

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Análisis del Efecto de la Temporalización Sobre el Origen Botánico, La
Composición Química y Actividades Biológicas de Propóleos de Ures,
Sonora



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Jesús Efraín Alday Noriega

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



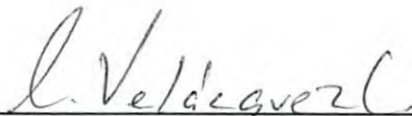
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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

FORMA DE APROBACIÓN

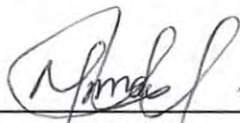
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Jesús Efraín Alday Noriega**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



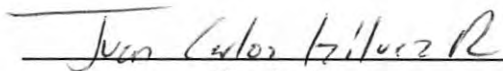
Director Académico
Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras



Secretario
Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda



Vocal
M.C. Moisés Navarro Navarro



Suplente
Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A ÉL que me ha dado todo, me ha rodeado de tanta gente buena, noble y sabia.

A mis Padres Efraín Alday Terán y Martha Noriega Shugert y a mis hermanos Juan Francisco y Martha Carolina por su gran apoyo, confianza, amor y sabiduría a lo largo de mi vida.

A mis Abuelos Hilda Shugert, José Alday y Delfina Terán, y a toda su progenie que ha sido mi familia y gran apoyo.

A la Universidad de Sonora, por el apoyo y la valiosa educación que me ha brindado a lo largo de estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los recursos y materiales otorgados.

A mi director de Tesis, el Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras por su invaluable ayuda y confianza.

A mi comité, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, M.C. Moisés Navarro Navarro y Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz por su preciada contribución al desarrollo de este trabajo.

Al Profesor Luca Rastrelli, por su gran apoyo, disponibilidad y cooperación en este proyecto.

Al Laboratorio di Idrologia e Chimica degli Alimenti e Integratori Alimentari, Università degli Studi di Salerno.

A la M.C. Lucila Rascón Durán y a la M.C. Martha Judith Valdéz por su eterna disposición, por facilitar mi formación y los recursos necesarios para ella.

A la M.C. Karla Martínez Robinson por su gran apoyo y participación en el proyecto y al Dr. Jaime Lizardi ambos del laboratorio de Biopolímero de CIAD.

Al Dr. Humberto Astiazarán García, por su apoyo y colaboración.

A mis grandes compañeros de trabajo, Dora Edith Valencia, Jael Quintero, Jorge Alberto Becerra, Ivonne Niño, Davisela Sierras, Samuel Alday, Paola Gastélum, Zuilma, Adriana Santeliz, Wenceslao Coronado, Carolina Figueroa, Iride Paolillo, Giulia Di Lione, Lilián Carrasco, Rita Celano, Christian D'Indio, Annalisa Piccinelli, Sergio Morales, Francesca Gentile, Vanessa Hernández, Mario Peralta, Lulú, Alejandra Valdéz, Lucía, Luisa Rascón, Iván Rivero y Diego Monge por su apoyo, diversión y conocimiento.

A mis amigos Daniela Sáenz, Ramiro Airola, Jorge Becerra, Alejandra Muñoz, Ingrid Melo, Marycruz Hernández, Alicia Encinas por su amor, comprensión, diversión y paz.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
OBJETIVOS	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Productos Naturales y Metabolitos Secundarios	4
Clases de Metabolitos Secundarios	5
Productos Naturales y su Utilización Farmacéutica como Anticancerígenos	7
El Cáncer	8
Propóleos	9
Tricomas y Recolección de Sustancias por las Abejas	10
Propóleos: Un Producto de Origen Vegetal y Animal	10
Características y Composición Química de Propóleos	11
Flavonoides: Sustancias Identificadas en Propóleos	16
Actividades Biológicas de los Propóleos	19
Actividad Antiproliferativa de Propóleos	21
Propóleos: Origen Botánico y Escenario Actual	23

Caracterización Química y Biológica de Propóleos Sonorenses	24
Características de la Flora del Desierto de Sonora	26
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Recolección de Propóleos y Obtención de Extractos Metanólicos	29
Recolección de Especies Botánicas	31
Obtención de Extractos Metanólicos Para Especies Vegetales	31
Obtención de Extractos de Resinas Vegetales por Inmersión	34
Obtención del Perfil Químico	35
Caracterización Química	35
Aislamiento y Purificación de Compuestos de Extractos de Propóleos	35
Análisis por HPLC-MS-Q-TOF de Muestras de Propóleos, Fracciones y Constituyentes Químicos Aislados	36
Determinación de Estructuras Moleculares de Compuestos Aislados por RMN	38
Determinación de la Capacidad Estabilizadora de Radicales Libres (Actividad Antioxidante)	39
Actividad Antiproliferativa <i>in vitro</i>	39
Líneas Celulares	39
Evaluación de actividad Antiproliferativa <i>in vitro</i>	40
Análisis Estadístico	41
RESULTADOS	42
Características Físicas y Rendimientos de Extracción Obtenidos	42

Propóleos	42
Especies Vegetales y su Extracción Metanólica	42
Las Especies Vegetales Exudan Resinas Todo el Año	45
La composición de Propóleos de Ures, Sonora es Conservada Durante las Cuatro Estaciones del Año	47
<i>Populus fremontii</i> es la Principal Fuente Botánica de Propóleos de Ures, Sonora Durante las Cuatro Estaciones del Año	51
Caracterización Química de Propóleos de Ures, Sonora	54
Compuestos Químicos Identificados en Propóleos con HPLC-MS-Q-TOF	54
Caracterización Química de Constituyentes Presentes en Propóleos por RMN	57
Caracterización Espectroscópica de Pinobanksina-3-o-butirato	66
Actividad antioxidante	74
Actividad Antiproliferativa	75
La Temporalización Tiene un Efecto Sobre la Actividad Antiproliferativa de Propóleos de Ures, Sonora	75
Los Propóleos Elaborados en Invierno y Primavera Inducen Cambios Morfológicos Característicos en la Línea Celular M12A ^k .C3.F6	77
Los Extractos de Especies Vegetales de Ures, Sonora Presentan Efecto Antiproliferativo	78
Las Resinas Vegetales Presentan Actividad Antiproliferativa Todo el Año	80
Las Fracción 4 de Propóleos Posee un Elevado Efecto Antiproliferativo e induce Cambios Morfológicos	83

Los Constituyentes Químicos Caracterizados y Purificados de los Propóleos de Ures, Sonora Presentan Actividad Antiproliferativa	83
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	98
REFERENCIAS	99
APÉNDICES	108

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Composición Química de propóleos.	13
II.	Recolección de especies vegetales y su identificación taxonómica	32
III.	Recolección de propóleos en el período 2009 – 2010 y sus características físicas, rendimiento de extracción y contenido porcentual de ceras de propóleos	43
IV.	Rendimientos de extracción por el método convencional para las especies vegetales	44
V.	Extracción de resinas y exudados de especies vegetales en otoño por inmersión en diclorometano	46
VI.	Abundancia relativa (%) de los constituyentes identificados en muestras estacionales de propóleos de Ures, Sonora.	50
VII.	Fraccionamiento cromatográfico en Sephadex LH-20 para muestras de propóleos de invierno	56
VIII.	Compuestos caracterizados de propóleos de Ures, Sonora	65
IX.	Actividad antiproliferativa de propóleos de Ures, Sonora período 2009-2010 expresada en términos de IC ₅₀ .	76
X.	Actividad antiproliferativa de propóleos de Ures, Sonora período 2008-2009 expresada en términos de IC ₅₀ .	76
XI.	Actividad antiproliferativa de extractos metanólicos convencionales de especies vegetales reportada en IC ₅₀	79
XII.	Actividad antiproliferativa reportada en IC ₅₀ para las resinas de cada especie vegetal en las diferentes	

	estaciones anuales durante el período 2009-2010	83
XIII.	Actividad antiproliferativa reportada en IC_{50} para las resinas vegetales en la Línea Celular L-929	84
XXI.	Actividad antiproliferativa para las fracciones cromatográficas de propóleos de Ures, Sonora reportada en IC_{50} .	86
XXII.	Actividad antiproliferativa para los compuestos químicos de propóleos de Ures, Sonora reportada en IC_{50} .	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructuras genéricas de los principales flavonoides	17
2.	Esquema general de metodología	30
3.	Especies vegetales colectadas que comprenden la flora nativa de la región "El Coyote" en el municipio de Ures, Sonora	33
4.	Cromatogramas de extractos de propóleos de Ures, Sonora colectados durante el período 2009-2010.	48
5.	Cromatogramas de extractos de propóleos de Ures, Sonora colectados durante el período 2008-2009	49
6.	<i>Perfiles cromatográficos obtenidos con un detector a 340 nm de extractos de especies botánicas por inmersión.</i>	51
7.	Comparación del perfil químico de propóleos y de resinas extraídas de <i>P.fremontii</i>	52
8.	Cromatograma obtenido en HPLC-MS-Q-TOF para propóleos recolectados en invierno.	54
9.	Compuestos identificados presentes en la fracción 4 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.	58
10.	Compuestos identificados presentes en la fracción 5 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.	59
11.	Compuestos identificados presentes en la fracción 6 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.	60

12.	Compuestos identificados presentes en la fracción 7 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.	61
13.	Compuestos identificados presentes en la fracción 8 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.	62
14.	Compuestos identificados presentes en la fracción 9 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.	63
15.	Compuestos identificados presentes en la fracción 10 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.	64
16.	Caracterización de pinobanksina-3-O-butirato. Espectro ^1H 600 MHz RMN.	67
17.	Espectros bidimensionales de pinobanksina-3-O-butirato	69
18.	Patrón de fragmentación de pinobanksina-3-O-butirato.	71
19.	Patrón de fragmentación de pinobanksina-3-O-butirato.	72
20.	Estructura de pinobanksina-3-O-butirato.	73
21.	Diseño esquemático de la colecta y utilización de propóleos por las abejas según Popravko (1976) y P. Marchenay (1978).	89
22.	Esquema de biosíntesis de flavonoides en especies de <i>Populus spp.</i>	92

OBJETIVOS

General

Analizar el efecto de la temporalización sobre el origen botánico, constitución química y actividades biológicas de antiproliferativa de propóleos recolectados en Ures, Sonora.

Particulares

- Obtener el perfil químico de extractos metanólicos de propóleos y resinas provenientes de especies botánicas ubicadas en las áreas circundantes a las colmenas durante las cuatro estaciones del año en el período 2009-2010.
- Incrementar el conocimiento en la composición química de propóleos de Ures, Sonora purificando y caracterizando sus constituyentes por medio de técnicas espectrométricas.
- Evaluar las actividades biológicas (antiproliferativa y antioxidante) de extractos metanólicos de propóleos de Ures, Sonora, de sus constituyentes químicos y de resinas vegetales asociadas a su origen botánico.
- Determinar el origen botánico de los propóleos de Ures, Sonora, evaluar el efecto de la temporalización sobre el mismo, su composición química y sus actividades biológicas.

RESUMEN

Los propóleos son un material resinoso y céreo con una composición química compleja, el cual es elaborado por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de la recolección de exudados y secreciones de tallos, hojas y brotes de ciertas especies vegetales. Previamente se han realizado estudios encaminados a caracterizar química y biológicamente propóleos de diferentes regiones del estado de Sonora. La finalidad de este estudio fue analizar el efecto de la temporalización sobre el origen botánico, la composición química y actividades biológicas de propóleos de Ures, Sonora. Para lo anterior, se colectaron muestras de propóleos, así como los exudados de 10 plantas nativas presentes alrededor de las colmenas (29°27'81"N; 110°23'398"W) durante el período 2009-2010. Se realizó la extracción de las muestras con metanol., se analizó el perfil químico de los extractos mediante RP-HPLC, HPLC-MS-Q-TOF, y RMN, adicionalmente se efectuó la purificación de sus constituyentes químicos. Posteriormente se evaluaron las actividades biológicas de los extractos de propóleos, sus constituyentes y las resinas vegetales, determinándose la actividad antioxidante por el método del radical DPPH, y la actividad antiproliferativa (AAP) sobre la línea celular cancerosa M12A^k.C3F6 (linfoma de células B murino) por el método colorimétrico de MTT. El perfil químico de los propóleos de Ures, Sonora en las cuatro estaciones fue muy similar al de las resinas de *Populus fremontii*, sugiriendo que *P. fremontii* es la fuente botánica principal de los propóleos estudiados durante todo el año. Los propóleos de primavera ($8.1 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$) e invierno ($10.71 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$) mostraron una elevada AAP, así como la capacidad de generar cambios morfológicos característicos a los generados por colchicina, indicando un posible mecanismo de acción. Se identificaron 20 constituyentes químicos por HPLC-MS-Q-TOF, de los cuales se purificaron y caracterizaron trece por RMN, entre ellos toda una familia de ésteres de pinobanksina previamente no descrita en estos propóleos.

Ninguno de los trece constituyentes purificados mostró optimizar la IC₅₀ de los propóleos de primavera o invierno. Cuatro extractos de resinas vegetales mostraron una AAP significativa: *Ambrosia ambrosioides* (IC₅₀: 0.2 ± 0.1 µg/mL), *Populus fremontii* (IC₅₀: 29.6 ± 5.6 µg/mL), *Prosopis velutina* (IC₅₀: 31.85 ± 1.79 µg/mL) y *Bursera laxiflora* (IC₅₀: 62.5 ± 9.5 µg/mL). Las resinas estacionales de *P. fremontii* no optimizaron la IC₅₀ de los propóleos de primavera o invierno, mientras que las resinas de *A. ambrosioides* y *B. laxiflora* provenientes de las cuatro estaciones generaron cambios morfológicos similares a los inducidos por los propóleos y colchicina. En cuanto a la actividad antioxidante las resinas de *P. fremontii* exhibieron mayor actividad que los propóleos de cualquiera de las estaciones. Los datos anteriores indican que a pesar de la similitud en los perfiles químicos de las muestras de propóleos y las resinas de *P. fremontii*, las actividades biológicas son distintas, situación debida a la participación de resinas de otra especie vegetal adicional como *A. ambrosioides* en la elaboración de propóleos. Es necesario continuar estudiando la composición química de las muestras para identificar a los constituyentes responsables de las actividades biológicas, así como determinar el mecanismo de acción bajo el cual ejercen su efecto antiproliferativo.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son compuestos orgánicos sintetizados por los sistemas biológicos, compuestos que se encuentran con una distribución taxonómicamente limitada y generalmente se asocia su presencia a la concesión de ventajas para la supervivencia de los organismos que los sintetizan (Hanson, 2003; Morrissey, 2009). La utilización de productos naturales y sus derivados como agentes terapéuticos ha sido históricamente invaluable para las sociedades humanas (Koehn y col., 2005; Mann 2002). La medicina tradicional y la práctica reciente de alternativas naturales ha venido direccionando un interés cada vez mayor sobre los productos apícolas, como la miel, la jalea real y los propóleos, entre otros, los cuales son productos naturales en su materia prima y de origen animal (abejas) en su manufacturación. Particularmente los propóleos, en su forma como extractos, han sido centro de atención de múltiples estudios científicos enfocados a determinar la composición química responsable de su amplio espectro de actividades biológicas, esto con una finalidad farmacéutica (Valant-Vetschera y col., 2006, Bankova y col., 2000, Bankova y col., 2002).

Los propóleos son una resina elaborada por las abejas a partir de la colección de exudados ricos en metabolitos secundarios producidos por ciertas plantas, estos compuestos disponibles en las especies vegetales le otorgan a los propóleos las propiedades biológicas que los caracterizan, las cuales comprenden un amplio y diverso rango, yendo desde una actividad anestésica (Marcucci 1995), anticariogénica (Bozcuk-Erdem y col., 2004), antiinflamatoria (Bankova y col., 2000; Burdock, 1998; Lofty, 2006; Marcucci, 1995) y cicatrizante (Adewumi y col., 2011), hasta abarcar una actividad antimicrobiana (Bankova et al. 1995, Miorin y col., 2003, Velazquez y col., 2007, Marcucci 1995, Bankova y col., 2000), antiviral (Marcucci, 1995), antifúngica (Marcucci, 1995; Ota y col., 2000), anticancerígena (Bankova y col., 2000, Hernandez y col., 2007, Marcucci 1995), antimutagénica (Burdock, 1998, Marcucci, 1995), inmunomoduladora

No está en las referencias

(Sforcin 2007) y antiparasitaria (Freitas y col., 2006, Prytyk y col., 2003), entre otras.

En la actualidad, diversos estudios de caracterización química han identificado que entre los principales constituyentes químicos de propóleos con distinto origen geográfico se encuentran: flavonoides, ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes, aldehídos y terpenos (Bankova 2005, Falcao y col., 2010, Usia y col., 2002, Hernandez y col., 2007). Sin embargo, el perfil de composición química, así como la abundancia relativa de los compuestos, y por consecuencia las propiedades biológicas de los propóleos son altamente variables y dependen estrictamente del lugar en el que se realice la colecta de los mismos. Pues, debido a la presencia de diferentes exudados y secreciones en especies vegetales pertenecientes a diversos ecosistemas (Salatino y col., 2005, Teixeira y col., 2005, Teixeira y col., 2010, Lotti y col., 2010, Bankova, 2005). Por esta razón, es necesario tener en mente la fuente botánica de los propóleos, así como las condiciones geográficas y climáticas del lugar para comprender el origen de las diferencias en su composición química.

*Que sea
incompleta
la idea
agrega el
punto*

El interés actual por determinar el origen botánico de los propóleos de diversas regiones del mundo surge con la finalidad de conocer la flora que le confiere propiedades biológicas, así como los compuestos químicos responsables de ellas. De igual manera, la presencia de compuestos de cierto origen floral en los propóleos permite su utilización como trazadores que favorecen en la certificación y garantía del lugar de producción de los propóleos (Bankova y col., 2000).

En México, hay pocos estudios relacionados con la caracterización química y biológica de propóleos es muy reducida, dado que existen pocos reportes científicos al respecto (Hernandez y col. 2007, Lotti y col., 2010, Velazquez y col. 2007; Valencia col., 2012). Previamente se ha reportado que los propóleos colectados en diferentes regiones del Estado de Sonora (Caborca, Pueblo de Álamos y Ures) poseen importantes actividades biológicas como son:

*Reeditar
oración*

antiproliferativa (Hernández y col., 2007), antibacteriana y antioxidante (Velázquez y col., 2007). Asimismo, entre los constituyentes más abundantes de los propóleos sonorenses se encontraron pinocembrina, pinobanksina-3-O-acetato y crisina (Hernández y col., 2007). Estudios recientes han estado enfocados en el efecto que tiene el periodo de recolección de los propóleos (temporalización) sobre la composición química y las actividades biológicas de propóleos provenientes de Ures, Sonora, México, obteniéndose un perfil cromatográfico que permanece estable en las muestras de diferentes estaciones, lo que refleja una composición química conservada desde el punto de vista cualitativo. Estos resultados sugieren que las abejas colectan exudados a partir de especies vegetales que se encuentran en abundancia y con suma disponibilidad durante todo el año en la región de Ures, Sonora, México (Valencia y col., 2012).

Debido a lo anterior, el presente estudio tuvo como finalidad determinar el origen botánico de propóleos de Ures, Sonora y analizar el efecto de la temporalización sobre la fuente botánica, la composición química y actividades biológicas de estos propóleos por un período que comprendió las cuatro estaciones del año. Adicionalmente se incluyó la evaluación de la actividad antiproliferativa de los compuestos purificados y caracterizados de propóleos en líneas celulares cancerosas. El conocimiento generado por este trabajo podría incidir significativamente en la estandarización de los propóleos de Ures, Sonora, autenticando la fuente botánica a partir de los constituyentes químicos presentes, favoreciendo a la calidad del producto. Estos propóleos pueden eventualmente ser una fuente de alternativas terapéuticas en el tratamiento contra el cáncer.

ANTECEDENTES

Productos Naturales y Metabolitos Secundarios

Los productos naturales son compuestos orgánicos sintetizados por los organismos vivos con múltiples propósitos, entre ellos el de la supervivencia. Todos los organismos poseen la capacidad de transformar e interconvertir un diverso grupo de compuestos orgánicos e inorgánicos con el fin de utilizarlos como fuente de energía y como moléculas de construcción para estructuras celulares. Los compuestos cuya presencia es ubicua en todos los organismos y juegan un papel central en el metabolismo y reproducción son conocidos como *metabolitos primarios*, comprendidos por aminoácidos, ácidos grasos, nucleósidos y carbohidratos (Hanson, 2003; Morrissey, 2009).

Mientras que el papel de los metabolitos primarios para la supervivencia de las especies es evidente, la razón por la cual la presencia de ciertos compuestos sin un papel aparente en la economía interna de los organismos no está del todo clara. Estas pequeñas moléculas de composición orgánica con una diversidad estructural y con una distribución taxonómicamente limitada entre las especies son los *metabolitos secundarios*, los cuales se consideran capaces de proporcionar ventajas en la supervivencia de los organismos que los sintetizan. Los organismos que no poseen un sistema inmunológico como las plantas, hongos, algas o microorganismos generalmente muestran una alta abundancia en estos compuestos. El término productos naturales es usualmente empleado de manera intercambiable con el concepto de metabolitos secundarios, los cuales han atraído el interés debido a sus efectos biológicos en otros organismos (Hanson, 2003). Existen varios programas para la detección de compuestos bioactivos en múltiples especies, los cuales han permitido el desarrollo de nuevos fármacos, como el taxol, compuesto ampliamente utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Boik, 2001). Los productos naturales muy frecuentemente tienen un papel ecológico en la regulación de las

interacciones entre plantas, microorganismos, insectos y animales. Éstos pueden ser sustancias empleadas para defensa, con la finalidad de ahuyentar a los organismos predadores, o para favorecer la reproducción y distribución de la especie por medio de la atracción de insectos polinizadores, también estas moléculas biológicas juegan un papel en la comunicación química actuando como feromonas (Morrissey, 2009).

Específicamente en las plantas, los metabolitos secundarios poseen también múltiples actividades biológicas que les confieren protección contra patógenos, siendo estos compuestos capaces de inhibir enzimas implicadas en la proliferación de hongos y bacterias. Está reportado el efecto antiparasitario de compuestos como las lactonas sesquiterpénicas, y el efecto anticancerígeno de los terpenoides. Es por esto que los metabolitos secundarios son útiles en el diseño de agentes terapéuticos contra múltiples enfermedades (Morrissey, 2009).

Las diversas fuentes botánicas que producen y almacenan estos compuestos denominados metabolitos secundarios pueden proporcionar información útil para trazar las relaciones evolutivas en el reino de las plantas, utilizando como marcadores biológicos los compuestos derivados de su metabolismo, los cuales son de biosíntesis restringida entre las especies. El concepto de quimiotaxonomía, el cual hace referencia a la similitud en biosíntesis química en especies relacionadas genéticamente, proporciona otra razón de peso para llevar a cabo la examinación de los productos metabólicos de las plantas, la importancia que éstos tienen para la especie que los sintetiza y su importancia biológica en otras especies (Hanson, 2003).

Clases de Metabolitos Secundarios

Las estructuras químicas de los metabolitos secundarios son desconcertantemente diversas, sin embargo, la mayoría de estos compuestos

pertenecen a una familia. Cada familia de compuestos posee características particulares derivadas de la manera en la que son biosintetizadas, es decir construidas en la naturaleza. Las clases de metabolitos secundarios son:

- Policétidos y ácidos grasos
- Terpenoides y esteroides
- Fenilpropanoides
- Alcaloides
- Carbohidratos especializados

En cuanto a sus características, los policétidos están formados por la condensación lineal de unidades de acetato, las cuales son derivadas de Acetil-Coenzima A. Los terpenoides y esteroides son ensamblados en la naturaleza a partir de isoprenoides derivados de isopentenil pirofosfato, compuestos de 5 carbonos que se enlazan a manera de cabeza-cola y tienen una estructura ramificada característica (Hanson, 2003; Morrissey, 2009). Los fenilpropanoides son compuestos aromáticos que poseen una cadena de tres carbonos unida al anillo, y éstos son los precursores de los flavonoides. Los aminoácidos son los monómeros de construcción para péptidos y proteínas, sin embargo existen aminoácidos inusuales restringidos a ciertas especies, éstos aminoácidos dan lugar a la formación de compuestos con actividades biológicas relevantes como la penicilina, un agente antimicrobiano. Los alcaloides son un grupo diverso de productos naturales que contienen nitrógeno. Las porciones nitrogenadas de los alcaloides están derivadas de aminoácidos como ornitina, lisina, tirosina y triptófano. Aunque los carbohidratos como la glucosa son metabolitos primarios típicos, existen otros carbohidratos con distribución restringida en ciertas especies, algunos de estos carbohidratos poco comunes están unidos a otros productos naturales como parte glucósida. La porción que no es carbohidrato en la molécula es conocida como aglicona, y puede ser un terpenoide, alcaloide o policétido (Boik, 2001; Hanson, 2003; Morrissey, 2009).

Productos Naturales y su Utilización Farmacéutica Como Anticancerígenos

La utilización de productos naturales con finalidad terapéutica es sumamente antigua. El empleo de productos naturales en la medicina, especialmente provenientes de plantas, se remonta a la civilización Sumeria, considerada la primera y más antigua civilización del mundo, donde estos productos jugaron un papel prominente en los sistemas de medicina tradicional, y aun en nuestros días continúan siendo importantes, pues el desarrollo de la medicina moderna conllevó al perfeccionamiento de fármacos efectivos sintetizados a partir de precursores obtenidos de plantas medicinales (Sarker y col., 2006; Lee, 1999).

La gran mayoría de los agentes farmacéuticos utilizados en padecimientos tales como el cáncer tienen su origen, de una u otra manera, a partir de fuentes naturales. Hoy en día, el interés por los productos naturales en la síntesis de fármacos se ha incrementado. En el año de 1961, nueve compuestos derivados de plantas fueron aprobados para su utilización como agentes anticancerígenos, siendo vinblastina, vincristina, vinorelbina, etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, topotecan e irinotecan (Lee, 1999).

Se ha estimado que más del 40% de los medicamentos actuales tiene su origen en los productos naturales (Hanson, 2003), y más del 60% de los fármacos anticancerígenos recientes son prueba fehaciente de ello, sin embargo su selectividad hasta el momento no es del todo apropiada (Gordon, 2009; Herrera y col., 2003). En el presente, las estrategias en el diseño de fármacos con actividad anticancerígena tienen como enfoque los eventos particulares de las células cancerosas. Eventos tales como la expresión genética anormal, pérdida de la capacidad de regulación en proliferación celular, así como la alterada transducción de la señalización, los cuales son blancos de acción para ciertos compuestos obtenidos de fuentes naturales (Boik, 2001, Kawabe, 2004; Teicher, 2008). Generándose así, un interés global por dilucidar el mecanismo de acción mediante el cual ejercen su actividad anticancerígena ciertos

productos naturales y en propóleos provenientes de diversas regiones tanto del país como del mundo, con la finalidad de realizar el aislamiento y caracterización de compuestos con actividades biológicas, así como a partir de ellos generar la síntesis de análogos químicos en el laboratorio.

