10.5567/pharmacologia.2013.218.227>
- Teles, F., Machado da Silva, T., Pessoa de Cruz Junior, F., Honorato, V. H., de Oliveira Costa, H., Fernandes Barbosa, A. P., Gomes de Oliveira, S., Porfirio, Z., Braga Lobório, A., Lerner Borges, R., & Fanelli, C. (2015). Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation Model. *Plos One*, 10(1), 1-15. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116535>
- Tolosa, L., & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43(1-2), 187-204.
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(13), 1-4. doi: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-1-13>
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A. F., Vallejo-Galland, B., Torres-Llanez, M. J., & Sánchez-Escalante, A. (2014a). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patties. *Journal of Food Science*, 79(8), 1499-1504. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.12533>
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez-Escalante, J. J., Peñalba-Garmendia, M. C., & Sánchez-Escalante, A. (2014b). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotecnia*, 16(1), 32-37. doi: <http://dx.doi.org/10.18633/bt.v16i1.31>
- Vargas-Sánchez, R. D., Peñalba-Garmendia, M. C., Sánchez-Escalante, J. J., Torrescano-Urrutia, G. R., & Sánchez-Escalante, A. (2016). Pollen profile of propolis produced on the eastern edge of the Sonoran desert in central Sonora, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 114, 69-86. doi: <https://doi.org/10.21829/abm114.2016.1103>
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Ángulo, A., Domínguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F. M., Velázquez, E. F., Astiazaran, H., & Hernández, J. (2007). Antibacterial and free radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1747-1756. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x>
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2015). Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132-49. doi: <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>
- Yáñez Rueda, X., & Cuadro Mogollón, O. F. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 52-61. doi: <https://doi.org/10.24054/16927125.v1.n1.2013.497>
- Zavaleta, J., Muñoz, A. M., Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C., & Loja, B. (2005). Capacidad antioxidant y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Acta Médica Sanmartiniana*, 1(1), 81-85.
- Zhang, X., Xiong, H., & Liu, L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 206-211. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.020>