El Cáncer

El cáncer, es un padecimiento que se caracteriza por ser una alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular en un determinado tejido (Alonso y col., 2006; Koehn y col., 2005), siendo el resultado de múltiples alteraciones genéticas sucesivas que confieren a las células transformadas particularidades como: la capacidad de crecimiento autónomo, evasión de apoptosis, insensibilidad a señales antiproliferativas y capacidad de invasión tisular, entre otras que las distinguen de las células normales del organismo (Anand y col., 2008).

Cada célula en el organismo está programada para vivir un período determinado de tiempo, cuando esta célula llega a su tiempo de vida máxima y al número de divisiones celulares necesarias, se desencadena un tipo de muerte tisularmente discreta denominada apoptosis. Todas las células en el organismo se encuentran en comunicación, lo que permite la adecuada renovación de los tejidos cuando acontece la muerte por apoptosis. Esta comunicación es necesaria para múltiples procesos, y puede ocurrir indirectamente a través de compuestos mensajeros como hormonas, factores de crecimiento, o también directa a través de contacto célula a célula. La comunicación permite a las células responder de acuerdo a los requerimientos del tejido y organismo, requerimientos como la proliferación celular cuando se necesita de nuevas células en dicho tejido, así como también detener dicha proliferación cuando se han generado suficientes células nuevas (Alberts, 2008; Boik, 2001).

Propóleos

Dentro de los productos naturales estudiados con actividades biológicas importantes, destacan los propóleos, los cuales son una mezcla resinosa de carácter natural producida de manera bioselectiva por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de la recolección de exudados formulados por estructuras particulares de diversas fuentes vegetales (Bankova, 2005; Isla y col., 2005; Kumazawa y col., 2003; Shigenori y col., 2003(a); Shigenori y col., 2008(b); Velázquez y col., 2007).

Las abejas recolectan con sus mandíbulas partículas resinosas y aceites aromáticos exudados por brotes, yemas y tallos de diferentes plantas, así como también recolectan estas resinas a partir de glándulas localizadas superficialmente en las hojas de ciertas especies vegetales, glándulas como lo son tricomas. (Bankova y col., 2005; Shigenori y col., 2003(a); Shigenori y col., 2008(b); y col., 2006; Valant-Vetschera y col., 2006). Una vez en el interior de la colmena, las abejas mezclan estas sustancias colectadas con cera y secreciones salivales para obtener los propóleos (Bankova y col., 2005; Boukraâ y col., 2009; Gardana y col., 2007; Shigenori y col., 2003(a); Shigenori y col., 2008(b)).

Para elaborar sus productos como la miel, la jalea real y los propóleos, las abejas deben localizar la materia prima en fuentes vegetales. Para ello, las abejas obreras recorren grandes distancias, viajando hasta 12 km o más a partir de la colmena (Ratnieks, 2000). Cuando la abeja obrera encuentra esta fuente vegetal regresa a la colmena e indica a las otras abejas obreras su localización por medio de un estilo de comunicación corporal basado en una danza agitada (*waggled dance*), la cual se observa como una figura semejante a la forma del número ocho. (Munz., 2005; Sama y col., 2004).

Sin embargo, estudios realizados en sus inicios por Karl Von Frisch, quien comenzó a decodificar el lenguaje de la danza agitada de las abejas, e

investigaciones recientes reportan que las abejas obreras principalmente ejecutan esta danza para expresar la presencia de alimento y recursos en una distancia menor a 2 km (Dyer, 2002; Frisch, 1982; Ratnieks, 2000).

Tricomas y Recolección de Sustancias por las Abejas

Los tricomas son glándulas presentes en ciertas plantas que contienen y secretan de manera activa exudando por medio de fisuras metabolitos secundarios como terpenoides, flavonoides, alcaloides, lactonas sequiterpénicas, entre otros, los cuales son producidos por las plantas con distintos propósitos y funciones tales como la modulación del comportamiento de ciertos insectos para favorecer su atracción o repulsión (Wagner y col., 2004; Bankova y col., 2000). Las abejas recolectan los materiales disponibles superficialmente en las especies vegetales, esta recolección de sustancias resinosas les lleva a las abejas entre 10 y 15 horas cuando la temperatura en el ambiente es superior a 20°C (Gherida y col., 2009).

Propóleos: Un Producto de Origen Vegetal y Animal

Se considera que los propóleos son un producto tanto de origen vegetal como animal, debido a que las sustancias colectadas son incorporadas a los propóleos en conjunto con secreciones salivales y cera que proporcionan las abejas (Boukraâ y col., 2009). Las sustancias, o metabolitos secundarios colectados pueden llegar a sufrir una alteración química por acción de las enzimas presentes en la saliva de las abejas previa a su incorporación en los propóleos, sin embargo, dentro de las enzimas salivales secretadas por las abejas durante la recolección de exudados vegetales destaca principalmente la β -glucosidasa, una enzima que cataliza la hidrólisis sobre los enlaces glucosídicos β -1-4 de residuos terminales no reductores en sustratos β -D-glucósidos (Gardana y col., 2007), así como también otras hidrolasas, que en

general catalizan los flavonoides glucosilados en flavonoides aglicados y gliconas, encontrándose sólo los flavonoides aglicados y no los glucosilados en los propóleos (Bankova y col., 2000; Gardana y col., 2007).

Es importante destacar que la cera adicionada a las sustancias colectadas para la formulación de los propóleos, es una mezcla de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas (lipoforinas), la cual es secretada por un complejo de glándulas presentes en la región abdominal de la abeja obrera (Boukraâ y col., 2009; Cassier y col., 1995).

Características y Composición Química de Propóleos


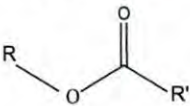
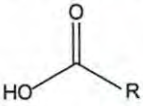
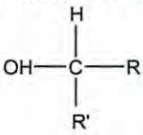
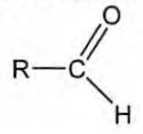
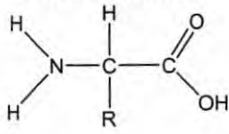
Los propóleos poseen una composición química compleja, así como una consistencia viscosa, lo que le confiere propiedades mecánicas importantes que las abejas utilizan para la construcción y adaptación de la colmena, generando un ambiente aislado y promoviendo de esta forma condiciones asépticas en su interior. Además, las abejas toman ventaja de su acción biológica, pues los propóleos protegen contra la entrada de insectos y roedores invasores, permitiendo su embalsamamiento y funcionando como un arma química contra los microorganismos patógenos (Bankova, 2005; Falcão y col., 2010; Gardana y col., 2007; Kumazawa y col., 2003; Usia y col., 2002; Velázquez y col., 2007). Por todas estas características, dicha resina recibe el nombre de "*propolis*", palabra que proviene de los vocablos griegos *pro* = a favor, en defensa de, y *polis* = ciudad, "el defensor de la ciudad".

En la actualidad, diversos estudios de caracterización química en productos naturales han reportado que entre los principales constituyentes químicos de propóleos recolectados en zonas templadas con distinto origen geográfico se han identificado (Tabla I): flavonoides, ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes y aldehídos (Bankova, 2005; Falcão y col., 2010; Gherida y col., 2009; Hernández y col. 2007; Lotti y col., 2010; Usia y col., 2002; Velázquez y col., 2007;

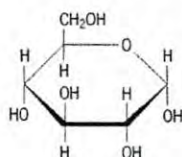
Weinstein y col., 2008). Sin embargo, el perfil de composición química, así como la abundancia en términos de concentración de los compuestos, y por consecuencia las propiedades biológicas de los propóleos, son altamente variables y dependen de la vegetación propia del área en la cual son recolectados, así como las condiciones geográficas y climáticas (Bankova, 2005; Falcão y col., 2010; Gherida y col., 2009; Lotti y col., 2010; Salatino y col., 2005; Weinstein y col., 2005(a); Weinstein y col., 2008(b)). A pesar de las posibles diferencias en la composición de los propóleos debido a sus diversos orígenes botánicos, la mayoría de las muestras de propóleos comparten similitudes considerables en su naturaleza y constitución química porcentual, siendo el 50% resinas, 30% cera, 10% aceites esenciales, 5% polen y un 5% de otros compuestos orgánicos (Gherida y col., 2009; Miguel y col., 2010).

Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los compuestos más abundantes en los propóleos provenientes de regiones templadas y septentrionales como Europa, China y Norteamérica, constituyendo prácticamente el porcentaje de resinas totales (aproximadamente 50%). Mientras que los propóleos originarios de regiones tropicales poseen una composición química diversa, entre ellos: terpenoides y derivados prenilados del ácido *p*-cumárico en los propóleos provenientes de Brasil, en los de Chile y benzofenonas poli-isopreniladas en los de Cuba, Venezuela y de algunas zonas de Brasil (Cuesta-Rubio y col., 2007; Mello y col., 2010). Por lo anterior, se entiende que la combinación y concentración de compuestos presentes en propóleos de una determinada región puede representar las características específicas del producto en términos de autenticidad.

Tabla I Compuestos químicos identificados en resinas de propóleos

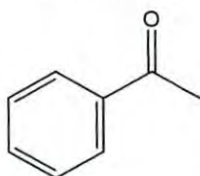
Tipo de sustancias	Compuestos químicos
<p>Ácidos aromáticos</p> 	<p>Ácido <i>p</i>-anísico, ácido benzoico, ácido benzopropanoico, ácido 5-fenil-4-pentenoico, ácido 3-fenil-2-propenoico, ácido 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico, ácido 1-fenantrenocarboxílico, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido cumárico (-<i>o</i>, -<i>m</i>, -<i>p</i>), ácido 3,4-dimetoxicinámico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido hidroxicinámico, ácido-<i>p</i>-hidroxibenzoico, ácido isoferúlico, ácido 4-metoxicinámico, ácido protocatecuico, ácido salicílico, ácido vainillínico.</p>
<p>Ácidos y ésteres alifáticos</p> 	<p>Ácido acético, ácido angélico, ácido butírico, ácido crotonico, ácido fumárico, ácido isobutírico, ácido metilbutírico, acetato de isobutil, acetato de isopentenil, acetato de isoprenil, ácido octadecanoico.</p>
<p>Ácidos grasos</p> 	<p>Ácido araquido, ácido cerótico, ácido láurico, ácido linoleico, ácido lignacérico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico.</p>
<p>Alcoholes</p> 	<p>Alcohol bencílico, alcohol cinámico, glicerol, α-glicerol fosfato, hidroquinona, isobutenol, alcohol fenetílico, 2-metoxi-4-vinil-fenol, 2-naftalen-metanol, 2-fenantrenol, 5-azuleno metanol.</p>
<p>Aldehídos</p> 	<p>Benzaldehído, aldehído caproico, <i>p</i>-hidroxibenzaldehído, isovainillina, protocatecaldehído, vainillina.</p>
<p>Aminoácidos</p> 	<p>Alanina, β-alanina, ácido α-amino butírico, ácido δ-amino butírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutámico, sarcosina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina,</p>

Azúcares



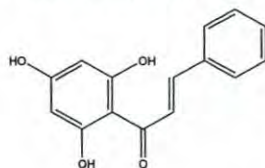
1-fructofuranosa, 2-fructofuranosa, α -D-glucopiranososa, β -D-glucopiranososa.

Cetonas



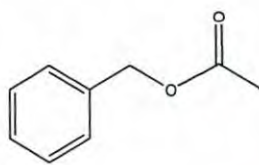
Acetofenona, *p*-acetofenol, dihidroxiacetofenona, metilacetofenona, hepta-5-en-2-ona, 6-metilcetona.

Chalconas e dihidrochalconas



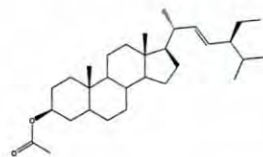
Alpinetin chalcona, naringnin chalcona, pinobanksin-chalcona, pinobanksin-chalcona-3-O-acetato, pinocembrin-chalcona, sakuranetin chalcona, 2',6',a'-trihidroxi-4'-metoxichalcona, 2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidro chalcona, 2',4',6'-dihioxidihidro chalcona.

Ésteres aromáticos



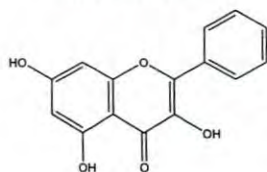
Acetato bencilico, bencil benzoato, bencil cafeato, bencil cumarato, bencil-3,4-dimetoxicinamato, bencil ferulato, bencil isoferulato, bencil salicilato, butenil cafeato, butil cafeato, cinamil benzoato, cinamil cafeato, cinamil cumarato, cinamil isoferulato, etil benzoato, etil cafeato, metil benzoato, 2-metil-2-butenil cafeato, 3-metil-2-butenilcafeato, 3-metil-3-butenil cafeato, 3-metil-3-butenil cumarato, 3-metil-2-butenilferulato, 3-metil-3-butenilferulato, 2-metil-2-butenil isoferulato, 3-metil-3-butenilisoferularo, metil salicilato, feniletil cafeato, feniletil cumarato, feniletil isoferulato, pentil cafeato, pentenil cafeato, pentenil ferulato, prenilcafeato, prenil cumarato, prenil ferulato, prenil isoferulato.

Esteroides



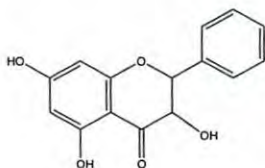
Acetato de calinasterol, acetato de β -dihidrofucosterol, acetato de costerol, acetato de stigmasterol.

Flavonas y flavonoles



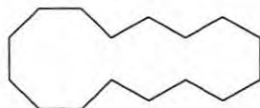
Acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éter, crisina, fisetina, galangina, galagina-3-metil éter, izalpinina, kaempferida, kaempferol, kaempferol-3-metil éter, kaempferol-7-metil éter, kaempferol-7,4-dimetil éter, pectolinarigenina, quercitina, quercitina-3,7-dimetil éter, ramnetina, ramnocitrina, tectocrisina.

Flavanonas



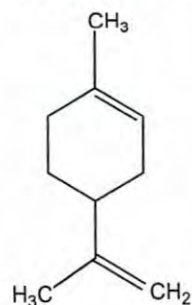
Naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-hexanoato, pinobanksina-3-metil éter, pinobanksina-3-pentanoato, pinobanksina-3-propanoato, pinocembrina, pinostrobina, sakuranetina, 3,7-dihidroxi-5-metoxiflavanona, 2,5-dihidroxi-7-metoxiflavanona.

Hidrocarburos y ésteres



Heneicosano, heptacosano, hexacosano, pentacosano, tricosano, tripentacontano, tritriacontano, dotriacontil-hexadecanoato, hexacosil-hexadecanoato, hexadecano, ciclohexadecano, octadecano, nonadecano.

Terpenos y otros compuestos



α -acetoxibetulenol, β -bisabolol, 1,8-cineol, cimeno, limoneno, terostilbeno, stireno, xantoreol, xilitol, naftaleno, 4-hexanolactona, alcohol sesquiterpénico.

Gherida y col., 2009; Marucci, 1995; Uzel y col., 2005;
Robles-Zepeda y col., 2012.

Flavonoides: Sustancias Identificadas en Propóleos

Los flavonoides son un grupo diverso de metabolitos secundarios de origen vegetal, comprendido aproximadamente por 3,000 compuestos fenólicos que comparten una estructura química similar. Los flavonoides se encuentran en casi todas las especies vegetales superiores, y juegan un papel importante en el desarrollo, crecimiento y defensa de las plantas contra microorganismos y plagas (fitoalexinas). En muchos casos su función es proporcionar pigmento y otorgarle a las plantas sus características de color, también actúan protegiendo los tejidos vegetales de radiaciones dañinas, debido a su capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta (Boik, 2001; Venkatesh y col., 2007). Los flavonoides son sintetizados a partir de precursores derivados de fenilpropanoides y acetato, siendo moléculas que tienen como estructura base dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono. Los fenilpropanoides son derivados del ácido cinámico (Diniz y col., 2003; Crozier y col., 2006).

Las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.3.1) y chalcona sintasa (CHS; EC 2.3.1.74) son dos enzimas claves que están involucradas en la biosíntesis de fenilpropanoides. La primera reacción de esta vía biosintética es generada por PAL al catalizar la deaminación de fenilalanina en ácido cinámico (Diniz y col., 2003; Venkatesh y col., 2007), el cual es posteriormente modificado por hidroxilasa y o-metiltransferasas, adicionalmente, la enzima 4-cumaril CoA ligasa (4CL) cataliza la formación de ésteres de CoA de ácido cinámico, y estos intermediarios activados son utilizados en la biosíntesis de diversos compuestos (Venkatesh y col., 2007). En la siguiente reacción crucial de la vía metabólica, la enzima CHS condensa tres moléculas de malonil-CoA con cinamoil-CoA para producir una chalcona. Esta condensación es el punto de partida en la vía para la síntesis de flavonoides (Diniz y col., 2003; Venkatesh y col., 2007). Los flavonoides pueden ser clasificados en seis categorías (figura 1).

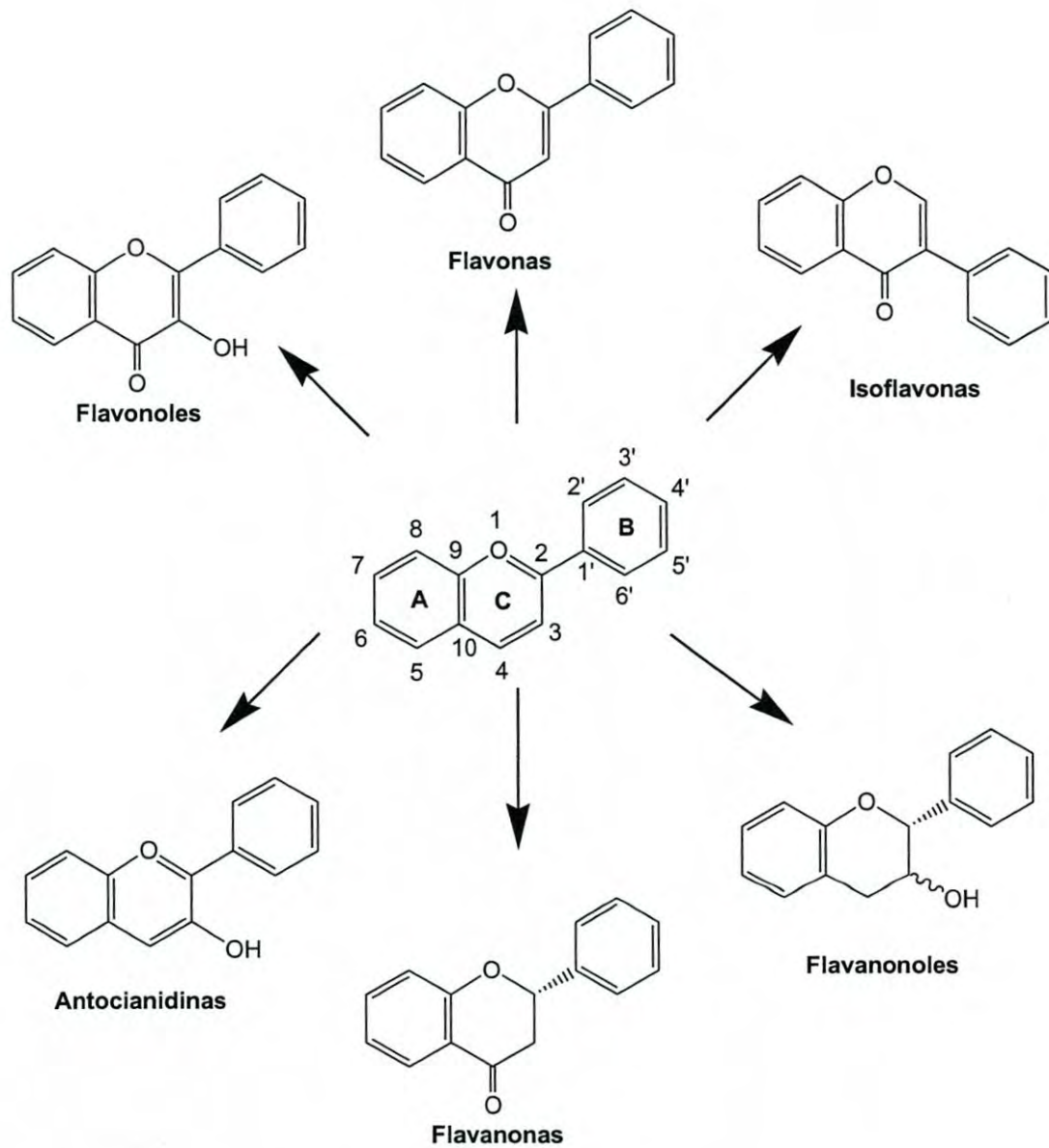


Figura 1. Estructuras genéricas de los principales flavonoides.

- Flavanonas: son caracterizados estructuralmente por la ausencia de un doble enlace en C2 y C3, y la presencia de un centro quiral en C2. La estructura de las flavanonas es altamente reactiva y generalmente experimenta procesos de hidroxilación, glucosilación y reacciones de O-metilación. Son una categoría minoritaria de los flavonoides debido a su limitada distribución natural, encontrándose principalmente en las frutas cítricas., flavanonas como pinocembrina, tangeretina, naringenina y naringina.
- Flavonoles: Son el grupo de flavonoides más ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en una gran variedad de plantas. Al igual que las flavonas, existen pocos flavonoles primarios, pero estos se encuentran generalmente en forma de O-glucósidos, este tipo de conjugación es más frecuente en la posición C3, sin embargo las sustituciones pueden presentarse en los carbonos 5,7,4',3' y 5'. Los principales son la quercitina y el kampferol.
- Flavonas: tienen similitud estructural con los flavonoles, presentan sustituciones en los anillos A y C, así como la ausencia de hidroxilación en C3. Exhiben un amplio rango de sustituciones, entre ellas hidroxilación, metilación, O- y C- alquilación y glucosilación. Presentan una amplia distribución en la naturaleza, aunque existen pocas flavonas primarias, éstas se pueden combinar con varios monosacáridos (azúcares) en distintas maneras para dar lugar miles de compuestos de glucósidos diferentes. Flavonas primarias incluyen luteolina y apigenina.
- Isoflavonas, o isoflavonoides: Son caracterizados principalmente por tener el anillo B unido por medio de C3 en lugar de C2 se encuentran principalmente en leguminosas como la soya. Genisteina y daidzeina son algunas de las comunes. Las isoflavonas también se encuentran naturalmente como glucósidos.

- Flavanoles: Al igual que las flavanonas tienen saturado el C3 del anillo C heterocíclico siendo de esta manera una estructura no planar. Mientras que las flavanonas presentan sólo un centro quiral en C2 los flavonoles poseen dos uno en C2 y otro en C3. Son considerados una categoría minoritaria en los flavonoides debido a su limitada distribución natural. Los flavonoles van desde estructuras monoméricas sencillas como catequina y su isómero epicatequina hasta proantocianidinas oligoméricas y poliméricas. Las proantocianidinas derivan su nombre del hecho que bajo condiciones ácidas y de elevadas temperaturas de ellas se obtienen antocianidinas.
- Antocianidinas y proantocianidinas. Se encuentran altamente distribuidas en las plantas actuando como pigmentos de color azul y rojo, principalmente como glucósidos. Generalmente forman conjugados con hidroxycinamatos y ácidos orgánicos, este tipo de sustituciones tienen lugar en los carbonos 3,5,7,3' y 5', ocurriendo más frecuentemente en C3. en forma de antocianinas. Están altamente concentradas en frutos como las moras.

Los glucósidos de flavonoides pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glucósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glucósidos. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los más comunes (Martínez-Sánchez, A. y col., 2005; Crozier y col., 2006; Boik, 2001).

Actividades Biológicas de Propóleos

Al igual que la miel, los propóleos se conocen desde la antigüedad y han sido ampliamente utilizados por diferentes culturas con múltiples finalidades. Existen registros acerca de su uso en la medicina tradicional desde 300 a.c (Hernandez

y col., 2007). Actualmente, algunos países europeos de la región balcánica continúan aplicando propóleos para el tratamiento dermatológico en heridas generadas por quemaduras, en padecimientos como neurodermatitis, psoriasis y herpes simplex, con la finalidad de favorecer la regeneración tisular (Bankova, 2005; Burdock, 1998). Adicionalmente, se utilizan los propóleos para tratar faringitis y úlcera estomacal (Bankova, 2005; Hernandez y col., 2007; Kumazawa y col., 2003; Shigenori y col., 2003(a); Shigenori y col., 2008(b); Velazquez y col., 2007).

Se ha reportado que los propóleos poseen un amplio espectro de actividades biológicas, principalmente: efecto citotóxico sobre células cancerosas (antitumoral), antiinflamatorio, antiviral, antioxidante, inmunorreguladora, antimutagénica, antiparasitaria, antimicrobiana (anticolérica y bacteriostática en general), antimicótica, antiséptica, astringente, entre otros (Bankova, 2005; Burdock, 1998; Falcão y col., 2010; Ghedira y col., 2009; Hernández y col., 2007; Rastrelli y col., 2010; Usia y col. 2002; Velázquez y col., 2007; Weinstein y col., 2005(a); Weinstein y col., 2008(b)).

Los constituyentes activos más importantes en los propóleos son los flavonoides (flavonas, flavonoles, flavononas), compuestos fenólicos y aromáticos, desde el punto de vista farmacológico son considerados los compuestos responsables del espectro de actividades biológicas generados por los propóleos (Uzel y col., 2005).

Se ha reportado que las propiedades antimicrobianas de la mezcla de sustancias naturales que constituyen los propóleos están principalmente atribuidas a la presencia de pinocembrina (flavonona), galangina (flavonol) y al éster fenílico del ácido cafeico, actuando por medio de un mecanismo de acción probablemente basado en la inhibición enzimática de la RNA-polimerasa (Burdock, 1998). Asimismo, se ha encontrado que la actividad estabilizadora de radicales libres (o capacidad antioxidante) de los propóleos posee una correlación significativa con el contenido total de flavonoides (Ahn y col., 2004).

Sin embargo, un reciente estudio en donde se evaluó la actividad antioxidante de propóleos colectados en Ures, Sonora, México demuestra que a pesar de poseer un perfil de composición química comprendido por flavonoides, estas resinas presentan una débil actividad antioxidante (Valencia y co., 2012).

Actividad Antiproliferativa de Propóleos

Dentro del espectro de actividades biológicas de los propóleos destaca la actividad anticancerígena *in vitro*, la cual ha sido regularmente evaluada a partir de diferentes estrategias con el objetivo de probar la capacidad de extractos de propóleos para inhibir la proliferación de líneas celulares cancerosas tanto murinas como humanas. La actividad anticancerígena se ha reportado generalmente en términos de IC₅₀, concentración a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular. Los efectos usualmente se reportan como citotoxicidad o efecto antiproliferativo dosis dependiente, así también como un efecto citoestático (una disminución en la tasa de proliferación celular) en los cultivos evaluados (Bankova, 2005; Marcucci, 1995).

Las líneas celulares empleadas en estos ensayos han sido derivadas de una variedad de diferentes tejidos cancerosos humanos y murinos, tales como sanguíneo (HL-60, leucemia mieloide), cerebral (8C6, glioma), seno (MC-F7), cérvix (HeLa), colon (Caco-2, HTC-116, HT-29, SW480.26-L5), laringe (Hep-2), tejido linfoide (RAW, SP20), pulmón (A459), páncreas (PANC-1), próstata (PC-3), piel (B16-BL6), entre otros (Cuesta-Rubio y col, 2002, Usia y col., 2002, Mishima y col., 2005, Huang y col., 2007, Hernandez y col., 2007, Popolo y col., 2009., Robles-Zepeda y col., 2012).

El método más comúnmente utilizado para evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de los propóleos en líneas celulares es el ensayo de proliferación celular utilizando las sales de tetrazolio como el MTT [Bromo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difenil tetrazolio]. Propóleos colectados en diversas zonas

de Europa, Asia y América han mostrado poseer una importante actividad antiproliferativa *in vitro* en líneas celulares cancerosas (Banskota y col., 2002, Chen y col., 2004, Alencar y col., 2007, Hernandez et al. 2007, Najafi et al. 2007, Popolo y col., 2009, Sha y col., 2009, Pratsinis y col., 2010, Liel y col., 2010).

Existen estudios acerca de los compuestos responsables de la actividad anticancerígena de propóleos provenientes de diferentes partes del mundo. En el caso de los propóleos de origen europeo han sido identificados como compuestos que proporcionan dicha actividad biológica al ester fenetílico del ácido cafeico (CAPE), a los derivados del ácido cinámico, flavonoides y ciertos triterpenos, en cuanto a los propóleos de origen brasileño son reportados los diterpenos y benzofuranos (Bankova, 2005), mientras que en los propóleos de origen brasileño son las benzofenonas isopreniladas (Cuesta-Rubio y col., 2002), así mismo, en los propóleos colectados en México y Norteamérica, la actividad antiproliferativa ha sido atribuida a flavonoides y a CAPE (Hernandez y col., 2007, Li y col., 2010).

En la actualidad, el mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto antiproliferativo los propóleos en las células cancerosas no está completamente descrito. Sin embargo, ha sido sugerido que los efectos citotóxicos pueden ser atribuidos a una inducción de muerte por apoptosis, proceso que ha sido evaluado por diversas metodologías, tales como microscopía convencional para identificar y monitorizar cambios morfológicos típicos de apoptosis, así mismo la identificación por medio de inmunohistoquímica y citometría de flujo, y la confirmación de la degradación del DNA en un patrón de fragmentación característico por electroforesis en agarosa, entre otras metodologías (Chen y col., 2001; Nagaoka y col., 2002; Khoo y col., 2010, Valencia y col., 2012).

Propóleos: Origen Botánico y Escenario Actual

Hoy en día está bien documentado que en las zonas templadas de todo el mundo la fuente principal de los propóleos es la resina exudada por los álamos, principalmente por el álamo negro (*Populus nigra*) (Bankova y col., 2002; Bankova, 2005; Ghedira y col., 2009; Falcão y col., 2010; Marcucci y col., 1995; Rastrelli y col., 2010; Usia y col., 2002; Weinstein y col., 2008). Estudios recientes demuestran que la fuente botánica principal de propóleos rojos de Brasil es *Baccharis ssp.* (Bankova, 2005; Falcão y col., 2010; Rastrelli y col., 2010; Weinstein y col., 2005), de los originarios de Túnez es *Cistus ssp.* (Ghedira y col., 2009) de los de Cuba es *Clusia ssp.* (Ghedira y col., 2009; Rastrelli y col., 2010; Usia y col., 2002) y de los de Australia es *Xanthorrhoea ssp.* (Ghedira y col., 2009; Rastrelli y col., 2010; Stevanato y col., 2010).

Los álamos son poco comunes en el desierto de Sonora, y éstos se encuentran generalmente a las orillas de arroyos, las abejas silvestres deben darse a la tarea de incorporar materia exudada por otras fuentes vegetales. Se ha demostrado que en la región del desierto de Sonora (Arizona) las especies de *Ambrosia ssp.* y *Encelia ssp.* proporcionan a las abejas exudados ricos en compuestos sobre la base de flavonoides idénticos a los requeridos para la elaboración de propóleos como los de zonas con abundantes álamos (Ghedira y col., 2009; Valant-Vetschera y col., 2006).

El origen botánico de los propóleos puede identificarse por distintas metodologías, generalmente se emplean tres estrategias. La primera consiste en la monitorización del comportamiento de las abejas, la cual debe considerarse como un procedimiento preliminar debido a que la colección de sustancias por parte de las abejas obreras para elaborar los propóleos es una actividad relativamente rara en comparación de la colección de polen para elaboración de la miel y frecuentemente tiene lugar en la parte alta de los árboles (Bankova y col., 2000; Bankova y col., 2002; Kumazawa y col., 2008). La segunda consiste

en efectuar un análisis microscópico de muestras de propóleos colectados para llevar a cabo la identificación de gránulos de polen, vellosidades secretoras y epidermis vegetal característicos de ciertos géneros y plantas en particular, utilizando la presencia de estos componentes como trazadores para identificar especies botánicas como fuente de propóleos de una determinada región (Santos y col., 2003; Warakomska y col., 1992). La tercera y la más efectiva consiste en un análisis químico comparativo de las muestras recolectadas de propóleos y de las especies vegetales asociadas a su origen botánico, es decir un análisis fitoquímico cualitativo de los constituyentes químicos más abundantes (Bankova y col., 2000; Bankova y col., 2002).

La situación actual, en cuanto a estudios de investigación en propóleos de origen mexicano está muy reducida. Pocos estudios se han realizado enfocados al análisis de composición química de estas resinas (Hernandez y col., 2007; Lotti y col., 2010; Velazquez y col., 2007; Valencia y col., 2012). Hace pocos años, se caracterizaron químicamente extractos de propóleos colectados en el estado de Campeche, en los cuales se encontraron como constituyentes químicos a lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides, flavonoides, entre otros. En cuanto a la caracterización biológica, los propóleos de Campeche mostraron tener actividad antibacteriana significativa (Tolosa y col., 2002). Estudios acerca de la composición química de propóleos rojos del Estado de Yucatán indican que los principales constituyentes de éstos son flavonas, isoflavonas y pterocarpanos, principalmente. Estos compuestos son propios de la familia *Leguminosae*, asociándose de esta manera como origen botánico del perfil de composición química de los propóleos rojos de Yucatán a las especies del género *Dalbergia* (Lotti y col., 2010).

Caracterización Química y Biológica de Propóleos Sonorenses

En nuestro grupo de investigación se han realizado diversos estudios encaminados a caracterizar química y biológicamente propóleos de diferentes

regiones del Estado de Sonora, México (Pueblo de Álamos, Caborca y Ures) (Hernandez y col., 2007; Velazquez y col., 2007). Entre los constituyentes más abundantes de los propóleos sonorenses se encontraron pinocembrina, pinobanksina-3-O-acetato y crisina (Hernandez y col., 2007), compuestos generalmente encontrados en especies del género *Populus* como fuente botánica (Stevanato y col., 2010). Otros estudios de caracterización química de propóleos de la región de Caborca muestran que los principales constituyentes son flavonoides y flavonas (Kadota y col., 2010). Los propóleos de Sonora, hasta ahora estudiados presentan diferentes actividades biológicas como son: antibacteriana (Velazquez y col., 2007), antioxidante (Velazquez y col., 2007), antiparasitaria (Díaz y col., 201) y antiproliferativa *in vitro* (Hernandez y col., 2007; Valencia y col., 2012), así como la capacidad de inducir cambios morfológicos similares a los inducidos por colchicina y en general característicos a los producidos por los agentes desestabilizantes de los microtúbulos específicamente en la línea cancerígena M12A^k.C3.F6 de linfoma de células B (Lugo, 2003; Leslie y col., 2010).

Recientemente se ha estudiado el efecto que tiene el período de recolección de los propóleos (temporalización) sobre la composición química y la actividad biológica de estos productos naturales de Ures, Sonora (29°27'81"N; 110°23'398"W). De los datos obtenidos, se observa que el perfil cromatográfico (RP-HPLC) de cada uno de los extractos de propóleos colectados en los diferentes períodos estacionales (2008-2009: primavera, verano, otoño e invierno) muestra un patrón de composición química relativa muy similar. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las abejas colectan exudados a partir de especies vegetales que se encuentran en abundancia y disponibles durante todo el año (naturaleza perenne) en la región de Ures, Sonora. Es pertinente mencionar, que estudios de las actividades biológicas (antiproliferativa, antioxidante y antiparasitaria) de propóleos colectados en las diferentes estaciones revelan que existen diferencias estadísticamente significativas entre

éstos a pesar de la similitud en su composición química (Valencia y col., 2012). Hecho que indica la posible participación de exudados de otras especies botánicas en ciertas estaciones.

Características de la Flora del Desierto de Sonora

La vegetación del Estado de Sonora es heterogénea, debido a los diversos ecosistemas dentro de la región, pero principalmente la vegetación característica de Sonora es propia del desierto (Sánchez, 2010). El desierto de Sonora se ubica en la zona suroeste de Estados Unidos y noroeste de México, en donde rodea las dos terceras partes más altas del golfo de California. Su elevación máxima sobre el nivel del mar es de 1050 m., los rangos de precipitación pluvial van desde 0 a 330 mm. La precipitación ocurre sólo en invierno en el lado oeste, y en verano e invierno en el lado este. Las temperaturas del invierno son bastante leves en la parte sur, ocurriendo sólo pequeños períodos de heladas en el norte (Sánchez, 2010; Shreve, 1998).

El limitado abastecimiento de agua debido a la baja precipitación pluvial y las características del clima a las cuales las plantas del desierto están sujetas afectan el número de plantas por hectárea, el tamaño y altura de éstas, el número de especies por kilómetro cuadrado, el tiempo de desarrollo, el tamaño de su semilla, las oportunidades de germinación y los cambios para la supervivencia del desarrollo germinal, así como la operación de todos los procesos concernientes a la evolución. Las comunidades de las plantas del desierto poseen características distintivas, tales como la estatura baja y desigual entre las plantas, la apertura de su follaje, y la mezcla de diferentes formas de vida (Shreve, 1998).

El desierto de Sonora es por mucho, el desierto con mayor variedad en formas de vida y diversidad en sus comunidades vegetales que los otros desiertos de Norteamérica (desierto de Chihuahua, Mojave y gran Basin). Posee

un gran número de tanto de especies de hoja perene como arbustos de hoja caduca con un amplio rango de tamaño en sus hojas. Posee muchas especies de pequeña altura las cuales se encuentran vecinas a arbustos en las llanuras abiertas e incluye tanto especies xerófilas como mesófilas. Las principales especies arbóreas que conforman la flora del desierto de Sonora son. *Cercidium microphyllum* (palo verde), *Cercidium floridum* (palo verde-azul), *Cercidium sonorae* (brea), *Olneya tesota* (palo fierro), *Jatropha cinérea* (ortega), *Jatropha cardiophylla* (sangrengado), *Bursera microphylla* (árbol de elefante), *Bursera hindsiana* (copal), *Bursera filicifolia* o *Bursera laxiflora* (torote), *Pachycormus discolor* (copalquín), *Pithecellobium sonorae* (palo jocono) e *Ipomoea arborescens* (palo blanco). En el desierto de Sonora también se encuentran algunos de los árboles que confinan con arroyos o llanuras aluviales, entre ellos *Prosopis juliflora* var. *Velutina* (mezquite), *Populus fremontii* (álamo), *Sapindus Saponaria* (jaboncillo), *Chilopsis linearis* (sauce del desierto) y *Celtis reticulata* (alemz). En las regiones con bajas elevaciones en el desierto de Sonora se encuentra un gran número de especies leguminosas las cuales no están vecinas a especies xerófilas, incluyendo *Acacia occidentalis* (uña de gato), *Acacia farnesiana* (huizache), *Caesalpinia pumila* (palo piojo), *Lysiloma candida* (palo blanco), *Lysiloma watsoni* (tepehuaje), *Lysiloma divaricata* (tepemezquite), *Eysenhardtia orthocarpa* (palo dulce), *Erythrina flabelliformis* (chilicote), y *Mimosa laxiflora* (garabatillo) (Sánchez, 2010; Shreve, 1998).

En general el hábitat de estas especies es un indicativo de las condiciones de humedad favorables. En el desierto de Sonora los árboles son favorecidos por la ocurrencia biestacional de precipitación y por la cantidad de ésta. El número de las especies de arbustos perenes no es muy amplio, incluyendo *Simmondsia chinensis* (jojoba), *Condalia spathulata* (huichutilla), *Celtis pallida* (granjeno), *Cordia sonorae* (palo de asta), *Sapium biloculare* (frijol saltarín), *Atamisquea emarginata* (arbusto del vómito), y *Viscainoa geniculata* (garambullo) (Shreve, 1998).

En la región de Ures, Sonora (29°27'81"N; 110°23'398"W), la zona de colección de propóleos, existen llanos regados extensamente por el Río Sonora en las estaciones de lluvia. En ellos es considerable una diversidad de sustratos, comprendiendo suelos graníticos profundos, arcilla volcánica superficial y áreas con piedra caliza. En esta área la distribución de la vegetación es muy irregular y su aspecto cambia radicalmente de lugar a lugar. La flora nativa característica está comprendida por: plantas xerófilas (principalmente cactáceas), *Prosopis velutina* (mezquite), *Olneya tesota* (palo fierro), *Parkinsonia praecox* (Brea), *Populus fremontii* (álamo) y *Ambrosia ambrosioides* (chicura) (Sánchez, 2010; Shreve, 1998).

La especie *Ambrosia ambrosioides*, abundante en la región de Ures, Sonora, pertenece a la familia *Asteraceae*, la cual se caracteriza especialmente por biosintetizar compuestos de naturaleza sesquiterpénica, específicamente lactonas sesquiterpénicas, compuestos que constituyen la excreción característica de aceites esenciales aromáticos de esta familia (Seaman, 1982). Estos compuestos generalmente se encuentran almacenados en tricomas distribuidos en la superficie de sus hojas.

Debido a todo lo anterior, se ha incrementado el interés en determinar el origen botánico de los propóleos de Ures, Sonora, los cuales muestran un amplio espectro de actividades biológicas, esto con la finalidad de identificar las especies vegetales que proporcionan los constituyentes químicos bioactivos y el efecto que posee la temporalización, es decir el paso de las estaciones anuales, sobre dichas fuentes botánicas, la composición química de sus exudados resinosos y por ende en sus actividades biológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema general de la metodología realizada para lograr los objetivos anteriormente planteados se resume en la figura 1, donde se ilustra la colección contemporánea de los propóleos y las especies botánicas disponibles en las diferentes estaciones del año durante el período 2009-2010, su extracción, la evaluación de sus actividades biológicas y la determinación del origen botánico a partir de un análisis químico comparativo de los propóleos y las resinas vegetales.

Recolección de Propóleos y Obtención de Extractos Metanólicos

Los propóleos fueron colectados a partir de 12 colmenas dispuestas en el predio "San Enrique" localizado en la comunidad "El Coyote" en Ures, Sonora, México (29°27'81"N; 110°23'398"W), En la parte superior de las colmenas se colocaron marcos de madera de 59 x 37 cm, con una malla de polietileno con orificios de 1 mm², como trampa. Se instalaron en las colmenas al inicio de cada estación durante el período 2009-2010, verano (21 de junio 2009 – 22 septiembre 2009), otoño (23 de septiembre – 21 de diciembre 2009), invierno (22 de diciembre – 21 de marzo 2010) y primavera (22 de marzo – 20 de junio 2010). Posteriormente se retiraron las trampas con los propóleos producidos al término de la misma. Una vez retiradas se sometieron a -80°C para facilitar la recuperación de las muestras. Las muestras de propóleos se trituraron, se extrajeron con metanol, adicionándoles metanol en una proporción 1:6 (p/v). Se mantuvieron en oscuridad a 25°C por un período de 3 días con agitación periódica, para posteriormente filtrarlos con papel Whatman No.1 y concentrarlos en un evaporador rotatorio Yamato RE300 a 40°C bajo presión reducida (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007; Valencia y col., 2011).

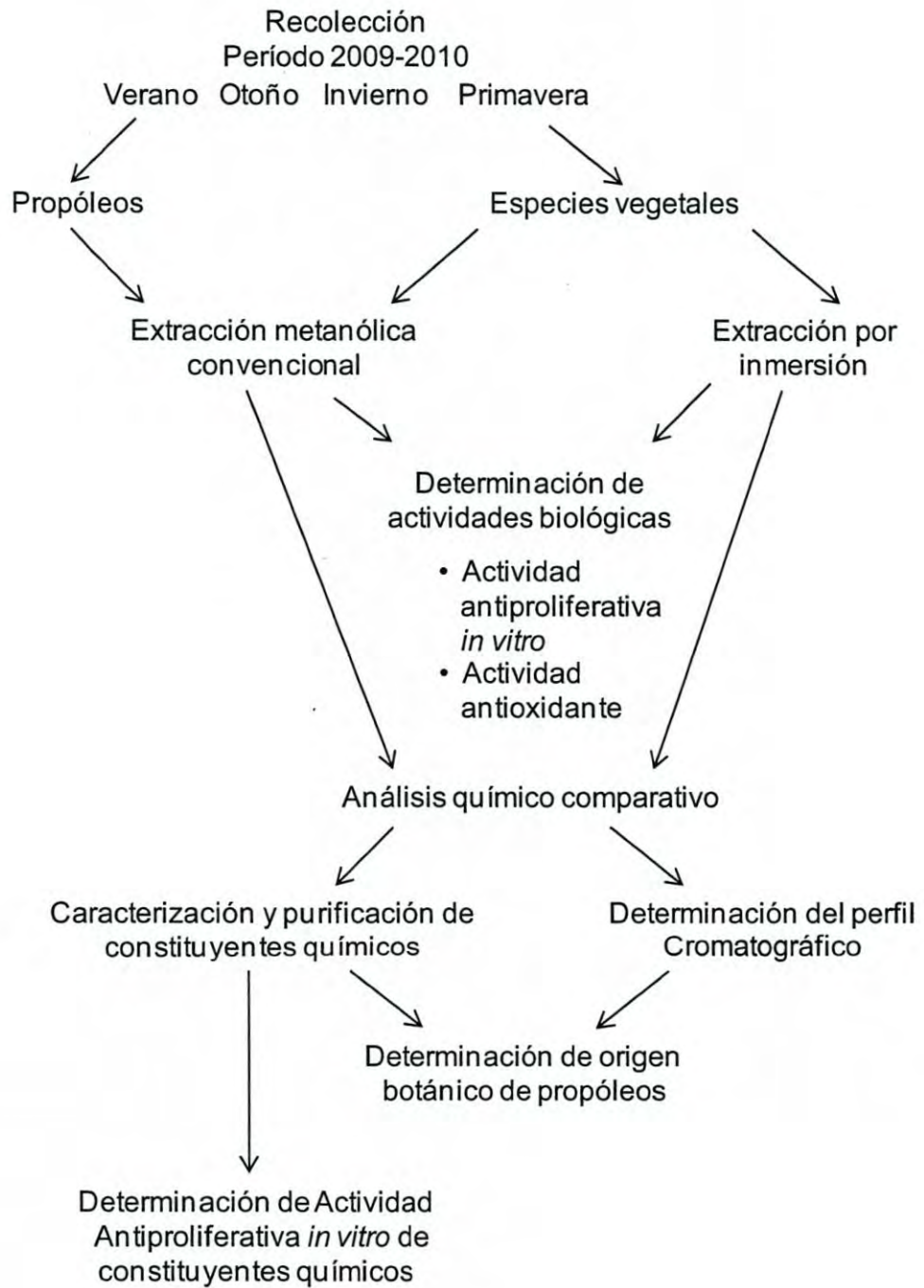


Figura 2. Esquema general de metodología

Para llevar a cabo el desgrasado de los extractos metanólicos secos de los propóleos, éstos se disolvieron en metanol de nueva cuenta pero en una proporción 1:10 (p/v), facilitando la disolución por medio de ciclos de sonicación a 59 Hz y calentamiento, una vez que se obtuvo una solución homogénea se procedió a almacenarla por toda una noche a -4°C para favorecer la precipitación de ceras y material inerte. Al día siguiente, efectuada la precipitación se filtró al vacío la solución en papel Whatman No.1 y se sometió a evaporación a 40°C bajo presión reducida para obtener el extracto libre de grasas (Cuesta-Rubio y col., 2007).

Recolección de Especies Botánicas

Diez especies botánicas pertenecientes a la flora nativa de Ures, Sonora fueron recolectadas durante cada estación en el mismo período que los propóleos. Las plantas se muestrearon tomando en cuenta un radio de 2000 metros desde la posición de las colmena en el predio San Enrique ($29^{\circ}27.81'\text{N}$; $110^{\circ}23.398'\text{W}$), posteriormente fueron clasificadas taxonómicamente en el herbario de la Universidad de Sonora por el Ing. Jesús Sánchez Escalante. En la tabla II se muestran las especies vegetales colectadas, su número de registro en el herbario de la Universidad de Sonora y su ubicación en coordenadas, mientras que la figura 3 comprende fotografías correspondientes a estas especies.

Obtención de Extractos Metanólicos para Especies Vegetales

Durante la recolección de propóleos correspondientes a cada estación del año en el período 2009-2010, se llevó a cabo contemporáneamente el muestreo de especímenes característicos de flora nativa de la región de Ures, Sonora.

Tabla II. Recolección de especies vegetales y su identificación taxonómica

No. Registro ^a	Nombre científico	Nombre común	Coordenadas
06746	<i>Jacquinia macroarpa</i>	San Juanico	N 29° 27'211"; W 110°23'391"
02113	<i>Guaiacum coulteri</i>	Guayacán	N 29° 27'211"; W 110°23'391"
08815	<i>Bursera laxiflora</i>	Torote	N 29° 27'349"; W 110°23'473"
02212	<i>Acacia farnesiana</i>	Huizache	N 29° 27'349"; W 110°23'473"
03774	<i>Olneya tesota</i>	Palo fierro	N 29° 27'345"; W 110°23'445"
03195	<i>Prosopis velutina</i>	Mezquite	N 29° 27'063"; W 110°23'635"
13698	<i>Parkinsonia praecox</i>	Brea	N 29° 27'196"; W 110°23'431"
04878	<i>Jatropha cardiophylla.</i>	Sangrengado	N 29° 27'211"; W 110°23'391"
04955	<i>Ambrosia ambrosioides</i>	Chicura	N 29° 26'865"; W 110°24'314"
13857	<i>Populus fremontii</i>	Álamo	N 29° 26'190"; W 110°23'782"

^a Herbario de Universidad de Sonora



Especies vegetales



Jacquinia macrocarpa



Guaiacum coulteri



Bursera laxiflora



Acacia farnesiana



Olneya tesota



Prosopis velutina



Parkinsonia praecox



Jatropha cardiophylla



Ambrosia ambrosioides



Populus fremontii

Figura 3. Especies vegetales recolectadas que comprenden la flora nativa de la región "El Coyote" en el municipio de Ures, Sonora.

Las especies vegetales colectadas se trituraron y se sometieron a un proceso de extracción por medio del método convencional en metanol (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007; Valencia y col., 2012). Adicionando metanol en una proporción 1:6 (p/v). Se almacenaron en la oscuridad a temperatura de 25°C por tres días con agitación periódica, posteriormente fueron sometidos a un proceso de filtración. Finalmente se procedió a su concentración en un evaporador rotatorio Yamato RE300 a 45°C bajo presión reducida. La extracción metanólica de las plantas colectadas se realizó con el propósito de comparar las actividades biológicas y el perfil químico de los extractos de propóleos utilizando el mismo método.

Obtención de Extractos de Resinas Vegetales por Inmersión

Para extraer sólo los compuestos bioactivos que conforman los exudados superficialmente disponibles se sometieron las hojas frescas, tallos y brotes de las plantas recién colectadas a una extracción por inmersión por un período de 20 segundos (en la proporción p/v de 1:2), parte por parte (brote a brote y hoja a hoja) en disolventes orgánicos con distinto índice de polaridad, empleándose metanol (índice de polaridad de 5.1), acetato de etilo (4.4) y diclorometano (3.1). Posteriormente se procedió a concentrarlos en un evaporador rotatorio Yamato RE300 a 45°C bajo presión reducida.

Una vez concentrados los extractos metanólicos vegetales se procedió a desgrasarlos, se les adicionó hexano (3 mL/g), y se homogenizaron en placa de calentamiento a 40°C por algunos minutos, sin que se presentara ebullición. Después de algunos minutos se decantó el hexano y se repitió el proceso de lavado 3 veces. (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007; Valencia y col., 2011). Se hará de igual manera se realizó para los extractos completos de las especies vegetales.

Obtención del Perfil de Composición Química

Con base en un análisis comparativo de la composición química se infirió el origen botánico de los constituyentes químicos de los propóleos de Ures, Sonora. Para la identificación de compuestos químicos presentes en los extractos de las diversas plantas y propóleos mediante un análisis por RP-HPLC se utilizó un equipo Varian Pro-Star 320, con una columna C18, la cual fue eluida empleando un gradiente de agua - ácido fórmico / metanol a una tasa de flujo de 1mL/min. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 5% en agua (A) y metanol (B). El gradiente programado para el análisis fue el siguiente: 30% B (0-15 min), 40% B (15-20%), 45% B (20-30%), 60% B (30-50 min), 80% B (50-65 min) and 100 %B (65-71min). Para el seguimiento de las fracciones, se utilizó un detector UV-Vis, monitorizando la elución de los compuestos a λ 280 y 340 nM. Para asignación de los picos identificados a cada compuesto en el cromatograma obtenido por HPLC se prepararon soluciones de compuestos estándares empleando compuestos puros (flavonoides). Se compararon los cromatogramas obtenidos para cada uno de los extractos con los diferentes disolventes en todas las plantas con los obtenidos para los propóleos de Ures, Sonora.

Caracterización Química

Aislamiento y Purificación de Compuestos de Extractos de Propóleos

La parte experimental correspondiente a la purificación y caracterización química de las muestras de propóleos analizadas se realizó en el Laboratorio di Idrologia e Chimica degli Alimenti e Integratori Alimentari (LICA) de la Universidad de Salerno, Italia. Para realizar el fraccionamiento de los extractos de propóleos se procedió realizar una separación cromatográfica a baja presión, para ello se montó una columna cromatográfica (3x50 cm) con 100 g LH-20 Sephadex (Sigma-Aldrich). Se tomó la cantidad de 2.5 g de la muestra de extracto de

propóleos de invierno y se disolvió en 4 mL metanol para posteriormente cargarse en la columna. Se utilizó como fase móvil solamente metanol. Las fracciones se colectaron por volumen de 5 mL. Posteriormente se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) con cloroformo:metanol (9:1) de las fracciones obtenidas, para observar el patrón de corrimiento cromatográfico en el UV referente a su composición química y reunir las fracciones similares.

Una vez realizada la reunión de las fracciones, se procedió a evaporarlas bajo presión reducida a 40°C. A partir de las fracciones agrupadas secas se procedió a preparar una solución de concentración a 0.1 mg/μL para cada una de ellas, y purificándose las fracciones obtenidas por medio de HPLC equipo R401 con detector de índice de refracción (Waters) con una columna C18 (Phenomex) o con C8 (250x100mM, 10 μM, 100 Å, Phenomex) utilizando como fase móvil Metanol al 60, 65 o 70% (isocrático), con tasa de flujo de 2.5 o 3.0 mL dependiendo de la naturaleza química de la fracción (Lotti y col., 2010).

Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna con Sephadex de los propóleos colectados en la estación de invierno se subfraccionaron por medio de separación por HPLC semi - preparativa de la siguiente manera.

- Fracción 4: C8 metanol al 65% flujo de 3.00 mL/min.
- Fracción 5: C8 Metanol al 70% flujo de 3.00 mL/min.
- Fracción 6: C8 metanol al 60% flujo de 3.00 mL/min.
- Fracción 7: C8 metanol al 60% flujo de 3.00 ml/min.
- Fracción 8 y 9: C18 metanol 60% flujo de 2.5 mL/min.
- Fracción 10: C8 metanol 60% flujo de 3.00 mL/min.

Análisis por HPLC-MS-Q-TOF de Muestras de Propóleos, Fracciones y Constituyentes Químicos Aislados

Las muestras de propóleos, las fracciones obtenidas por cromatografía en Sephadex LH-20 y las subfracciones producidas se analizaron por HPLC acoplado a Espectrometría de Masas con Ionización por Electronebulización

(Electrospray Ionization, ESI) empleando el equipo Finnigan, LCQ Deca (Thermo electron corporation) por medio del software Xcalibur 2.0. Las muestras se prepararon a la concentración inicial de 1 mg/mL, de esta solución se tomó una alícuota de 10 µL añadiéndola a un vial con una mezcla de Agua grado MS (Fluka) y Metanol LC-MS (Fluka) 1:1 (500:500 µL). Todos los extractos, fracciones y compuestos fueron disueltos en Metanol-Agua (1:1) e inyectados en la fuente de ESI por medio de una inyección de bomba, la tasa de flujo fue 5 µL/min. Se utilizó el mismo método de gradiente programado que en el análisis RP-HPLC, salvo ciertas modificaciones con la finalidad de acortar el tiempo de corrida y optimizar la separación cromatográfica.

Debido a que la ionización por electronebulización es un método de ionización suave que genera frecuentemente sólo a la molécula ionizada con pequeñas fragmentaciones, es necesaria la utilización consecuente de fragmentación empleando Disociación Inducida por Colisión (CID). La fragmentación por CID genera fragmentos característicos que permiten identificar al compuesto presente con un determinado tiempo de retención, con base en predicciones partiendo de su estructura y los sitios donde puede efectuarse la ruptura molecular. Sin embargo la aplicación posterior de la herramienta de espectrometría de masas en Tandem o masa a la segunda (MS/MS) permite seleccionar uno de los fragmentos generados previamente para conocer su posterior fragmentación, y así caracterizar por medio de espectrometría de masas los compuestos presentes en una muestra.

La presencia de compuestos fue monitorizada a dos longitudes de onda, a 340 y 280 nm. Dado que la composición de los propóleos de Ures, Sonora está constituida básicamente por flavonoides y ésteres de los mismos (Hernández y col., 2007, Velazquez y col., 2007, Valencia y col., 2012), y debido a que varias publicaciones (Gardana y col., 2007, Falçã o y col., 2010) han reportado preferencialmente la detección de flavonoides en modalidad negativa en HPLC-ESI-MS, razón por la cual, los espectros de masa completa y de

Disociación Inducida por Colisión (CID) y de Espectrometría de masas en Tandem (MS/MS) se adquirieron bajo esta modalidad de ionización. Sin embargo, los flavonoides pueden ser detectados tanto en modalidad de ión negativa como positiva, pese a esto es más útil la modalidad negativa para la identificación de compuestos (Rice-Evans y col., 2005).

Las masas exactas fueron medidas por el instrumento cuadrupolo de tiempo de vuelo Q-TOF premier. Los parámetros instrumentales fueron ajustados para cada compuesto investigado. El voltaje capilar estuvo fijado a 3V, el voltaje de nebulización a 5.10kV, y la temperatura capilar a 220°C.

Determinación de Estructuras Moleculares de los Compuestos Aislados por RMN

Se realizó un análisis de caracterización química de los constituyentes químicos para las muestras por Resonancia Magnética Nuclear. Para dilucidar las estructuras moleculares de los compuestos purificados por RMN se efectuó en un equipo Bruker DRX-600 (599.19MHz para ^1H y a 150.86MHz para ^{13}C , empleando el paquete de software UXMNMR). Se expresaron los cambios químicos referentes a los picos de los solventes en partes por millón (δ), $\delta(\text{H})$ 3.34 y $\delta(\text{C})$ 49.0 para CD_3OD ; Se determinaron los experimentos en DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transference <mejora sin distorsión a través de transferencia de polarización>), ^{13}C , HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence <coherencia cuántica heteronuclear única>), HMBC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence <coherencia cuántica heteronuclear multiple>), DQF-COSY (Double Quantum Filtered Correlated Spectroscopy <espectroscopía correlacionada de doble filtrado cuántico>) NMR. Los experimentos se efectuaron utilizando las secuencias de pulso convencionales descritas en la literatura (Lotti y col., 2010).

Determinación de la Capacidad Estabilizadora de Radicales Libres (Actividad Antioxidante)

La actividad antioxidante de los extractos de las especies vegetales se determinó con la metodología descrita por Usia y col., 2002 con ligeras modificaciones (Blois 1958). Los extractos de propóleos y de las especies vegetales se evaluaron a la concentración de 100 µg/mL, se disolvieron previamente en etanol absoluto y se mezclaron volúmenes iguales de muestra (600 µL) con una solución del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich) a la concentración de 300 µM. Esta mezcla se agitó vigorosamente y se incubó por 30 minutos en obscuridad a temperatura ambiente. Se registró la absorbancia a la longitud de onda de 517 nM utilizando como blanco etanol absoluto. Como control de referencia se utilizó vitamina C (70 µM), CAPE (éster fenílico del ácido cafeico, 35 µM) y BHT (hidroxitoulueno butilado, 140 µM). Los resultados fueron expresados en porcentaje de actividad antioxidante con base en la proporción de neutralización de DPPH comparada con el estándar (mezcla 1:1, etanol:DPPH) de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Absorbancia del estándar

$100\% - \% \text{ Inhibición} = \% \text{ de actividad antioxidante}$ (Valencia y col., 2012).

Actividad Antiproliferativa *in vitro*

Líneas Celulares

Para realizar los ensayos de inhibición de proliferación *in vitro* se utilizaron las líneas celulares derivadas de origen murino M12A^K.C3.F6 (línea cancerosa de linfoma de células B) y L-929 (línea derivada de tejido subcutáneo). Los cultivos se mantuvieron en el Medio Mínimo Esencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma®) suplementado al 5% con suero fetal bovino, Gibco® (D5F), se

colocaron en una incubadora a temperatura de 37°C, y en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad al 80%.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa *in vitro*

La actividad antiproliferativa *in vitro* de los extractos obtenidos se evaluó por el método de MTT, el cual es un método colorimétrico que permite medir la proliferación y viabilidad de un cultivo celular basándose en la capacidad de las enzimas mitocondriales de unirse a la sal de tetrazolio de coloración amarilla, [Bromo3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difenil tetrazolio], para reducirla a cristales de formazán de color azul-púrpura. Los cristales de formazán resultantes se solubilizan con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida se registra a las longitudes de onda de 570 y 655 nm en un lector de placas de ELISA, la diferencia de las dos lecturas se utiliza para calcular el porcentaje de proliferación del cultivo.

Las líneas celulares utilizadas se ajustaron a 2.0×10^5 células/mL en el medio DMEM, se adicionaron 50 µL de la suspensión celular obtenida a cada pozo de una placa de 96 pozos, adicionando también 50 µL del medio a los pozos correspondientes a los blancos de extracto a evaluar. Después de 24 horas de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ para permitir la adhesión celular, fueron adicionados 50 µL de medio D5F conteniendo las diferentes concentraciones de extractos de plantas y propóleos a evaluar, así como de los compuestos control con actividad antiproliferativa reportada (5-fluoroacil, Doxorubicin y CAPE). Previamente se prepararon soluciones en DMSO a la concentración de 40 mg/mL de cada uno de los extractos obtenidos. Se evaluaron las concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL contra el control de proliferación celular y el control de disolvente DMSO. Se dejaron incubar 24 horas a las mismas condiciones para posteriormente realizar las observaciones de cambios morfológicos al microscopio Invertido. A las 48 horas de incubación con los extractos se adicionaron a cada pozo 10 µL del reactivo

MTT preparado a una concentración de 5 mg/mL. Se incubó 4 horas más, se disolvieron los cristales de formazán con Isopropanol ácido y se llevó a cabo la lectura en un lector para placas de ELISA ThermoLabSystem, Multi SKan EX a las longitudes de onda de 570 y 650 nm. La resta resultante de ambas lecturas se toma en cuenta para la realización de los cálculos. La IC₅₀ de cada extracto fue calculada por regresión lineal o no lineal.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se procesaron y analizaron en el software estadístico GrapPad PRISM 3.02. Cada experimento fue realizado por triplicado por lo menos tres veces.

RESULTADOS

Características Físicas y Rendimientos de Extracción Obtenidos

Propóleos

Las muestras de propóleos obtenidas en las respectivas estaciones presentaron diferencias en su aspecto físico, incluyendo consistencia y coloración, así como en la cantidad total recuperada. Los propóleos colectados en verano presentaron la mayor cantidad de resina recuperada, siendo 360 g, prácticamente el doble que en las otras estaciones. De igual manera, una vez realizada la extracción y la deceración de las muestras los propóleos de verano mostraron tener el mayor contenido porcentual de ceras en comparación con los colectados en las otras estaciones, siendo un 7%. En la tabla III se encuentran las características físicas de propóleos colectados, los rendimientos de extracción obtenidos y el porcentaje total de ceras.

Extracción Metanólica de Especies Vegetales

Inicialmente, en el mes de junio del año 2009, se muestrearon por primera ocasión las 10 especies vegetales descritas anteriormente. La tabla IV muestra las cantidades colectadas con los respectivos rendimientos obtenidos después del procedimiento de extracción para cada una de las especies botánicas colectadas. Las especies *Populus fremontii*, *Prosopis velutina* y *Ambrosia ambrosioides* presentaron los rendimientos de extracción más altos.

Tabla III. Recolección de propóleos en el periodo 2009-2010 y sus características físicas, rendimientos de extracción y contenido porcentual de ceras.

Estación	Coloración	Consistencia	Cantidad de propóleos colectada (g)	Cantidad recuperada post extracción (g)	Rendimiento porcentual	Porcentaje total de ceras
Verano	Ocre	No pegajoso	360	245	68	7.0
Otoño	Ocre	Pegajoso	177	121	67	4.2
Invierno	Amarillo-verde	Pegajoso	154	110	71	5.0
Primavera	Ocre	Pegajoso	120	91	75	1.7

Tabla IV. Rendimientos de extracción por el método convencional para las especies vegetales

Nombre científico	Nombre común	Cantidad Colectada (g)	Cantidad extracto recuperado (g)	Rendimiento porcentual obtenido
<i>Jacquinia macroarpa</i>	San Juanico	78	7.10	9.1
<i>Guaiacum coulteri</i>	Guayacán	225	12.0	5.3
<i>Bursera laxiflora</i>	Torote	133.9	8.9	6.6
<i>Acacia farnesiana</i>	Huizache	103.6	7.26	7.0
<i>Olneya tesota</i>	Palo fierro	152.4	9.10	6.0
<i>Prosopis velutina</i>	Mezquite	145.6	19.9	13.7
<i>Parkinsonia praecox</i>	Brea	199.3	16.4	8.2
<i>Jatropha cardiophylla.</i>	Sangrengado	120	3.10	2.6
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	Chicura	168	17.5	10.4
<i>Populus fremontii</i>	Álamo	210.6	30.7	14.6

Las Especies Vegetales Exudan Resinas Todo el Año

Al inicio del otoño (23 de septiembre) del año 2009 se realizó una segunda colección de especies botánicas en la región de Ures, Sonora, esto con la intención de extraer con diclorometano las resinas y exudados superficiales ricos en metabolitos secundarios biodisponibles. Es importante mencionar que sólo se extrajo material resinoso de las especies *Populus fremontii* y *Ambrosia ambrosioides*, *Bursera laxiflora* y *Prosopis velutina* por este método (tabla V). Esta situación no se observa para las otras especies, obteniéndose una poca cantidad de cera que se disolvía en hexano cuando se procedía a desgrasar los extractos (fraccionamiento parcial).

La extracción anteriormente mencionada permitió la obtención de exudados de manera efectiva, razón por la cual se realizó en las siguientes estaciones del año, iniciando en otoño y terminando hasta verano del 2010, colectando sólo las especies de *P. fremontii*, *A. ambrosioides*, *B. laxiflora* y *P. velutina*. Con el propósito de encontrar el disolvente orgánico más apropiado para realizar la extracción de las resinas superficiales se utilizó esta vez una gama de disolventes con distinto índice de polaridad, utilizándose metanol, acetato de etilo y diclorometano. Se observó que el rendimiento fue prácticamente el mismo para los tres extractos obtenidos para cada planta (Apéndice I). Para confirmar este hecho se analizó el perfil químico de los extractos obtenidos con los tres disolventes, no se apreciaron diferencias considerables entre ellos (Apéndices II, III y VI).

Debido a lo anterior, se decidió utilizar el metanol como disolvente ideal para la extracción, así como por su disponibilidad, costo y menor daño al ambiente. Posteriormente se realizaron las colectas el día 24 de marzo y 11 de julio del año 2010 para las anteriores 4 especies vegetales, completando así el período de extracción de exudados y resinas vegetales. Los rendimientos fueron similares a los obtenidos (Apéndices V y VI).

Tabla V. Extracción de resinas y exudados de especies vegetales por inmersión en diclorometano en otoño

Especie vegetal	Cantidad colectada (g)	Cantidad extracto recuperado (g)	Rendimiento en porcentaje
<i>Prosopis velutina</i>	550 g	0.56 g	0.10
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	230 g	4.74 g	2.00
<i>Populus fremontii</i>	230 g	1.80 g	0.80
<i>Bursera laxiflora</i>	300 g	0.72 g	0.24

La Composición de Propóleos de Ures, Sonora es Conservada Durante las Cuatro Estaciones del Año.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la composición química en muestras de propóleos colectados en la región de Ures, Sonora se procedió a analizar el perfil cromatográfico de ellas, y así evidenciar las variaciones de los constituyentes químicos con respecto al tiempo de recolección (Hernandez y col., 2007, Velázquez y col., 2007 y Valencia y col., 2012). El perfil cromatográfico obtenido resultó ser muy similar entre las muestras estacionales, de igual manera fue muy semejante a los perfiles reportados para el período de temporalización anterior (figura 4), 2008-2009 (Valencia y col., 2012). Esta observación indica que la estabilidad de los constituyentes químicos de propóleos sonorenses es muy alta. Adicionalmente, los perfiles cromatográficos obtenidos son muy similares al previamente reportado por nuestro grupo de investigación para propóleos de Ures recolectados durante el periodo 2003-2004 (Hernandez et al. 2007). En los cromatogramas presentados en la figura 5 se puede observar fácilmente la similitud en composición química de las muestras colectadas en el período 2009-2010, donde la presencia de picos y los tiempos de retención para éstos permanecen invariables en las diferentes muestras de propóleos analizadas, lo que sugiere que el patrón de composición química de los propóleos de Ures es conservado.

Entre los picos de los cromatogramas de la figura 5 se encuentran los correspondientes a compuestos de naturaleza fenólica identificados, principalmente flavonoides, tales como: pinocembrina, pinobanksina-3-O-acetato, crisina, galangina y acacetina, así también, se identificó la presencia del éster fenético del ácido cafeico (CAPE), el número de pico al cual se asignó cada compuesto, su respectivo tiempo de retención en las muestras estacionales y la abundancia relativa en porcentaje se muestran en la tabla VI (Valencia y col., 2012). La abundancia relativa a la cual se encuentran estos 6 constituyentes en las diferentes muestras mantiene cierta estabilidad.

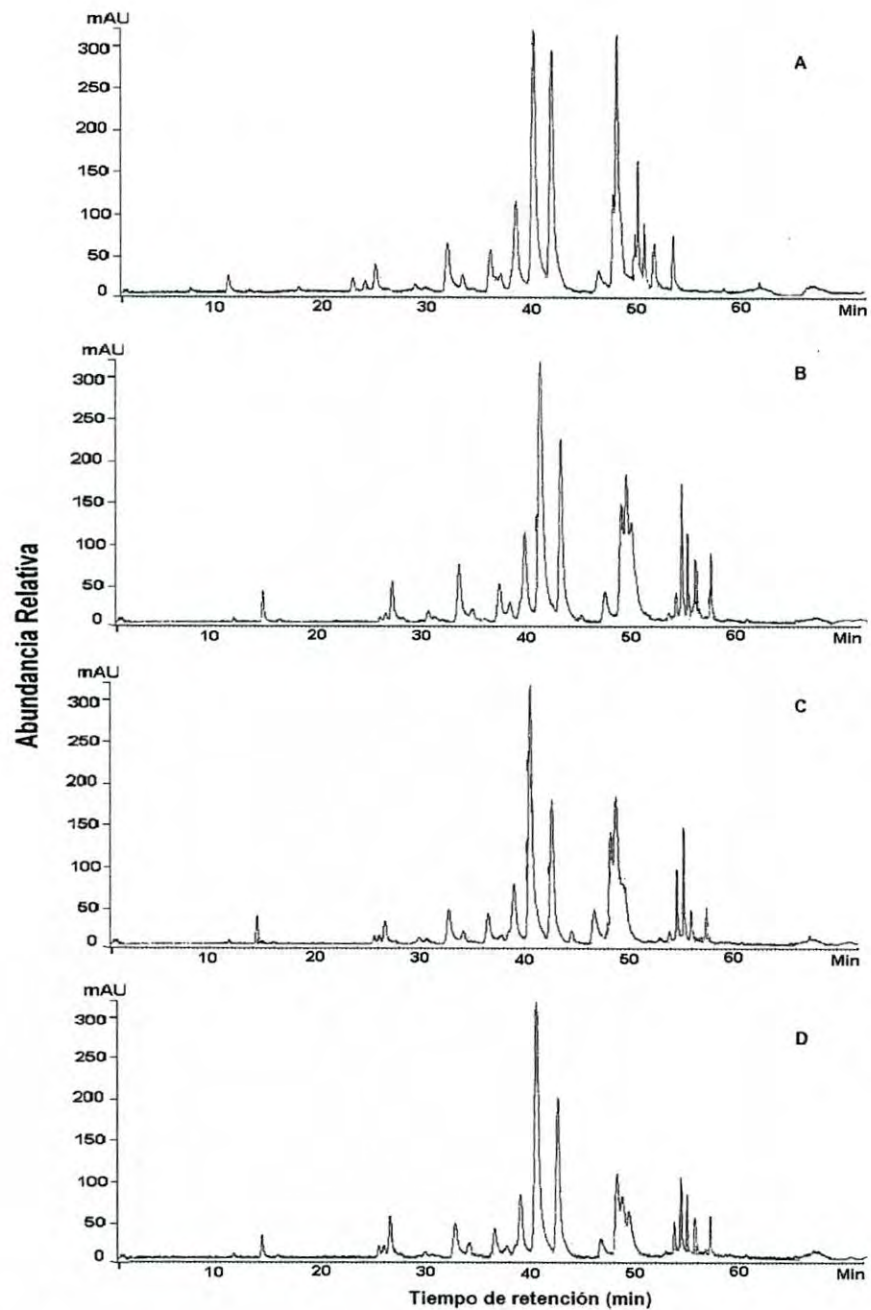


Figura 4. Cromatogramas de extractos de propóleos de Ures, Sonora recolectados durante el período 2009-2010; tomados con un detector a 340 nm. **A:** Propóleos de verano (2009). **B:** Propóleos de otoño (2009). **C:** Propóleos de invierno (2009-2010). **D:** Propóleos de Primavera (2010).

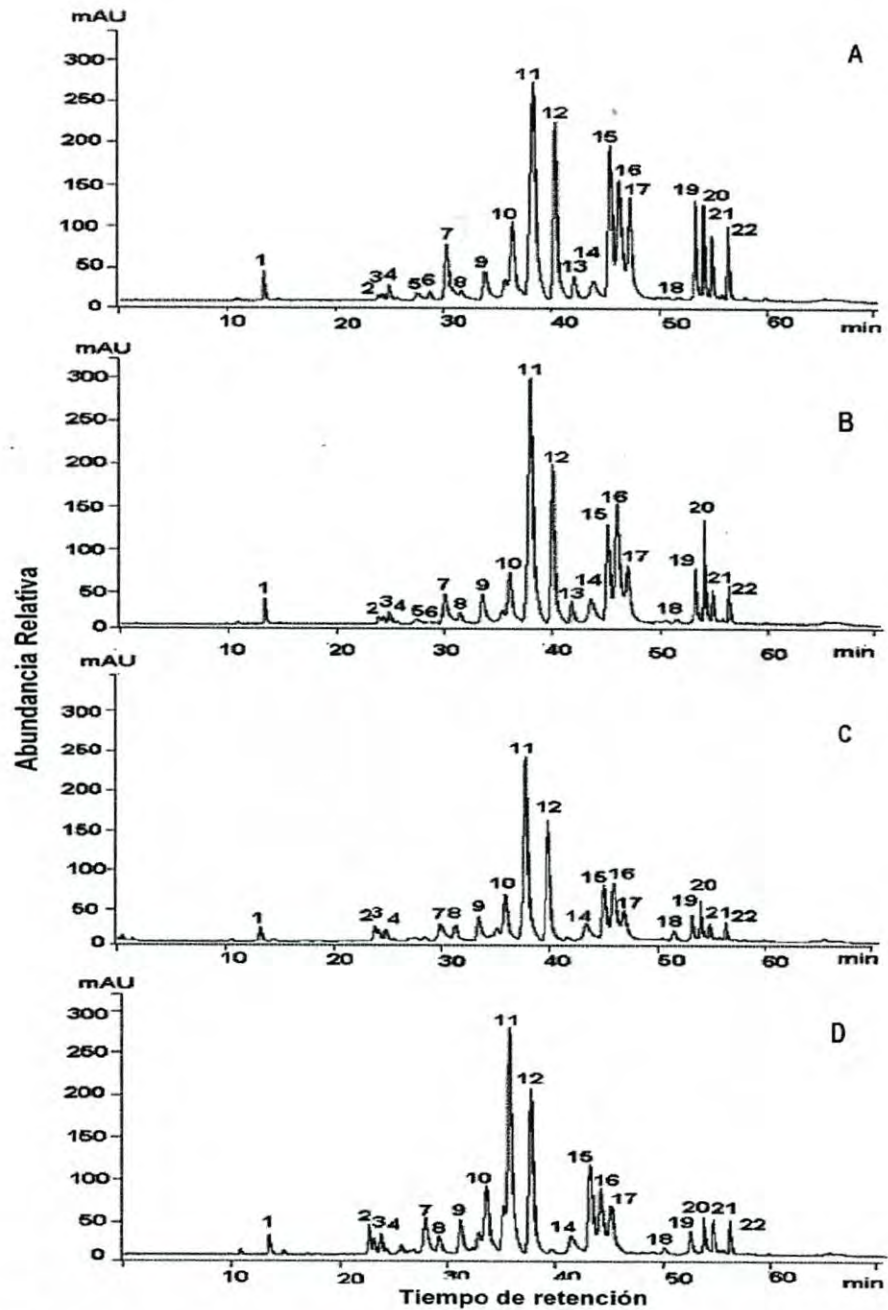


Figura 5. Cromatogramas de extractos de propóleos de Ures, Sonora recolectados durante el período 2008-2009; tomados con un detector a 340 nm. **A:** Propóleos de otoño (2008). **B:** Propóleos de invierno (2008-2009). **C:** Propóleos de primavera (2009). **D:** Propóleos de verano (2009). (Valencia y col., 2012).

Tabla VI. Abundancia relativa (%) de los constituyentes identificados en muestras estacionales de propóleos de Ures, Sonora.

Número de pico	Tiempo de Retención	Abundancia Relativa (%)			
		Verano	Otoño	Invierno	Primavera
11.- Pinocebrina	35.7 ^(v) , 38.3 ^(o) , 37.9 ⁽ⁱ⁾ , 37.8 ^(p)	21.0	20.3	23.1	22.6
12.- Pinobanksina-3-O-acetato	37.7 ^(v) , 40.3 ^(o) , 40.0 ⁽ⁱ⁾ , 39.8 ^(p)	14.3	12.2	12.8	13.6
14.- CAPE	41.5 ^(v) , 43.8 ^(o) , 43.5 ⁽ⁱ⁾ , 43.4 ^(p)	3.3	2.4	3.7	4.3
15.- Crisina	43.2 ^(v) , 45.4 ^(o) , 45.1 ⁽ⁱ⁾ , 45.0 ^(p)	8.2	10.6	7.9	6.6
16.- Galangina	44.2 ^(v) , 46.2 ^(o) , 45.9 ⁽ⁱ⁾ , 45.9 ^(p)	7.3	10.2	11.9	8.6
17.- Acacetina	45.1 ^(v) , 47.2 ^(o) , 46.9 ⁽ⁱ⁾ , 46.8 ^(p)	6.8	8.9	7.2	6.0

(v) Verano. (o) Otoño. (i) Invierno. (p) Primavera.

(Valencia y col., 2012).

***Populus fremontii* es la Principal Fuente Botánica de Propóleos de Ures, Sonora Durante las Cuatro Estaciones del Año.**

El análisis cromatográfico por RP-HPLC para las resinas extraídas de las especies botánicas *P. fremontii*, *A. ambrosioides*, *B. laxiflora* y *P. velutina* por inmersión en diclorometano se muestra en la figura 6. En ellos se puede observar que el cromatograma obtenido para *P. fremontii* (Álamo) muestra similitud con el de los propóleos provenientes de cualquiera de las estaciones anuales. Los cromatogramas de los extractos realizados por inmersión de *B. laxiflora* y *A. ambrosioides* muestran pocos picos, indicándonos la presencia de pocos compuestos capaces de absorber en el espectro UV y dispuestos superficialmente para poder ser extraídos por una inmersión de corta duración en disolventes orgánicos.

Al comparar los picos y los tiempos de retención correspondientes a los constituyentes químicos tanto en los propóleos como en las resinas extraídas de *P. fremontii*, se hace evidente la semejanza entre sus perfiles cromatográficos. Tal correspondencia en los cromatogramas de propóleos y *P. fremontii* se puede observar en la figura 7. Lo anterior orienta a pensar que la fuente botánica principal o mayoritaria de los propóleos de Ures, Sonora es la especie vegetal *Populus fremontii*, esto de acuerdo a la similitud en sus perfiles cromatográficos y a la evidente presencia de compuestos de naturaleza fenólica como pinocembrina, crisina y pinobanksina-3-O-acetato, compuestos principalmente provenientes de las especies de *Populus* (Hernández y col., 2007; Valencia y col., 2012, Bankova y col., 2000, Bankova y col., 2005).

Es importante mencionar que los cromatogramas obtenidos para las resinas *P. fremontii* en las diferentes estaciones del año se muestran estables, sugiriendo la disponibilidad de estos compuestos en sus brotes, tallos y hojas para la elaboración de los propóleos por parte de las abejas durante todo el año.

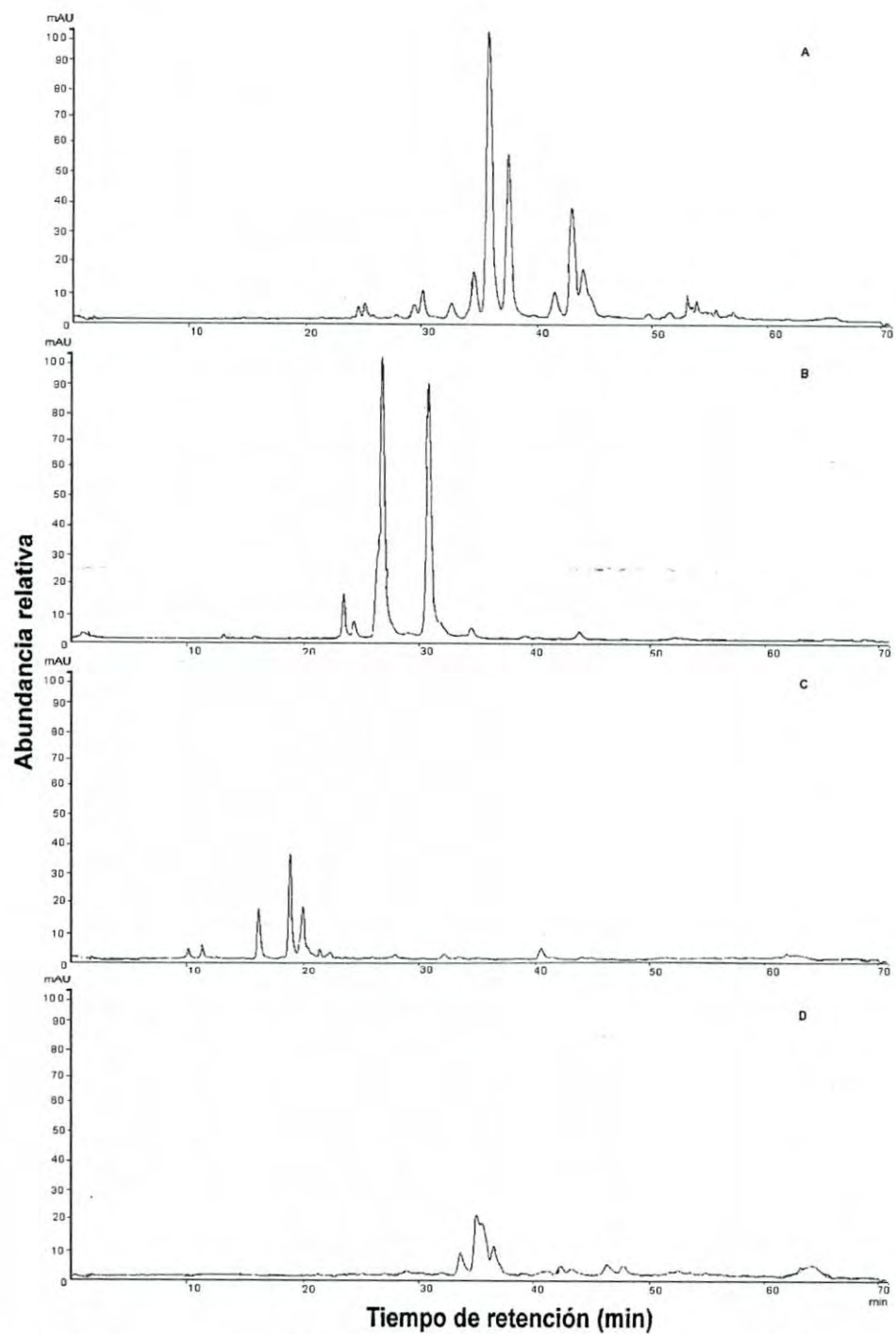


Figura 6. Perfiles cromatográficos obtenidos con un detector a 340 nm de extractos de especies botánicas por inmersión. **A:** *Populus fremontii*, **B:** *Ambrosia ambrosioides*, **C:** *Bursera laxiflora* y **D:** *Prosopis velutina*.

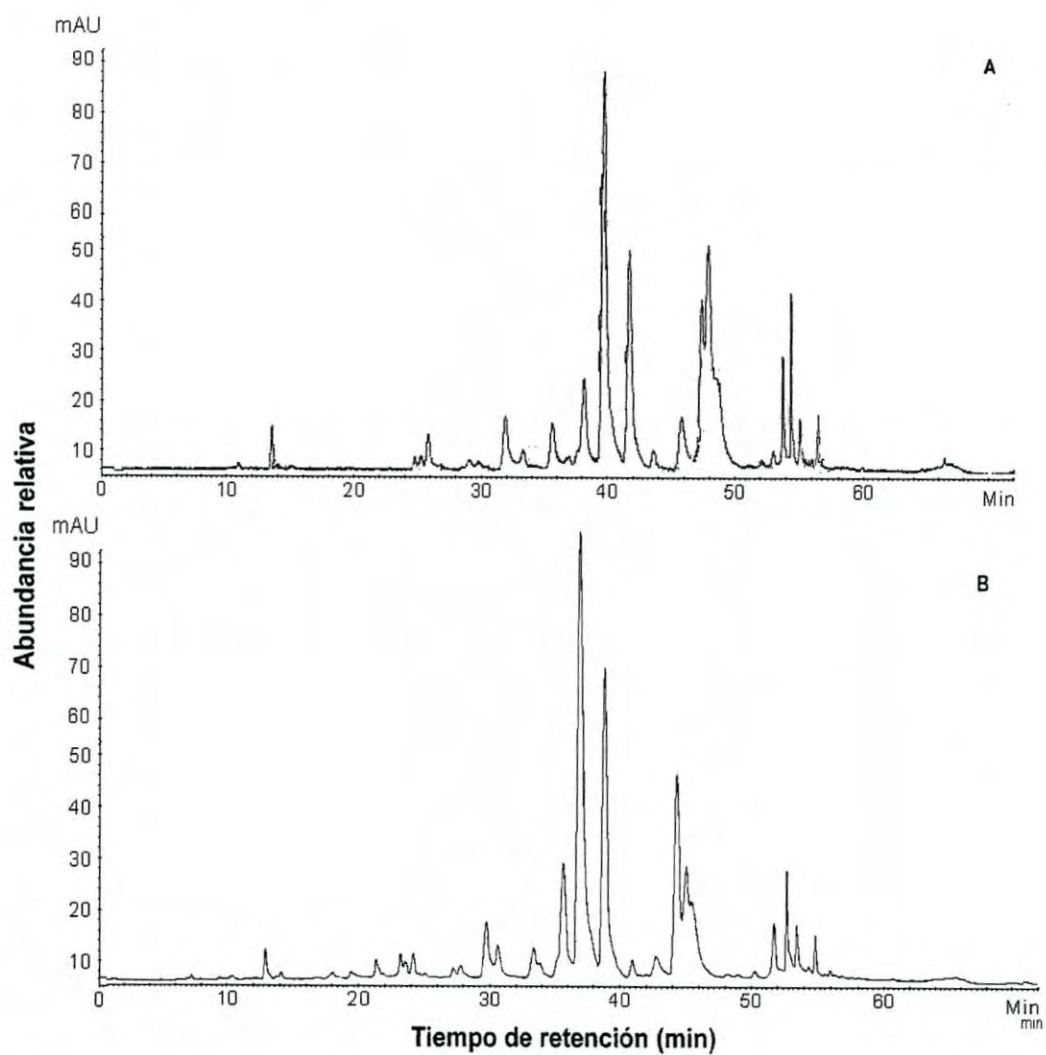


Figura 7. Comparación del perfil cromatográfico de **A:** propóleos de Ures, Sonora y **B:** de resinas extraídas de *P.fremontii*

Caracterización Química

Compuestos Químicos Identificados en Propóleos con HPLC-MS-Q-TOF

Una vez establecido que el perfil de composición química de propóleos colectados en el período 2009-2010 permanece constante en las muestras provenientes de las diferentes estaciones del año y además en dos distintos períodos de colección, se procedió a realizar un análisis por medio de espectrometría de masas para enriquecer el conocimiento acerca de los constituyentes químicos presentes y conservados en todas las muestras.

El cromatograma obtenido para los propóleos recolectados en invierno se muestra en la figura 8, donde la absorción de los constituyentes de naturaleza fenólica se registra en dos longitudes de onda, el cromatograma correspondiente al canal A en UV fue detectado a 340 nm, mientras que el del canal B en UV es el correspondiente a 280 nm. Adicionalmente se muestra el valor de la masa del ion molecular de cada uno de los picos $[M-H]^-$. Es necesario mencionar que los tiempos de retención y el valor de cada uno de los iones moleculares permanecen invariables en las diferentes muestras estacionales (Apéndices VII, VIII y IX comprenden las demás muestras estacionales).

En los cromatogramas resultantes se hizo evidente que la composición química es muy similar entre las muestras de las diferentes estaciones, razón por la cual se decidió a realizar el aislamiento, identificación y caracterización de los compuestos presentes. Inicialmente se realizó un análisis por cromatografía en capa fina con la finalidad de obtener el patrón de bandas representativo. El patrón de bandas revelado por sulfato cármico acidificado y UV de la muestra de propóleos de invierno mostró una mayor abundancia en compuestos que presentan una naturaleza química de menor polaridad, esto evidenciado con la fase $CH_3Cl : MeOH$ en proporción 98:2. La abundancia de estas bandas se observó en el frente de la placa de sílica gel. Esta situación permitió considerar a los propóleos de invierno para realizar el fraccionamiento.

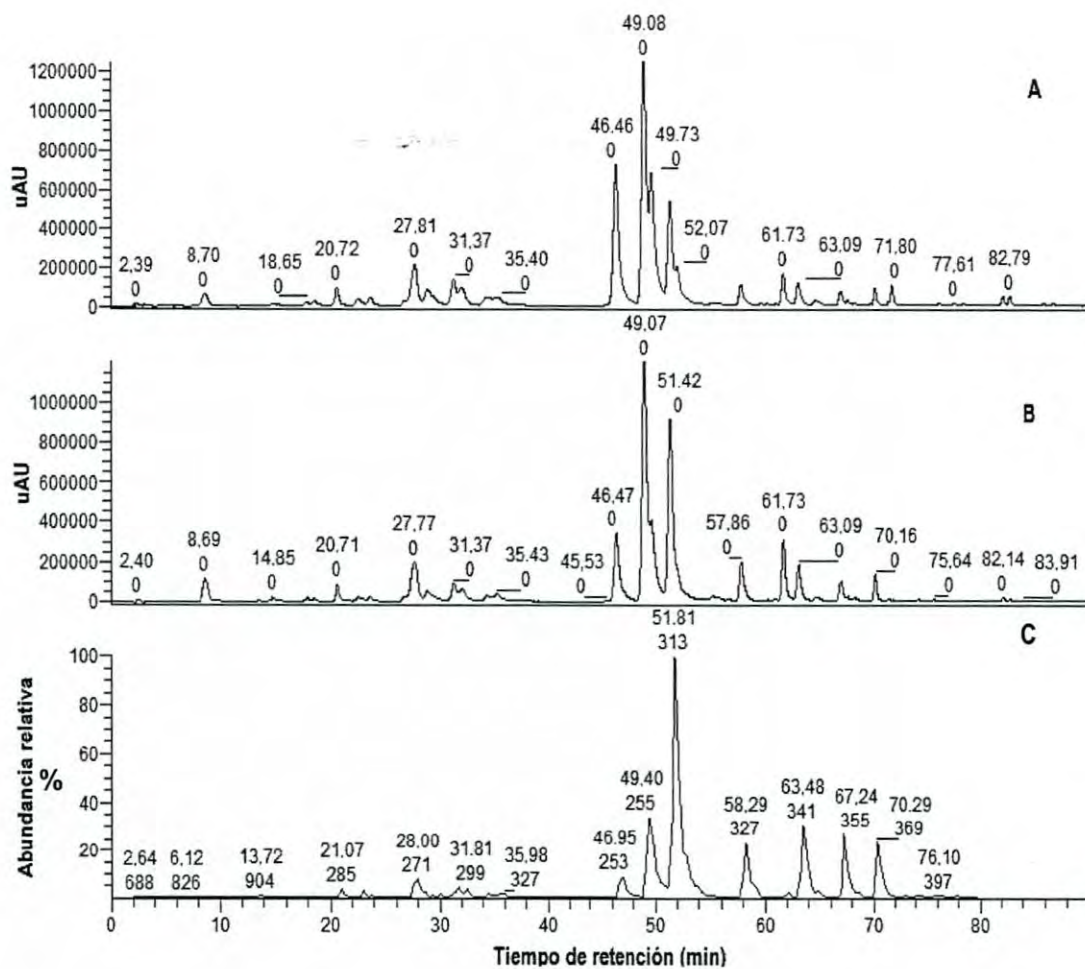


Figura 8. Cromatograma obtenido en HPLC-MS-Q-TOF para propóleos recolectados en invierno, donde **A:** registro a λ 280 nm, **B:** registro a λ 340 nm. **C:** Análisis por Espectrometría de masas, mostrando el valor de las masas completas de los compuestos.

Consecutivamente, se tomó la muestra de propóleos de invierno para ser fraccionados por cromatografía en columna a baja presión, empleando Sephadex LH-20 utilizando metanol como fase eluyente. La matriz de Sephadex LH-20 permitió la separación de los compuestos químicos con base en el criterio de exclusión molecular y la utilización de metanol generó el fraccionamiento respecto a la polaridad de dichos compuestos. Inicialmente se obtuvieron 78 fracciones, las cuales se agruparon de acuerdo a su patrón de bandas revelado en cromatografía en capa fina por medio de cámara de luz en UV y con sulfato cérico acidificado con posterior calentamiento. El número de fracciones obtenidas posterior a la reunión y su cantidad en masa se muestran en la tabla VII.

Posteriormente se analizaron en HPLC-MS-Q-TOF siete de las diez fracciones obtenidas por la separación cromatográfica, esto debido a que las primeras tres no mostraron la presencia de bandas de interés en el revelado de placa cromatográfica en TLC. El análisis de las fracciones 4-10 por espectrometría de masas permitió conocer la masa molecular y la naturaleza química de los compuestos presentes en cada fracción, para de esta manera decidir el gradiente MeOH : H₂O a utilizar en la subsecuente separación y purificación de los constituyentes químicos por HPLC semi-preparativo. La purificación de las fracciones por HPLC semi-preparativo se realizó con la finalidad de obtener los compuestos aislados, colectándolos justo al ser registrados en el cromatograma de acuerdo a la detección efectuada por la celda R401, Waters, con base en el índice de refracción (el número de subfracciones obtenidas de cada fracción original y sus cantidades se incluyen en Apéndice X). La identificación de los constituyentes químicos se realizó de acuerdo al valor de la masa molecular $[M-H]^-$ y al patrón de fragmentación de cada pico presente en los cromatogramas.

Tabla VII. Fraccionamiento cromatográfico en Sephadex LH-20 para muestras de propóleos de invierno.

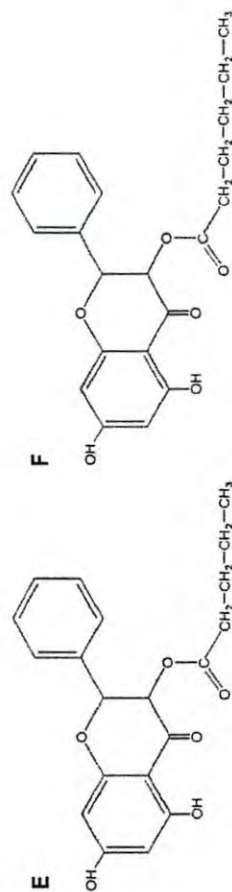
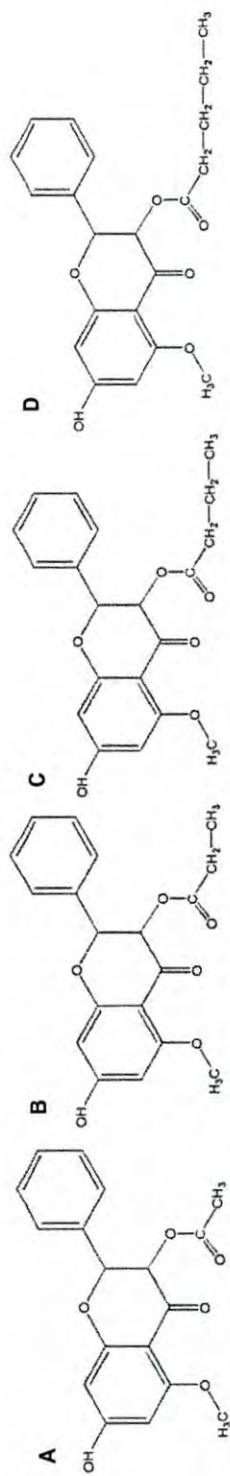
Fracción	Reunión resultante (fracciones obtenidas)	Cantidad (g)
1	1-13	0.5876
2	14-16	0.1410
3	17-17	0.1368
4	20-21	0.0709
5	22-24	0.0378
6	25-28	0.3500
7	29-35	1.1738
8	36-40	0.0471
9	41-46	0.0642
10	47-70	0.1087

Con base en las herramientas de espectrometría de masas descritas anteriormente, se realizó la identificación de 20 compuestos en las siete fracciones analizadas, todos ellos flavonoides. Los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de cada uno de estos compuestos permitieron la confirmación de su estructura, así como la consulta de estudios referentes a composición de propóleos del tipo *Populus spp.* Las figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 ilustran los cromatogramas correspondientes al análisis en HPLC-MS-Q-TOF de las fracciones 4-10 del extracto de propóleos de invierno, en estas figuras se señalan las estructuras de los compuestos presentes en cada fracción mostrando el valor de las masas moleculares $[M-H]^{-1}$, correspondiente a cada uno de ellos y señalando su respectivo tiempo de retención.

Los 20 compuestos identificados y caracterizados por HPLC-MS-Q-TOF presentes en las fracciones cromatográficas de propóleos de Ures, Sonora se pueden observar resumidos en la tabla VIII, donde se muestra la fracción de procedencia de cada compuesto, así como su tiempo de retención, su masa molecular $[M-H]^{-1}$, y los fragmentos generados al aplicar una energía de colisión del 40% de cada compuesto.

Caracterización Química de Constituyentes de Propóleos por RMN

Se realizó el análisis por RMN con la finalidad de caracterizar los compuestos presentes en las fracciones purificadas. Con ayuda de los resultados del análisis de HPLC-MS-Q-TOF se procedió a preparar las muestras para la obtención del espectro 1H por RMN de las fracciones purificadas. El espectro 1H estableció si los compuestos se encontraban aislados y purificados como para realizar la adquisición de ^{13}C y de los experimentos HSQC, HMBC y COSY y así confirmar la caracterización completa de los compuestos. Diez de los veinte compuestos fueron confirmados como aislados y purificados por un análisis en RMN.



- A. Pinobanksina-5-metil éter-3-acetato
 B. Pinobanksina-5-metil éter-3-propanoato
 C. Pinobanksina-5-metil éter-3-butirato
 D. Pinobanksina-5-metil éter-3-pentanoato
 E. Pinobanksina-3-O-penanoato
 F. Pinobanksina-3-O-hexanoato

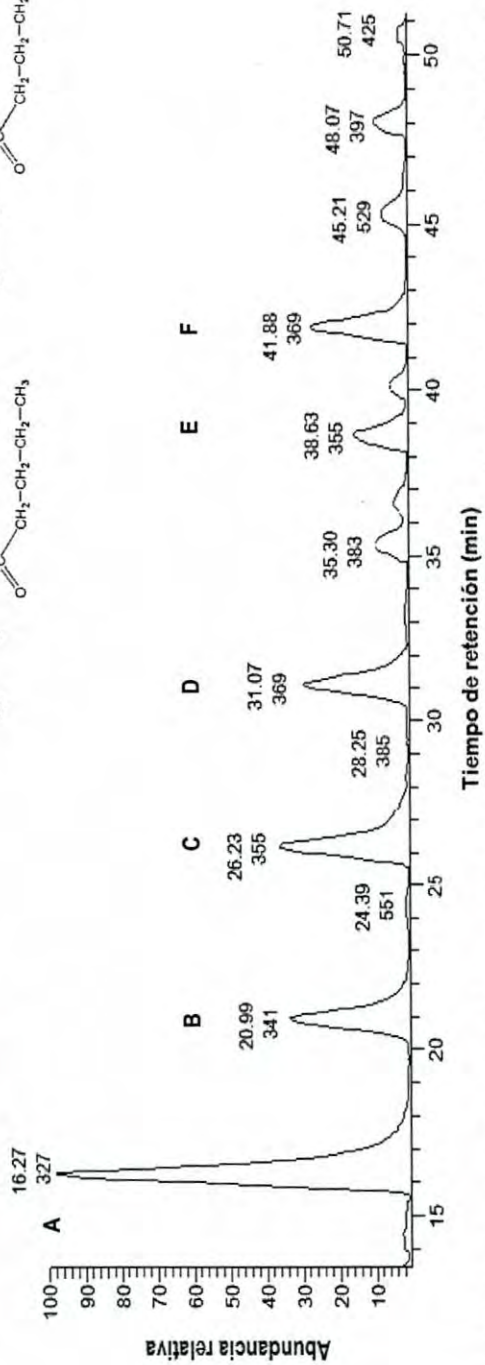
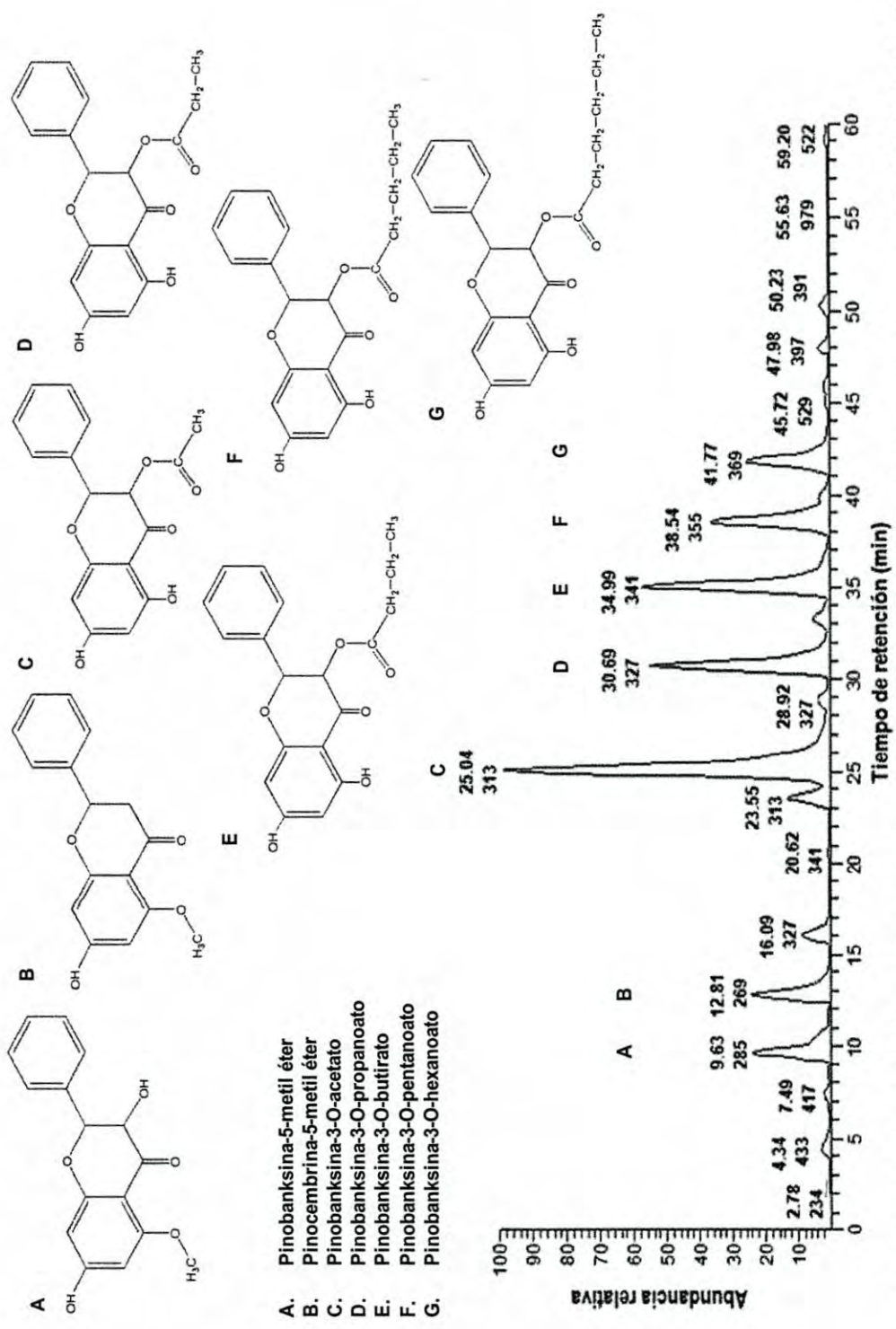


Figura 9. Compuestos identificados presentes en la Fracción 4 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.



- A. Pinobanksina-5-metil éter
- B. Pinoembrina-5-metil éter
- C. Pinobanksina-3-O-acetato
- D. Pinobanksina-3-O-propanoato
- E. Pinobanksina-3-O-butilato
- F. Pinobanksina-3-O-pentanoato
- G. Pinobanksina-3-O-hexanoato

Figura 10. Compuestos identificados presentes en la Fracción 5 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.

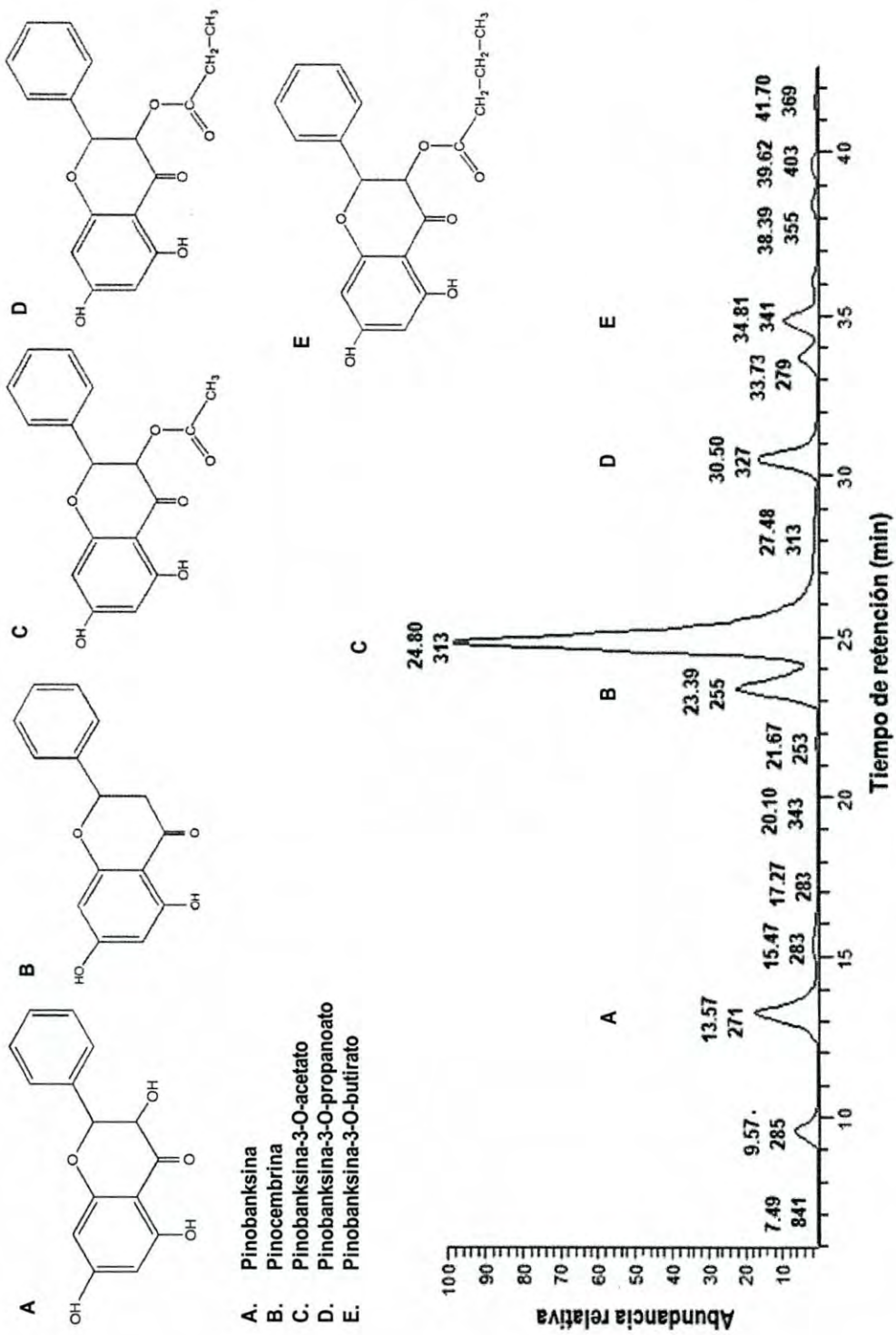


Figura 11. Compuestos identificados presentes en la Fracción 6 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.

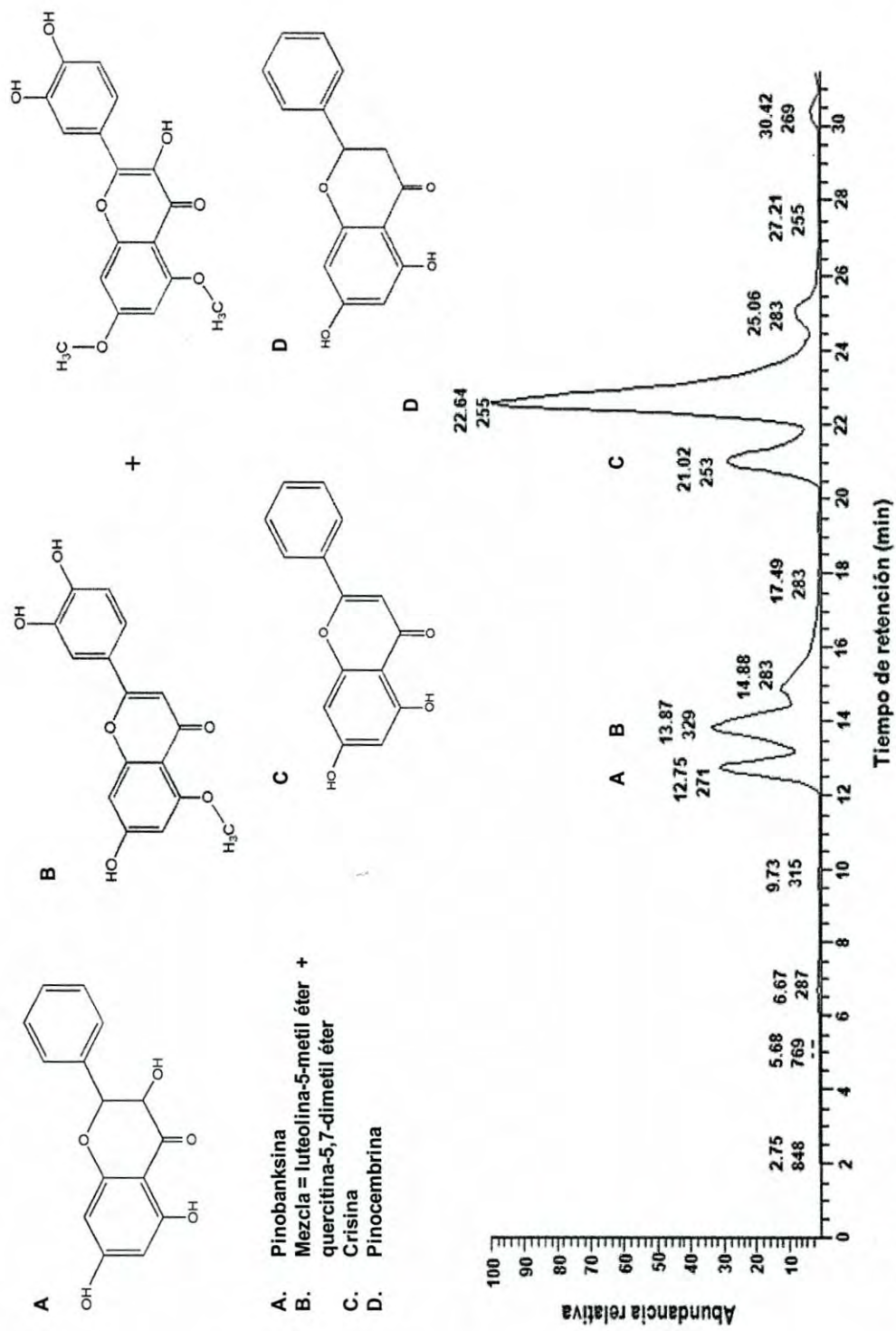


Figura 12. Compuestos identificados presentes en la Fracción 7 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.

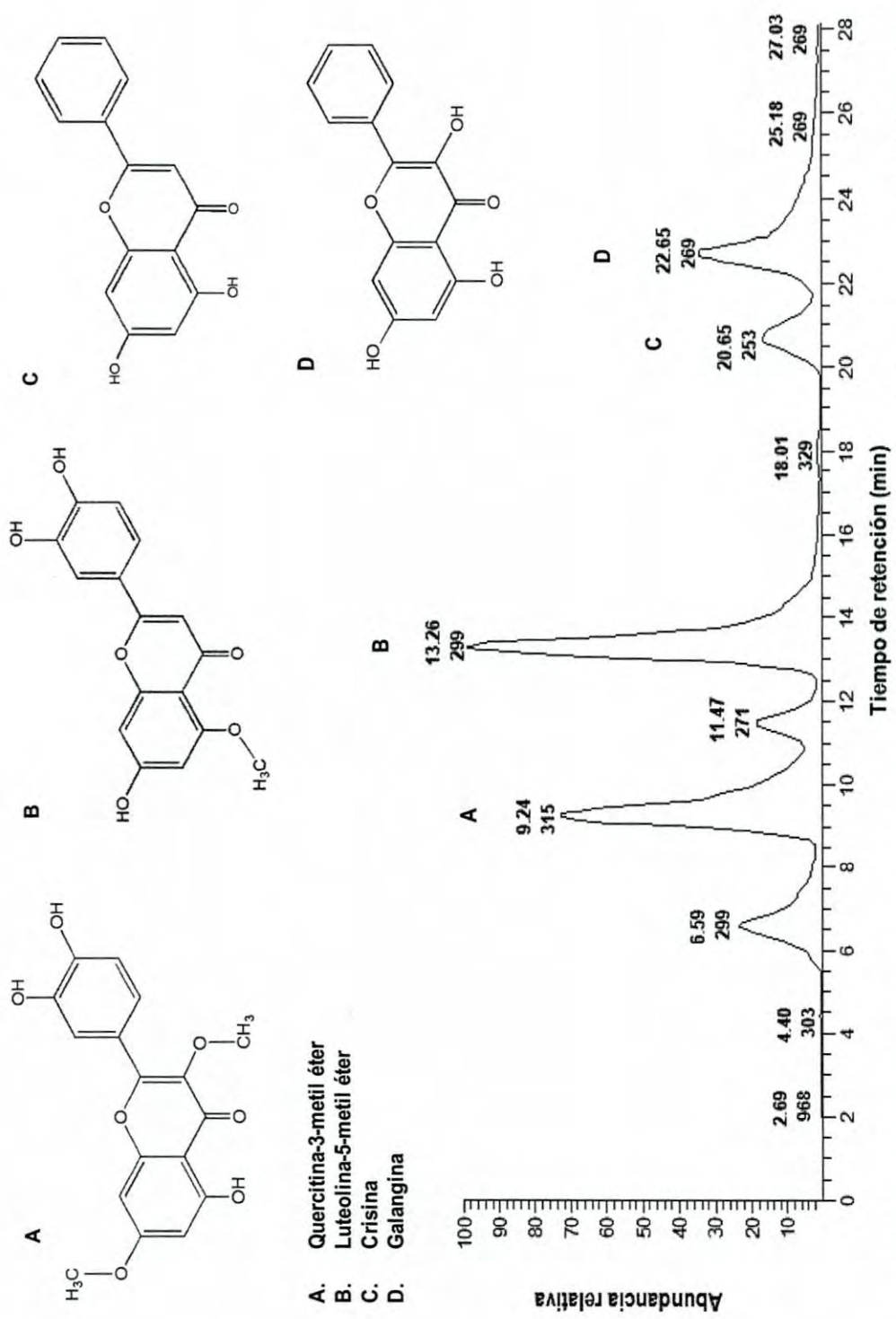
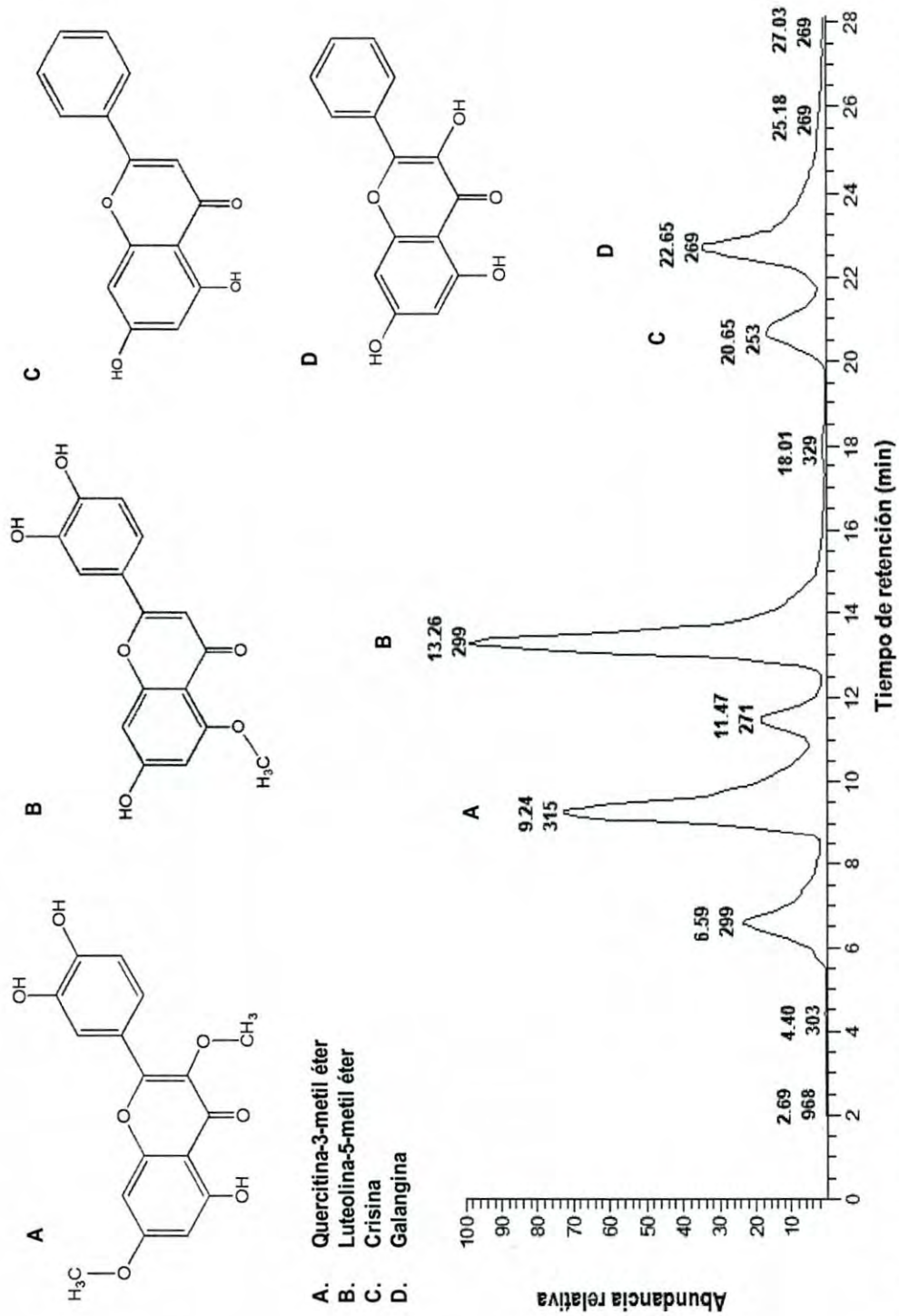
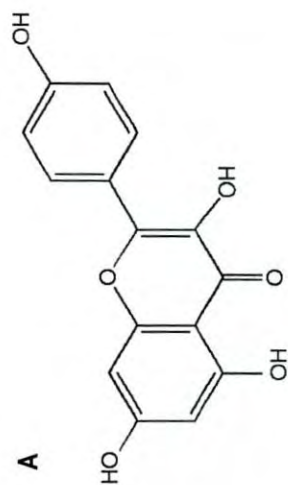


Figura 13 Compuestos identificados presentes en la Fracción 8 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.



- A. Quercitina-3-metil éter
- B. Luteolina-5-metil éter
- C. Crisina
- D. Galangina

Figura 14 Compuestos identificados presentes en la Fracción 9 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.



A. Kampferol

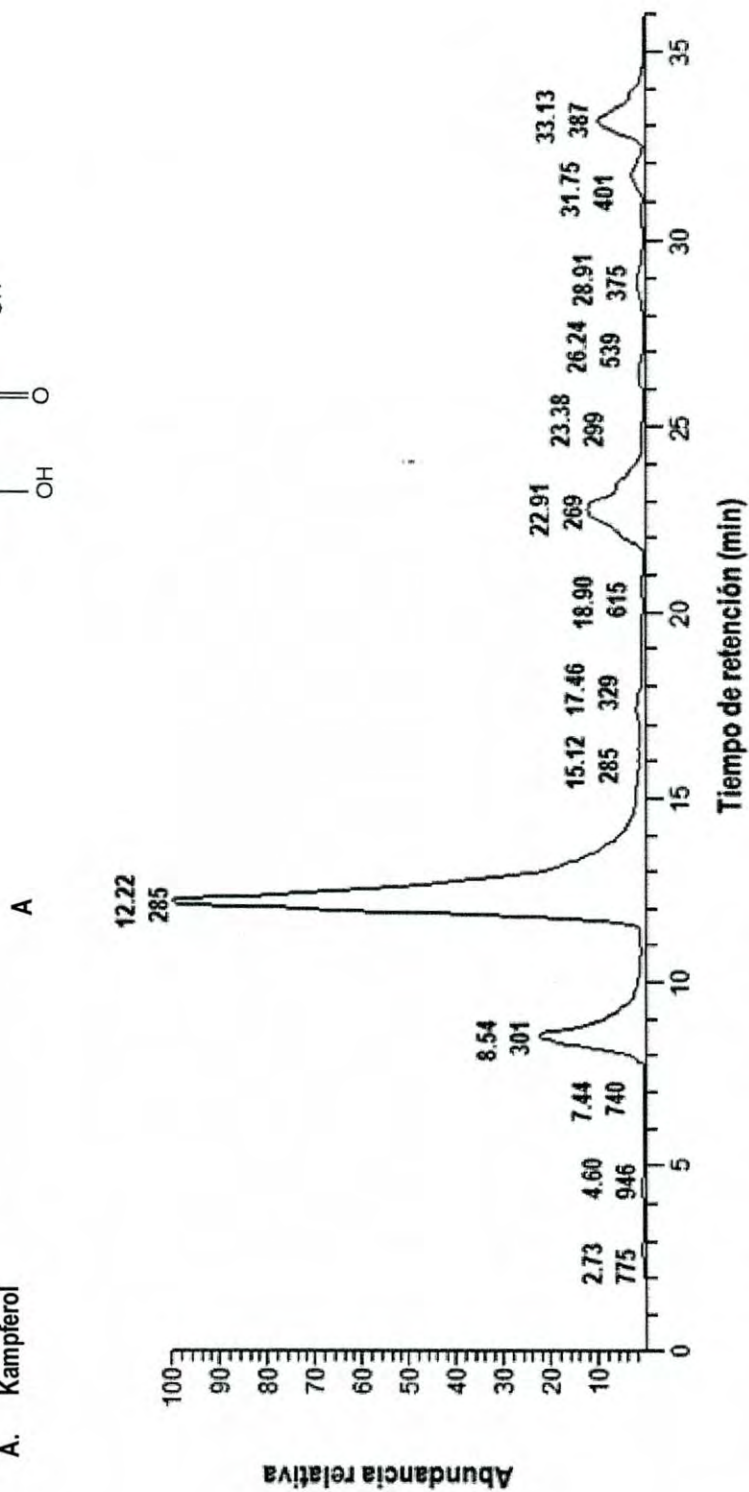


Figura 15. Compuestos identificados presentes en Fracción 10 de propóleos de invierno por HPLC-MS-Q-TOF.

Tabla VIII. Compuestos caracterizados de propóleos de Ures, Sonora

No.	Tiempo de retención (PDA)	[M-H] ⁻¹	MS/MS (40%)	Compuesto identificado	Fracción Sephadex LH-20
1	10.19	285	267, 257, 252, 239	Pinobanksina-5-metil éter	5,6
2	10.74	315	300, 271, 255	Quercitina-3 -metil éter	8,9
3	12.22	285	257, 151, 136	Kampferol	10
4	13.40	269	254, 227, 165	Pinocembrina-5-metil éter	5
5	13.91	271	253, 225, 165, 151	Pinobanksina	6,7
6	14.89	299	284, 255, 227, 151	Luteolina-5-metileter	7,8
7	15.17	329	314, 299	Quercitina -5,7- dimetil éter	7
8	16.01	269	225, 227, 151	Apigenina	9
9	16.64	327	285, 267, 239	Pinobanksina-5-metil éter-3-acetato	4
10	21.32	341	285, 267, 239	Pinobanksina-5-metil éter-3-propanoato	4
11	22.47	253	209, 151, 143	Crisina	7,8
12	24.23	255	213, 151	Pinocembrina	6,7
13	24.23	269	241, 213, 151, 143	Galangina	8,9
14	25.62	313	271, 253, 225	Pinobanksina-3-O-acetato	5,6
15	26.47	355	285, 267, 239	Pinobanksina-5-metil-3-butirato	4
16	31.12	327	271, 253, 225	Pinobaksina-3-O-propanoato	5,6
17	34.25	369	285, 267, 239	Pinobanksina-5-metil-3-pentanoato	4
18	35.37	341	271, 253, 225	Pinobanksina-3-O-butiroato	5,6
19	38.83	355	271, 253, 225	Pinobanksina-3-O-pentanoato	4,5
20	42.07	369	271, 253, 225	Pinobanksina-3-O-hexanoato	4,5,

En el caso de galangina, luteolina-5-metil éter, quercitina-5,7-dimetil éter, sólo se realizó la adquisición del espectro para ^1H , el cual se tomo como confirmatorio. En cuanto a los diez compuestos purificados y caracterizados completamente se describen como los constituyentes con el número: 1, 4, 5, 11, 12, 14, 16, 18, 19 y 20 en la tabla VIII. Los datos de los experimentos por RMN obtenidos para el compuesto pinobanksina-3-O-butirato se muestran en las figuras 16, 17, 18, 19 y 20. Mientras que de los 9 compuestos restantes se incluyen en la sección de Apéndices (Ápéndices XI - LV).

Caracterización espectroscópica de pinobaknsina-3-O-butirato. La purificación por medio de subfraccionamiento en HPLC semi-preparativo empleando una columna C8 (Phenomex) de la fracción número 5 permitió el aislamiento y caracterización del compuesto pinobanksina-3-O-butirato. El espectro de RMN (Bruker DRX-600) ^1H obtenido para pinobanksina-3-O-butirato en CD_3OD se muestra en la figura 16. El análisis de los desplazamientos químicos (δ en ppm) e integración de las señales, permitió establecer que el compuesto posee 18 hidrógenos, así como la correcta asignación de los protones en el espectro.

Los protones aromáticos del anillo B de la estructura característica de los flavonoides se muestran como dos multipletes anchos en el rango de 7.4-7.5 ppm. Estas dos señales, representan los cinco protones aromáticos típicos de un grupo fenilo monosustituido. En ellos está la señal centrada en 7.53 ppm que integra para dos protones, así como la señal en 7.43 ppm que corresponde a 3 protones. Los dos protones aromáticos del anillo A, H_6 y H_8 , muestran el mismo desplazamiento químico, asignándose a la señal centrada en 5.94 ppm. La señal de 5.42 ppm y las de 5.85 ppm son pertenecientes a los protones del anillo C, ambas señales integran para un solo protón.

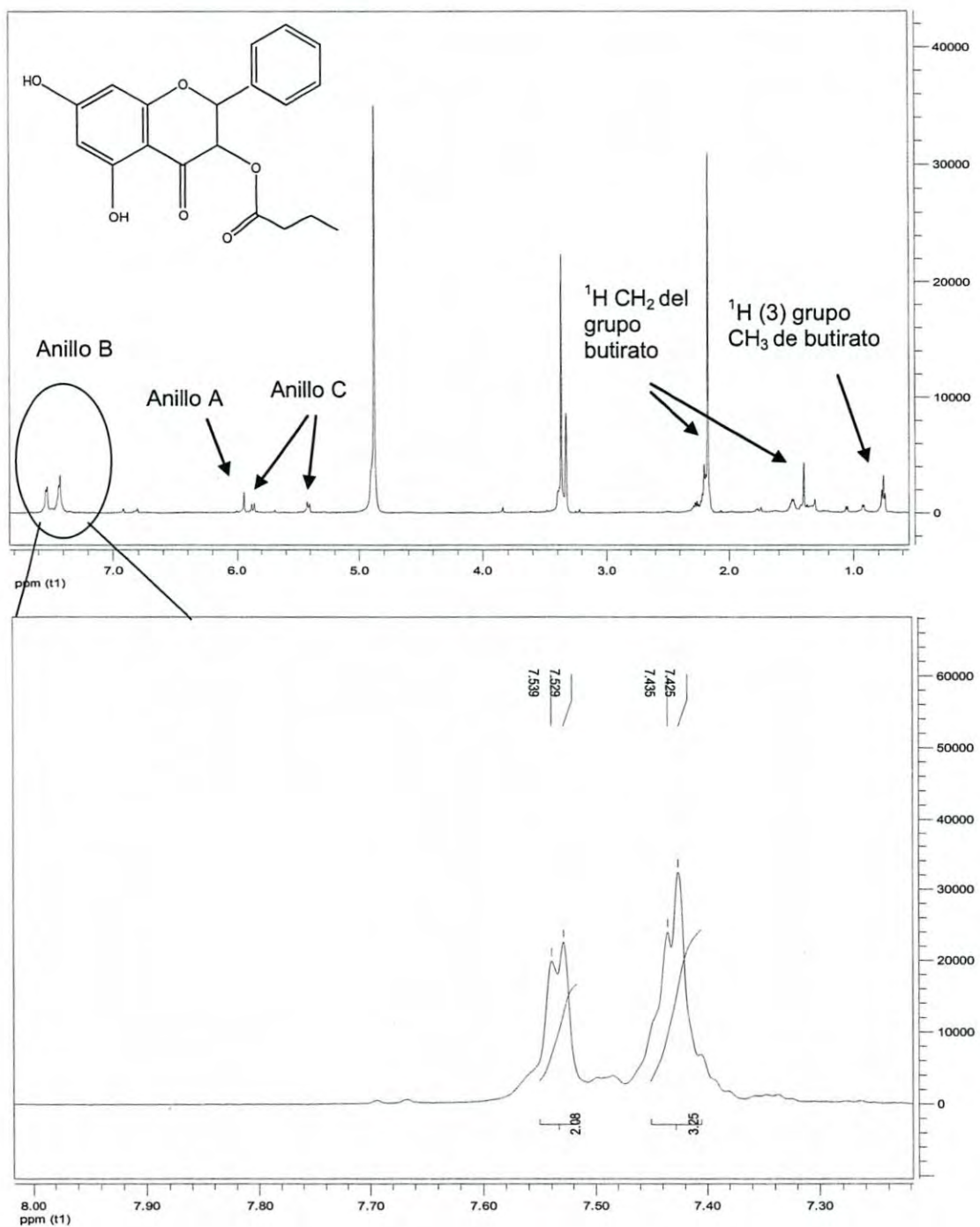


Figura 16. Caracterización de pinobanksina-3-O-butiroato. Espectro ¹H 600 MHz RMN.

Finalmente, la presencia de las señales en 2.18, 1.49, 1.40 y 0.93, las cuales integran para un protón cada una y los protones están altamente protegidos, correspondiendo a los 2 CH₂ del butirato, mientras que la señal en 0.75 ppm que integra para tres protones encontrándose altamente protegidos corresponden al grupo metilo del butirato. Las señales registradas a 4.8 y a 3.33 son las correspondientes al disolvente CD₃OD.

Los espectros bidimensionales permitieron ubicar el carbono al cual está unido directamente cada hidrógeno, así como las interacciones de éste con los carbonos que se encuentran vecinos a tres enlaces. El análisis de acoplamiento en HSQC permitió asignar inequívocamente cada una de las señales centradas previamente descritas de los protones en correlación directa con el carbono al que se encuentran enlazados. El análisis en HSQC para este compuesto se muestra en la figura 17 A. La señal de 7.53 la cual integraba para dos protones se encuentra asignada en el experimento de HSQC al carbono con un desplazamiento químico en 128.5 ppm, indicando esto que no necesariamente es el mismo carbono, sino la presencia de cierta simetría en el anillo B.

Esta simetría observada se debe a la alta velocidad de rotación del enlace de C1-C2 en relación con la frecuencia de observación del experimento de RMN, lo que conduce a que los carbonos C2' y C6' den origen a una señal, la observada en 128.5 ppm, la misma situación ocurre con los C3' y C5'. La señal 7.43 ppm, la cual integraba para tres protones se encuentra asignada en el experimento de HSQC al carbono con un desplazamiento químico en 129.5 ppm. Esta señal, pertenece de igual manera a tres carbonos correspondientes al anillo B, siendo C3', C4' y C5', los cuales se encuentran representados por una sola señal, esta situación anterior permite establecer que el compuesto en cuestión posee 18 átomos de carbono en su estructura.

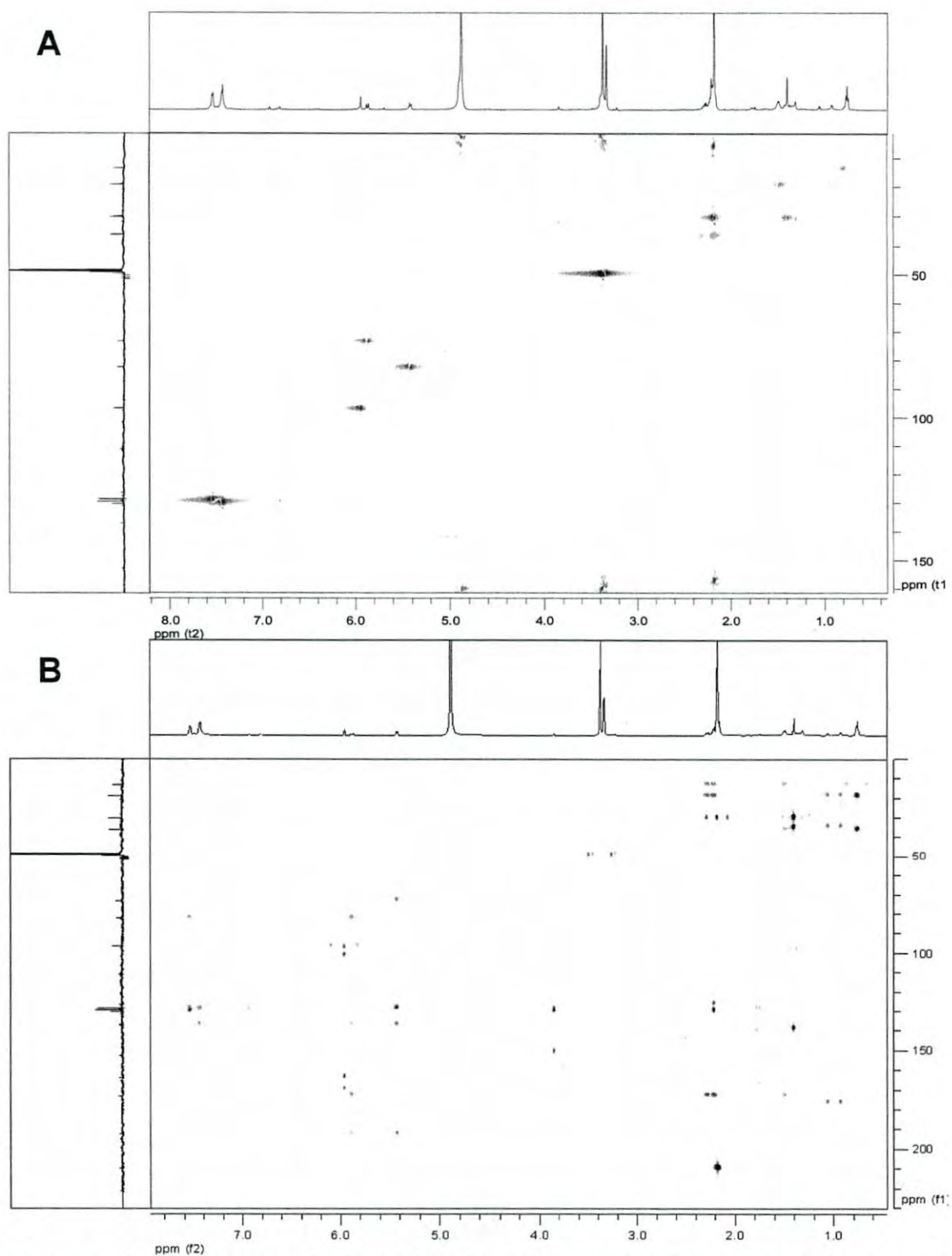


Figura 17. Espectros bidimensionales de Pinobanksina-3-O-butiroato. **A:** Espectro HSQC, **B:** Espectro HMBC.

La señal centrada en 5.94 ppm perteneciente al anillo A, se encuentra representando a los protones unidos a los carbonos que muestran un desplazamiento de 96.3 ppm, esta asignación se puede observar en el experimento HSQC, figura 17 A. La señal del protón centrada en 5.42 ppm corresponde al hidrógeno unido directamente al carbono C2 en el anillo C, mostrando un desplazamiento químico de 82.6 ppm, este carbono tiene como sustituyente el anillo B, mientras que la señal de 5.85 ppm es perteneciente al protón que se encuentra unido directamente al carbono C3 con un desplazamiento de 73.5 ppm.

El espectro bidimensional de HMBC, en la figura 17 B, permitió establecer la correlación a tres enlaces de cada protón con los carbonos vecinos, mientras que el espectro bidimensional COSY, figura 20 A, permitió establecer la correlación de protón-protón a tres enlaces.

El análisis de espectrometría de masas de la Pinobanksina-3-O-butirato, figura 18 B, muestra al ión molecular $[M-H]^- = 341$ como el más abundante, así mismo se puede observar la pérdida del butirato en C3, generando un fragmento $[M-43]^- = 271$, correspondiente a la pinobanksina. El ión con $m/z = 253$ indica la liberación de una molécula de agua correspondiente a la ruptura del grupo hidroxilo en C7. El patrón de fragmentación está de acuerdo con la estructura propuesta en la figura 19. El espectro de masas confirma la fórmula molecular de $C_{19}H_{18}O_6$ y un peso molecular de 342.

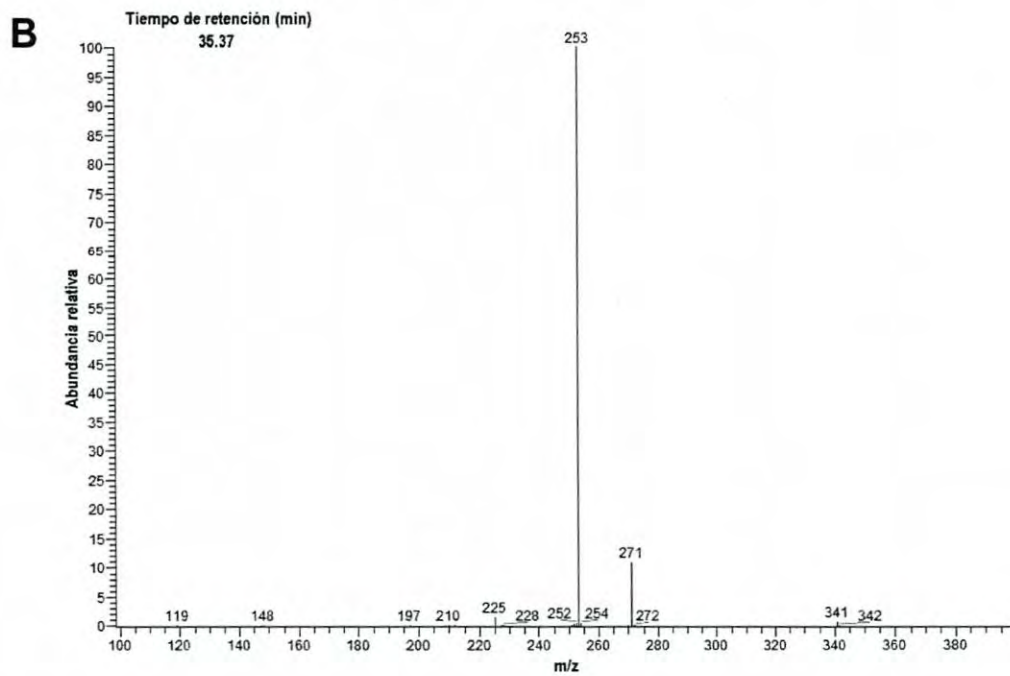
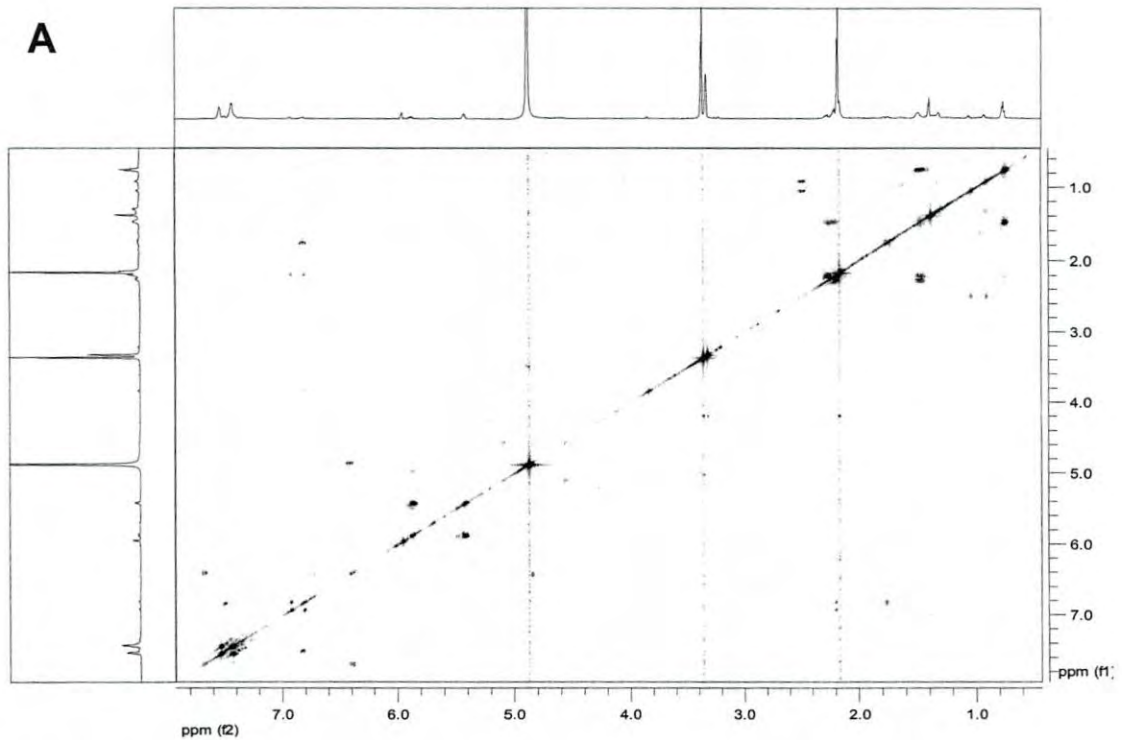


Figura 18. Pinobanksina-3-O-butiroato. A: Espectro bidimensional COSY, B: Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF.

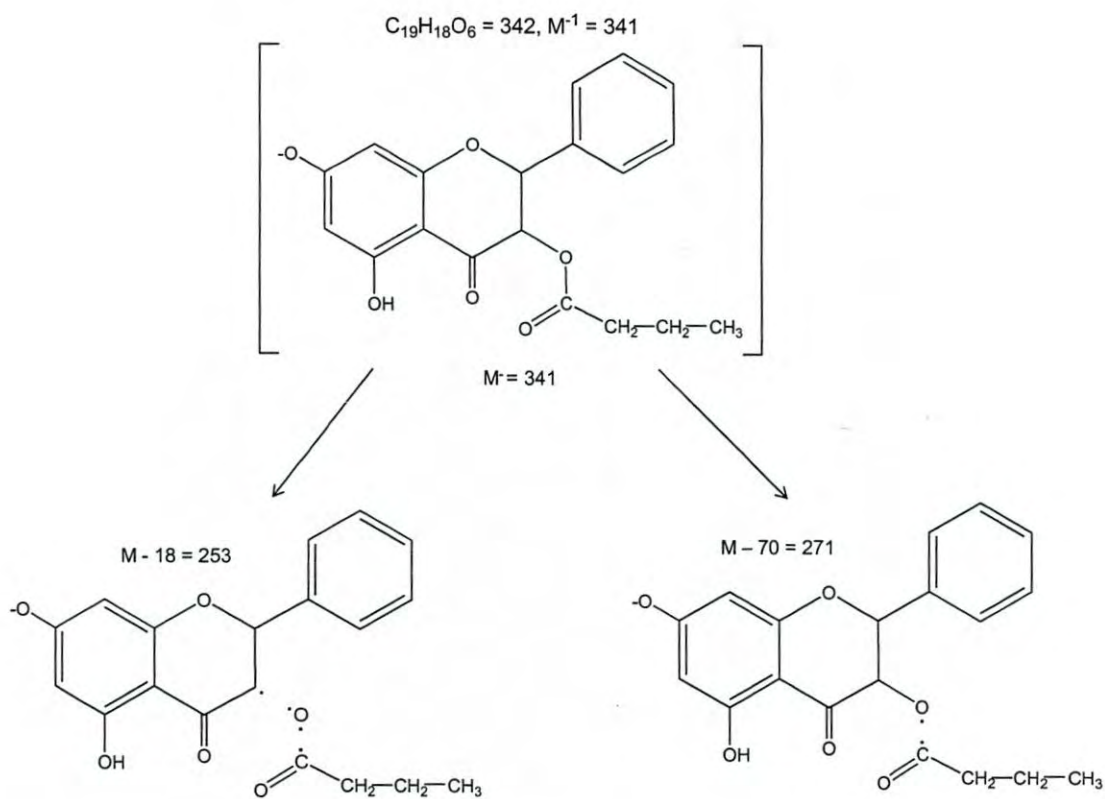


Figura 19. Patrón de fragmentación de pinobanksina-3-O-butyroato en HPLC-MS-Q-TOF.

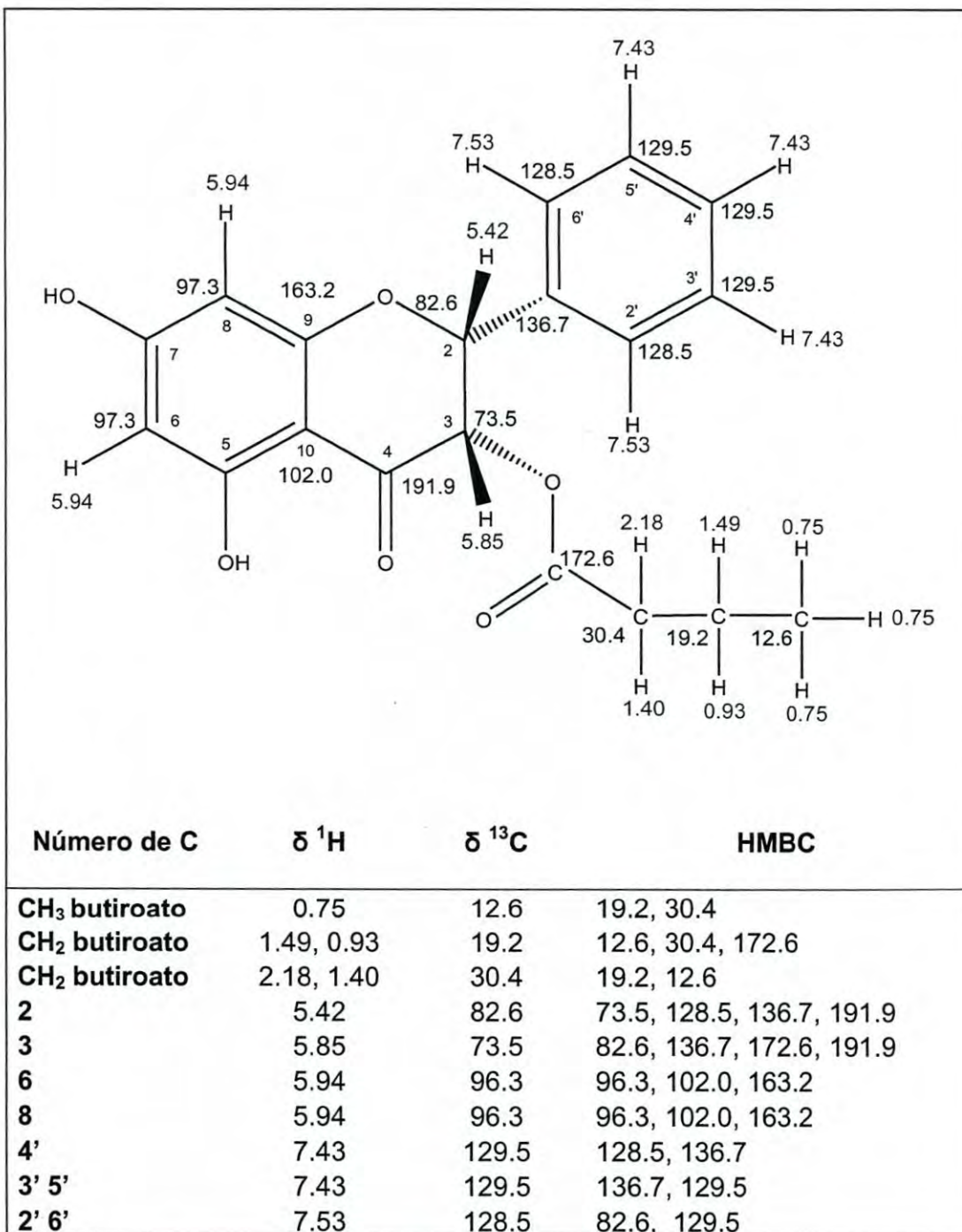


Figura 20. Estructura de pinobanksina-3-O-butiroato.

Actividad Antioxidante

Considerando que previos estudios reportan entre las actividades biológicas importantes de propóleos provenientes de Sonora, a la actividad antioxidante o estabilizadora de radicales libres (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007), por esta razón se procedió a evaluar dicha actividad biológica en los extractos resinosos obtenidos de fuentes vegetales. Se determinó la actividad antioxidante de los extractos con la finalidad de ver si la abundancia en la que se encontraban los constituyentes (en su mayoría flavonoides) tanto en los propóleos como en la resina de *P. fremontii* generaba una actividad antioxidante semejante. Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los propóleos indican una de leve capacidad de neutralización a la concentración de 100 µg/mL (Verano: 17.0 ± 0.2 , Otoño: 19.7 ± 0.6 , Invierno: 18.5 ± 0.2 y Primavera: 16.2 ± 0.4 en %), comparado con el control de vitamina C que neutraliza en un 95 % al DPPH (Valencia y col., 2012).

Sin embargo la resina de *P. fremontii* a la concentración de 100 µg/mL genera una actividad superior a la de propóleos de cualquiera de las estaciones, siendo 29.2 ± 2.0 %. Este hecho demuestra que la composición de propóleos y de exudados resinosos de *P. fremontii* desde el punto de vista cuantitativo no es del todo semejante, es decir la concentración a la que se encuentran los flavonoides, de manera general, es menor en los propóleos que en exudados resinosos de *P. fremontii*, situación que se refleja en el porcentaje de actividad antioxidante. Indicando una posible participación de exudados de otra especie vegetal en los propóleos.

En el caso de las resinas de *A. ambrosioides* y *B. laxiflora*, la actividad antioxidante resulto bastante baja a la concentración de 100 µg/mL, siendo 5.0 ± 1.3 en porcentaje para *A. ambrosioides* y 7.2 ± 0.4 para *B. laxiflora*.

Actividad Antiproliferativa

La Temporalización Tiene un Efecto Sobre la Actividad Antiproliferativa de Propóleos

Se determinó la actividad antiproliferativa *in vitro* de los extractos de propóleos y de las especies vegetales de Ures, Sonora, evaluándose las concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ en las líneas celulares M12A^k.C3.F6 y L-929 (línea celular no cancerosa utilizada como control). Los extractos metanólicos de propóleos colectados en cada una de las respectivas estaciones del año mostraron tener actividad antiproliferativa significativa en la línea celular cancerosa M12A^k.C3.F6. Sin embargo, los propóleos elaborados durante primavera (10.1 ± 1.6) e invierno (8.1 ± 1.8) manifestaron el mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de células cancerosas *in vitro* en comparación con los provenientes de verano (38.6 ± 1.0) y otoño (28.4 ± 0.7). Se incluyó a CAPE (constituyente químico de los propóleos de Ures, Sonora) y a las drogas citotóxicas 5-fluorouracilo, doxorubicina y colchicina como controles (Tabla IX).

Adicionalmente se muestra en la tabla X la actividad antiproliferativa de los propóleos colectados en el período 2008-2009, donde se puede observar que el orden de actividad antiproliferativa de las muestras de propóleos en la línea celular M12.C3.F6 fue: primavera ($11.6 \pm 4.6 \mu\text{g/mL}$) > invierno ($26.6 \pm 11.5 \mu\text{g/mL}$) > verano ($49.7 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) \approx otoño ($54.5 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$) (Valencia y col., 2011). Estos resultados sugieren que la actividad antiproliferativa ejercida por dichos propóleos en la línea celular M12A^k.C3.F6 se mantiene en un orden constante en dos distintos períodos anuales de colecta, indicando que la composición química de dichos propóleos es similar en las mismas estaciones de dos años diferentes, pero no entre las estaciones de un mismo período, al menos en lo que respecta a los compuestos bioactivos, específicamente con efecto antiproliferativo, aspecto que contrasta con los datos obtenidos para el análisis cromatográfico de los propóleos.

Tabla IX. Actividad antiproliferativa de propóleos de Ures, Sonora período 2009-2010 expresada en términos de IC₅₀.

Extractos de propóleos	IC ₅₀ (M12A ^k .C3.F6)		Inducción de cambios morfológicos
	(IC ₅₀)	(IC ₅₀)	
Propóleos de primavera 2009	8.1 ± 1.8		+++
Propóleos de Invierno 2009 - 2010	10.1 ± 1.6		+++
Propóleos de verano 2010	38.6 ± 1.0		
Propóleos de Otoño 2010	28.4 ± 0.7		
Colchicina	<0.5 uM		++++

Tabla X. Actividad antiproliferativa de propóleos de Ures, Sonora período 2008-2009 expresada en términos de IC₅₀.

Especie vegetal	IC ₅₀ (µg/mL o µM)		Inducción de cambios morfológicos (formas largas)
	M12A ^k .C3.F6	L-929	
Propóleos de primavera	11.6 ± 4.6	56.7 ± 13.2	+++
Propóleos de Invierno	26.6 ± 11.5	50.7 ± 7.6	+++
Propóleos de verano	49.7 ± 1.4	51.0 ± 3.0	
Propóleos de Otoño	54.5 ± 2.5	54.6 ± 5.1	
CAPE ^b	1.6 ± 0.5	> 100	
5- Flouorouacilo ^b	1.9 ± 0.6	> 100	
Colchicina ^b	ND	> 100	++++
Doxorrubicina ^b	0.6 ± 0.01	ND	

Los valores de IC₅₀ para los extractos de propóleos expresados en µg/mL o compuestos control en µM representan la media de al menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^b CAPE, 5-fluorouracil, colchicina y doxorubicina fueron utilizados como controles positivos en los ensayos.

(ND) No determinado. (Valencia y col., 2011).

Estos resultados indican que a pesar de la similitud de los perfiles cromatográficos de muestras de propóleos de las diferentes estaciones, la concentración de compuestos con actividad antiproliferativa se ve favorecida en las muestras procedentes de las estaciones de invierno y primavera, optimizando su actividad. Todos los extractos de propóleos mostraron una disminución en el efecto antiproliferativo en la línea celular murina normal L-929 ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$), tabla X.

Los Propóleos Elaborados en Invierno y Primavera Inducen Cambios Morfológicos Característicos en la Línea Celular M12A^K.C3.F6

Es relevante mencionar que sólo los extractos de propóleos colectados en las estaciones de invierno y primavera fueron capaces de inducir en las células cancerosas cambios morfológicos particulares y fácilmente observables a las 24 horas de incubación, cambios similares a los inducidos por compuestos desestabilizantes (colchicina, nocozadol y vinca alcaloides) de los microtúbulos (Perez, 2009). Estos cambios se observan a partir de las seis horas de incubación con los extractos de propóleos muestreados en primavera e invierno. Se pueden percibir como una estructura celular extendida, un aparente reflejo de la inhibición de la última fase de la mitosis en el ciclo celular, proceso que da lugar a dos células hijas independientes.

Sugiriendo estas observaciones un probable mecanismo de acción en la inhibición de la proliferación celular, el cual pudiera involucrar como blanco de acción la tubulina. Asumiendo esto debido a la presencia de compuestos altamente antiproliferativos y exclusivos en los propóleos colectados en primavera e invierno, o simplemente la presencia de estos en una concentración nulamente efectiva para evidenciar dichos cambios en los propóleos de verano y otoño. En las tablas IX y X se muestra en cruces la capacidad de inducción de cambios morfológicos de los propóleos, representando cuatro cruces la observación de al menos el 80% de estos cuerpos celulares en comparación con

la morfología convencional de la línea celular M12A^k.C3.F6 en un campo óptico determinado. Mientras que tres cruces representan el 60%. Los valores expresados representan la media de al menos tres experimentos independientes.

Los Extractos de Especies Vegetales de Ures, Sonora Presentan Efecto Antiproliferativo.

En cuanto a la actividad antiproliferativa de los diez extractos metanólicos convencionales de las especies botánicas colectadas, siete de ellos mostraron tener una actividad antiproliferativa significativa, siendo: *Prosopis velutina*, *Parkinsonia praecox*, *Populus fremontii*, *Ambrosia ambrosioides*, *Jacquinia macrocarpa*, *guaiacum coulteri* y *Bursera laxiflora*. El extracto de *Prosopis velutina* mostró tener el mayor efecto inhibitorio sobre la proliferación celular ($9.6 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$) en la línea celular M12A^k.C3.F6Tabla XI. Sólo el extracto de *Populus fremontii* mostró tener una importante disminución de su efecto inhibitorio en la proliferación en la línea celular control L-929. Los valores expresados, al igual que en todas las tablas, representan la media de al menos tres experimentos independientes.

De los diez extractos evaluados, únicamente los de las especies de *Bursera laxiflora* y *Ambrosia ambrosioides* fueron capaces de inducir cambios morfológicos similares a los inducidos por los compuestos desestabilizantes de los microtúbulos y por los propóleos de Ures, Sonora colectados en primavera e invierno. A las 24 horas de incubación, el extracto de *Bursera laxiflora* a la concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ induce aproximadamente un 60% de estos cambios morfológicos en comparación con las células totales al observar 3 campos aleatorios a 200X en el microscopio invertido, mientras que el extracto de *Ambrosia ambrosioides* induce un 40% de estos cambios a la concentración de $12.5 \mu\text{g/mL}$, señalándose el alto efecto antiproliferativo de esta planta. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XI.

Tabla XI. Actividad antiproliferativa de extractos metanólicos convencionales de especies vegetales reportada en IC₅₀.

Especie vegetal	IC ₅₀ (µg/mL o µM)		Inducción de cambios morfológicos (formas largas)
	M12A ^k .C3F6	L-929	
<i>Prosopis velutina</i>	9.6 ± 0.9	36.7 ± 10.0	
<i>Parkinsonia praecox</i>	27.6 ± 4.5	35.9 ± 3.8	
<i>Populus fremontii</i>	34.98 ± 9.1	108.9 ± 9.4	
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	38.0 ± 5.7	44.3 ± 6.2	++
<i>Juacquinia macrocarpa</i>	41.9 ± 3.8	43.5 ± 0.7	
<i>Guaiaacum coulteri</i>	44.4 ± 1.5	58.9 ± 4.3	
<i>Bursera laxiflora</i>	47.8 ± 5.1	67.8 ± 4.3	++
<i>Olneya tesota</i>	51.5 ± 13.8	57.0 ± 3.9	
<i>Jatropha cardiophyllia</i>	59.2 ± 11.1	119.6 ± 5.3	
<i>Acacia farneciana</i>	94.2 ± 8.8	166.3 ± 2.9	
5 – FU ^b	2.5 ± 0.6	□ 100	
Doxorubicina ^b	0.5 ± 1.0	□ 1.0	
CAPE ^b	6.0 ± 0.8	□ 100	

^a Los valores de IC₅₀ para los extractos de propóleos expresados en µg/mL y compuestos control en µM representan la media de al menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^b CAPE, 5-fluorouracilo, colchicina y doxorubicina fueron utilizados como controles positivos en los ensayos (µM).

Las Resinas Vegetales Poseen Actividad Antiproliferativa en todo el año

Se determinó la actividad antiproliferativa *in vitro* del material resinoso extraído de las especies vegetales *P. fremontii*, *A. ambrosioides*, *B. laxiflora* y *P. velutina* frente a la línea celular M12A^K.C3.F6 en la misma gama de concentraciones evaluada para los extractos de especímenes vegetales completos. Los resultados de las resinas vegetales exudadas en las cuatro estaciones del año y extraídas por inmersión en diclorometano (otoño) y metanol (invierno, primavera y verano) se resumen en la tabla XII. Los resultados confirman la presencia de compuestos con importante actividad antiproliferativa en las resinas superficiales y biodisponibles para las abejas en las especies circundantes a las colmenas durante todo el período 2009-2010. Es importante notar que en dos de estas cuatro especies vegetales se intensificó su actividad biológica en comparación con la extracción convencional, *Ambrosia ambrosioides* y *Bursera laxiflora*, mientras que en *Prosopis velutina* se disminuyó.

Un hecho relevante es que en las resinas de *Bursera laxiflora* y *Ambrosia ambrosioides* se intensifica la capacidad de inducción de cambios morfológicos característicos en comparación con los extractos metanólicos convencionales. Lo anterior puede ser debido a la ausencia de compuestos provenientes de otras partes de las plantas que afecten la concentración (disminuyéndola) de compuestos activos en el extracto resinoso (tabla XII). De acuerdo a los resultados anteriores, la extracción de metabolitos secundarios con actividad antiproliferativa en exudados superficiales fue adecuada empleando diclorometano.

Con el propósito de encontrar el disolvente orgánico más apropiado para realizar la extracción de las resinas ricas en compuestos capaces de inhibir la proliferación de células cancerosas producidas por las cuatro especies vegetales se emplearon tres distintos disolventes con un diferente índice de polaridad.

Tabla XII. Actividad antiproliferativa reportada en IC₅₀ para las resinas de cada especie vegetal en las diferentes estaciones anuales en el período 2009 – 2010.

Resinas vegetales	Otoño		Invierno		Primavera		Verano	
	IC ₅₀ (µg/mL)	I.C.M.	IC ₅₀ (µg/mL)	I.C.M.	IC ₅₀ (µg/mL)	I.C.M.	IC ₅₀ (µg/mL)	I.C.M.
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	8.3 ± 0.9	+++	0.2 ± 0.1	+++	32.7 ± 1.0	+++	5.4 ± 3.8	+++
<i>Populus fremontii</i>	54.0 ± 3.6		29.6 ± 5.6		22.1 ± 2.1		47.1 ± 1.0	
<i>Bursera laxiflora</i>	31.8 ± 6.3	++	62.5 ± 9.5	++	52.4 ± 6.8	++	37.4 ± 1.2	++
<i>Prosopis velutina</i>	35.8 ± 3.4		31.8 ± 1.8		34.8 ± 3.2		39.5 ± 2.0	
Compuesto control			IC₅₀ (µg/mL)				I.C.M.	
5 – FU ^b			0.2 ± 0.0					
Doxorubicino ^b			0.3 ± 0.0					
CAPE			0.5 ± 0.1					
Colchicina			<0.3				+++	

I.C.M. Inducción de Cambios Morfológicos expresada en cruces.

La actividad antiproliferativa se ve optimizada en las resinas extraídas con metanol, en el caso de *P. fremontii*, mientras que con *A. ambrosioides* prácticamente es la misma situación con los tres disolventes. Para *B. laxiflora* resulta optimizarse la actividad antiproliferativa con la extracción con acetato de etilo, situación opuesta a la de *P. velutina* (Apéndices LXVIII – LXXI). Estas diferencias en la actividad antiproliferativa de las resinas extraídas con distintos disolventes indican que la naturaleza química de los constituyentes bioactivos de cada planta es diversa. Sin embargo, la capacidad de inducción de cambios morfológicos permanece constante en las resinas extraídas de *A. ambrosioides* y *B. laxiflora* al emplear los tres disolventes.

Los resultados anteriores favorecieron en la decisión para la utilización del metanol como disolvente ideal para este método de extracción. Es importante señalar que los extractos de resinas obtenidos para *A. ambrosioides* mostraron la actividad antiproliferativa y citotóxica más elevada en comparación con los demás extractos. Principalmente se observó este efecto en *A. ambrosioides* al ser sometida a un extracción por inmersión en metanol. Siendo su efecto antiproliferativo comparable al de los compuestos empleados como controles positivos en el ensayo al expresar su IC_{50} en términos de $\mu\text{g/mL}$ (Doxorubicina = 0.44, CAPE = 0.45, 5-FU = 0.33 $\mu\text{g/mL}$), confirmando así la alta inhibición de la proliferación por los compuestos presentes en las resinas de *A. ambrosioides*, los cuales, de acuerdo al perfil cromatográfico obtenido para sus resinas parecen estar comprendidos por un pico de mayor abundancia y dos de menor (Apéndice III).

En el caso de las resinas de *A. ambrosioides* la actividad antiproliferativa se ve disminuida en la colecta correspondiente a primavera, posiblemente atribuido a modificaciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios en la especie vegetal, mientras que en las demás prácticamente se conserva dicha actividad biológica.

En cuanto a *P. fremontii* se puede concluir que si bien la composición en términos de metabolitos secundarios permanece en cierta manera constante en sus exudados y resinas, esto durante las cuatro estaciones del año, también resulta evidente que las resinas colectadas en verano y otoño mostraron el menor efecto en la inhibición de la proliferación de células cancerosas *in vitro*. Resultados que concuerdan con los obtenidos para propóleos, en cuanto a la temporalización en la actividad antiproliferativa. Todas las resinas estacionales mostraron disminuir su efecto inhibitorio en la proliferación sobre la línea celular control L-929. Tabla XIII

Las Fracción 4 de Propóleos de Ures, Sonora Posee un Efecto Antiproliferativo e Induce Cambios Morfológicos *in vitro*.

Con el interés de indagar al respecto de los compuestos químicos responsables del efecto antiproliferativo de los propóleos de Ures, Sonora en células cancerosas *in vitro* y en la inducción de cambios morfológicos se evaluó la actividad antiproliferativa de las diez fracciones (reuniones) obtenidas por cromatografía en Sephadex LH-20, estos resultados se muestran en la tabla XIV. Sólo la fracción número cuatro mostró una IC₅₀ menor que la original los propóleos de invierno, indicando la presencia de manera concentrada de los compuestos responsables de esta actividad biológica. La mayoría de las fracciones mostraron una actividad disminuida con respecto a los propóleos originales. Así mismo, sólo tres fracciones, la fracción 3, 4 y 5 tuvieron la capacidad de generar cambios morfológicos característicos a los de los propóleos y colchicina.

Los Constituyentes Químicos Caracterizados y Purificados de los Propóleos de Ures, Sonora Muestran Actividad Antiproliferativa *in vitro*.

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los trece compuestos previamente purificados y caracterizados a la concentración de 50 µM.

Tabla XIII. Actividad antiproliferativa reportada en IC₅₀ para las resinas de cada especie vegetal en la línea celular L-929.

Especie vegetal	IC ₅₀ (µg/mL)	Inducción de cambios morfológicos (formas largas)
	L-929	
<i>Prosopis velutina</i>	44.2 ± 4.0	
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	55.5 ± 7.7	
<i>Populus fremontii</i>	55.2 ± 8.3	
<i>Bursera laxiflora</i>	107.2 ± 0.1	
5 – FU	□ 10	
Doxorubicina	N.D.	
CAPE	□ 30	
Colchicina	□ 40	

Los valores de IC₅₀ para los extractos de propóleos y compuestos control expresados en µg/mL, representan la media de al menos tres experimentos independientes ± desviación estándar.

CAPE, 5-fluorouracilo, colchicina y doxorubicina fueron utilizados como controles positivos en los ensayos (µg/mL).

N.D. No determinado.

Cinco de los compuestos mostraron un efecto sobre la proliferación en la línea celular M12A^k.C3F6 a dicha concentración. Con la finalidad de determinar el valor de IC_{50} de los 5 compuestos activos se evaluó una gama de concentraciones (7.5, 15, 30 y 60 $\mu\text{g/mL}$). La tabla XV muestra el valor de IC_{50} en μM y $\mu\text{g/mL}$ para los 5 compuestos bioactivos. Es necesario mencionar que ninguno de ellos tuvo la capacidad de generar cambios morfológicos similares a los inducidos por los propóleos y colchicina ni optimizar la actividad del extracto de propóleos original. Esta situación permite pensar que los compuestos con el efecto antiproliferativo deben estar en una baja concentración, razón por la cual no están incluidos entre los trece compuestos analizados y evaluados.

Tabla XIV. Actividad antiproliferativa para las fracciones cromatográficas de propóleos de Ures, Sonora reportada en IC₅₀.

Fracciones Sephadex	M12A ^k .C3F6 IC ₅₀ (µg/mL)	Inducción de cambios morfológicos
Fx No.1	28.7 ± 1.0	
Fx No.2	32.6 ± 0.5	
Fx No.3	28.9 ± 0.7	++
Fx No.4	4.8 ± 0.1	+++
Fx No.5	27.1 ± 0.8	++
Fx No.6	36.3 ± 0.9	
Fx No.7	33.5 ± 0.4	
Fx No.8	□ 50	
Fx No.9	30.7 ± 2.2	
Fx No.10	29.9 ± 3.1	

Tabla XV. Actividad antiproliferativa para los compuestos químicos de propóleos de Ures, Sonora reportada en IC₅₀.

Compuesto	M12A ^k .C3F6		Inducción de cambios morfológicos
	IC ₅₀ µM	IC ₅₀ µg/mL	
Pinobanksina	52.1 ± 2.0	14.2	
Crisina	49.1 ± 3.3	12.5	
Pinobanskina-3propionato	67.0 ± 0.9	22.0	
Pinobanskina-3 butirato	49.9 ± 0.3	17.06	
Pinobanskina-3pentanoato	51.3 ± 3.0	18.26	
Pinobanskina-3 hexanoato	76.6 ± 1.4	28.34	

DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó con el propósito central de analizar el efecto de la temporalización sobre origen botánico de los propóleos de Ures, Sonora, por esta razón se colectaron muestras de propóleos y resinas provenientes de las especies vegetales en cada estación anual. El conocimiento del perfil de composición química de las muestras de propóleos estacionales, así como las diferencias en el efecto de estas resinas y sus constituyentes químicos en la proliferación de células cancerosas *in vitro*, fueron aspectos que permitieron comprender y discutir al respecto de las especies vegetales biodisponibles a lo largo del año para la elaboración de los propóleos.

Con respecto a la producción de propóleos, se encontró que durante el período de recolección 2009-2010 se obtuvo de las colmenas una mayor cantidad de éstos en la estación de verano. Sin embargo, esta situación no indica necesariamente que durante los meses de verano existe una mayor disponibilidad de los compuestos de interés para las abejas en el ambiente. Esto concuerda con lo reportado previamente en el período de recolección 2008-2009 (Valencia y col., 2012). Posiblemente, esta situación se debe a que las abejas frecuentemente recolectan resinas y exudados a finales del verano y durante el otoño, justo cuando la temporada de floración de las especies vegetales de donde obtienen el polen ha terminado, es decir, la elaboración de propóleos se incrementa cuando la producción de miel se ve reducida. Previamente, se ha discutido sobre la influencia de cambios estacionales en el comportamiento de las abejas para la búsqueda de alimento (Ghisalberti 1979, Simone-Finstrom y col., 2010). Está reportado que cuando la temperatura es superior a 20°C la colección de las resinas por parte de las abejas para elaborar los propóleos es mucho más activa, tomándoles entre 10 y 15 horas (Gherida y col., 2009), aspecto que se resume en una producción más eficiente, es decir en menor tiempo mayor producción. Hay que tener en cuenta que la temperatura media

anual en la región de Ures, Sonora varía por lo general entre 22.0° y 26.0°C (INEGI, 2011).

En el diagrama ilustrado en la figura 21 se muestra el diseño esquemático de la elaboración y uso de los propóleos por las abejas, diseño propuesto por Popravko (1976) y complementado por P. Marchenay (1978) (Adelmann, 2005). En él se pueden observar de manera clara los estímulos que dan lugar a la colecta de resinas vegetales en un determinado tiempo y con un propósito específico, mostrándose que los requerimientos de las abejas establecen la elaboración de propóleos, generando como consecuencia variaciones en las composición y en la cantidad producida durante las estaciones anuales, así como posiblemente el contenido de ceras que le permitan adoptar a los propóleos las propiedades físicas indicadas para el propósito a realizar. Sin embargo, la razón por la cual las abejas realizan esta compensación no está del todo clara. Posiblemente, en verano sea mayor la construcción o adaptación de las condiciones mecánicas de la colmena, o la invasión de insectos e intrusos que una vez derrotados deban embalsamarse para evitar la proliferación bacteriana involucrada en la descomposición.

Adicionalmente, los resultados para el análisis de contenido porcentual de ceras en las muestras de propóleos indicaron que los propóleos de verano poseen el mayor contenido en comparación con los demás. Estos datos indican que la composición química de los propóleos de las diferentes estaciones desde el punto de vista cuantitativo no es constante. Sin embargo, el análisis realizado en el período 2008-2009 de temporalización de propóleos de Ures, Sonora señala que la abundancia relativa de los constituyentes químicos mayoritarios de los propóleos (pinocembrina, pinobanksina-3-O-acetato, crisina y CAPE) fue similar en las cuatro estaciones del año (Valencia y col., 2012).

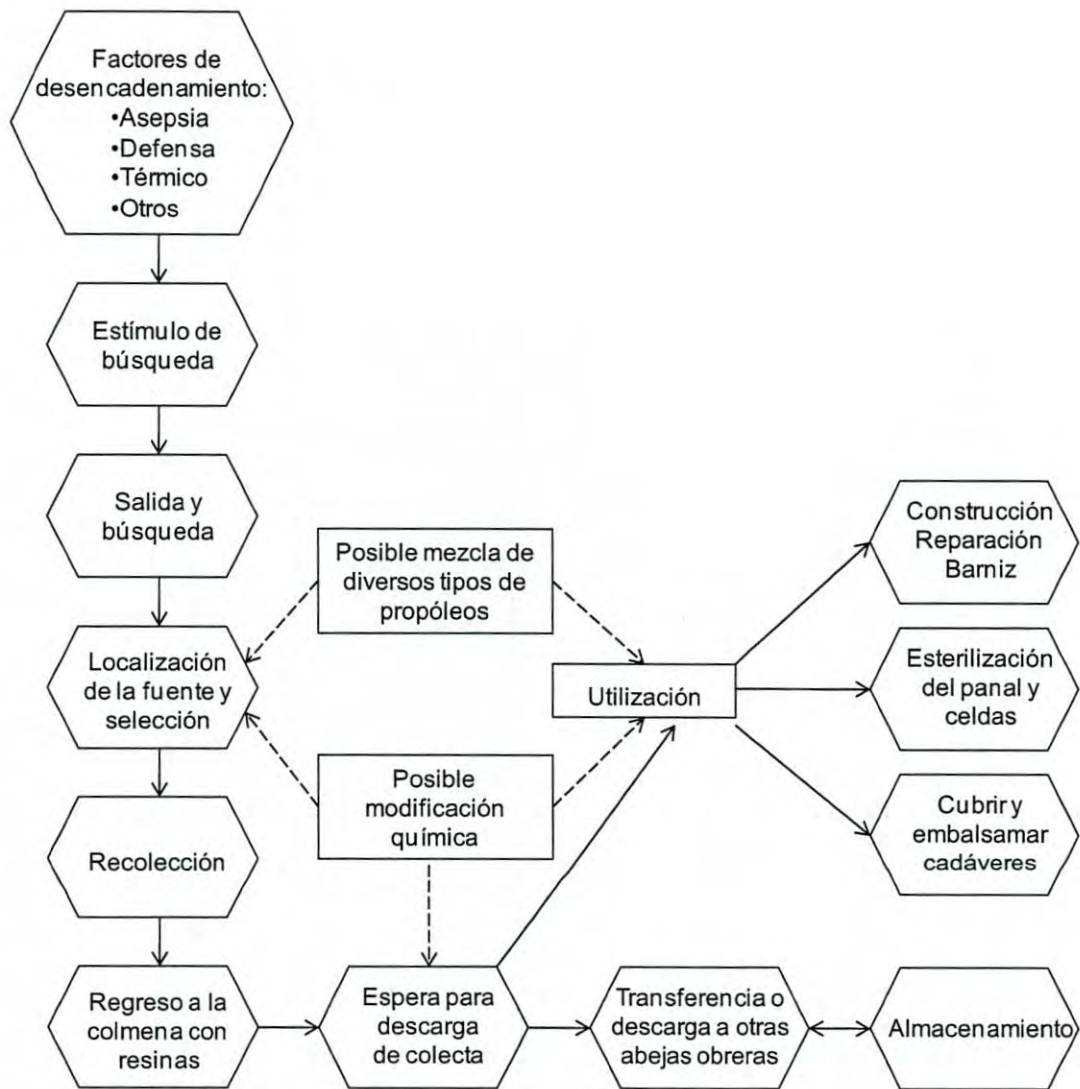


Figura 21. Diseño esquemático de la colecta y utilización de propóleos por las abejas según Popravko (1976) y P. Marchenay (1978).

En lo que respecta al análisis cromatográfico de los propóleos colectados en las cuatro estaciones del año, resulta evidente que la presencia de compuestos o grupos de éstos se conserva en todas las estaciones, registrando un peso molecular y tiempo de retención específico, indicando una similitud en composición desde el aspecto cualitativo. Al comparar los cromatogramas de los propóleos de Ures, Sonora y de *Populus fremontii*, se aprecia que el perfil cromatográfico de los exudados de esta especie vegetal y de los propóleos son sumamente similares y corresponden adecuadamente la presencia de sus picos en tiempos de retención, asumiendo a *P. fremontii* como principal origen botánico.

De acuerdo a Karl Von Frisch, las abejas obreras realizan la colecta de exudados para la elaboración de propóleos por lo general en un radio menor a 2 km. La distancia entre el espécimen de *P. fremontii* recolectado y las colmenas es de 1.75 km, y ésta concuerda con los datos publicados y descifrados de la danza bajo la cual las abejas comunican la ubicación de los exudados de su interés. Sin embargo es importante destacar la presencia de más especies de *P. fremontii* a los alrededores de las colmenas y en distancias menores, siendo de las especies botánicas más abundantes en la región, junto con *P. velutina* y *P. praecox*.

Ciertos estudios han monitorizado la presencia y verificado la variación estacional de compuestos fenólicos en exudados en las especies de *Populus spp.*, específicamente flavonoides. Rivera y col. reportaron en 1997 que las especies de *P. deltoides*, *P. nigra* y *P. canadensis* en distintas regiones de España presentan en las cuatro estaciones del año brotes y secreciones exudadas compuestas principalmente por flavonoides, indicando la disponibilidad superficial de estos compuestos durante todo el año y en diferentes condiciones geográficas. Datos que permiten considerar a *P. fremontii* en Ures, Sonora como especie botánica disponible durante todo el año para la colección de exudados en brotes y hojas por parte de las abejas, situación

confirmada en el desarrollo del estudio al llevar a cabo la extracción de exudados con metanol en las cuatro estaciones del año.

Las rutas biosintéticas de flavonoides en las especies de *Populus spp.* han sido descritas ampliamente en la literatura, específicamente para las especies *P. deltoides*, *P. nigra*, and *P. trichocarpa* (Cervera y col., 2001). Recientemente, Morreel y col., estudiaron el control genético en la metabolómica de 15 flavonoides considerando la abundancia de estos metabolitos, todos ellos relacionados y presentes en perfil metabólico de brotes y hojas jóvenes la progenie de dos cruas controladas compartiendo el mismo progenitor femenino: *Populus deltoides* cv. S9-2 3 *P. nigra* cv. Ghoy y *P. deltoides* cv. S9-2 3 *P. trichocarpa* cv. Los resultados permitieron detectar los puntos de control enzimáticos en el flujo de la biosíntesis de flavonoides, indicándose una abundancia relativa mayor en pinobanksina, pinobanksina-3-O-acetato, eriodictiol, galangina y kampferol en las muestras (Morreel y col., 2006). Asimismo, el compuesto pinocembrina ha estado descrito como un metabolito sobre expresado tanto en exudados de especies de *Populus spp.* como en muestras de propóleos (Birtaş y col., 2010), aspecto que permite corroborar los datos obtenidos en esta investigación, mostrándose evidente la gran abundancia de pinocembrina en los extractos de propóleos de Ures, Sonora (Hernandez y col., 2007, Velazquez y col., Valencia y col., 2012). La elevada abundancia de pinocembrina en exudados de especies de *Populus spp.* se debe a su importancia como precursor de flavononas, dhidroflavanoles y flavanoles. La figura 22 muestra el diagrama de la biosíntesis de flavonoides en especies de *Populus spp.* reportado por Morreel y col.

Birtaş y col., reportan que el contenido de flavonoides en propóleos Rumanos va del 15.5 ± 0.8 al 19.5 ± 0.4 % en equivalentes de Crisina, mientras que en exudados de brotes de álamo corresponde a un 22.4 ± 0.9 %, indicando una concentración ligeramente mayor en los brotes de álamo que en propóleos.

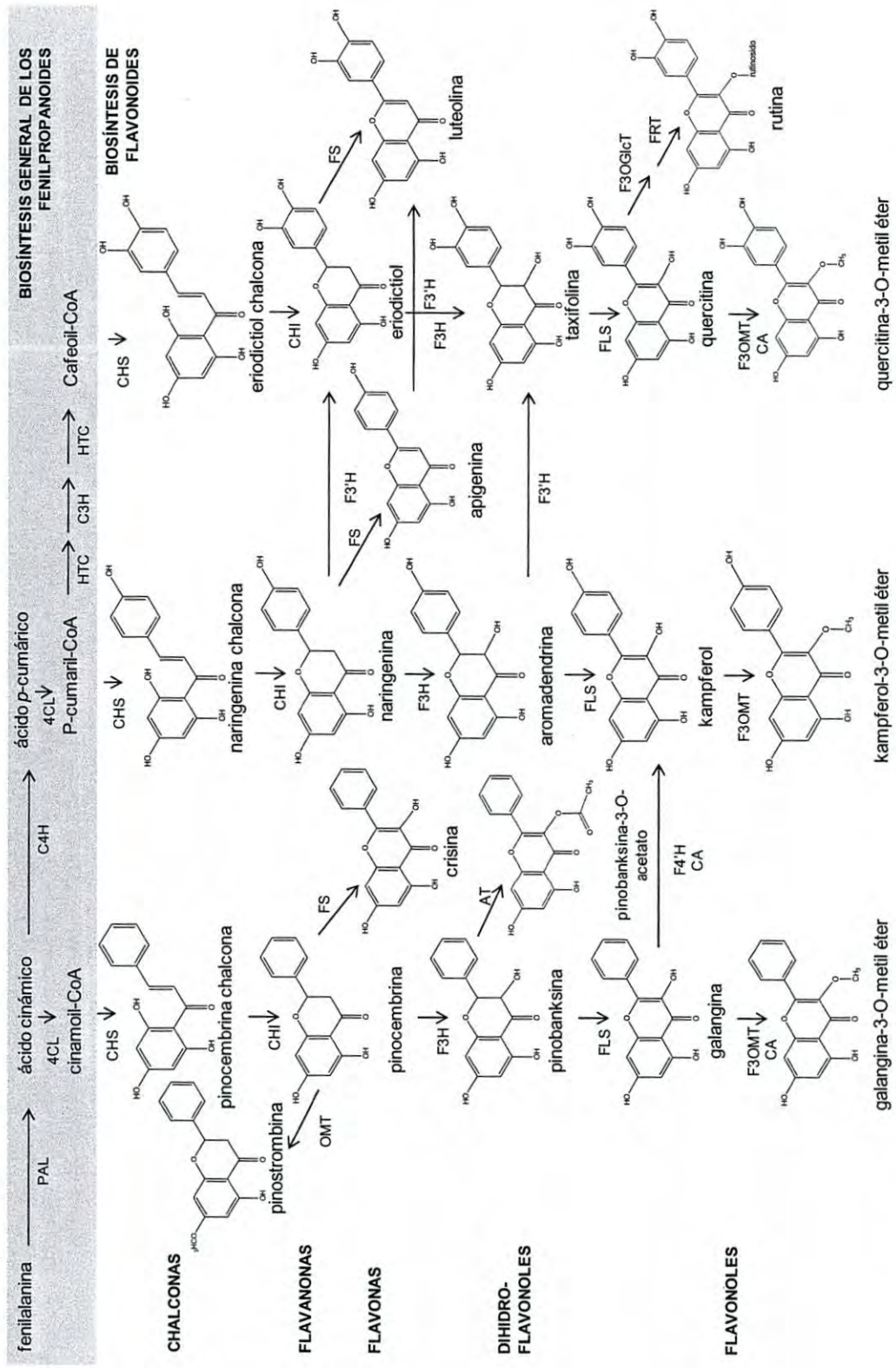


Figura 22. Esquema de biosíntesis de flavonoides en especies de *Populus spp.* según Morrel y col.

Este dato puede deberse a presencia en mayor concentración de compuestos de otra naturaleza en los propóleos de Rumania y no en los exudados del álamo.

Es importante mencionar que los compuestos fenólicos, específicamente los flavonoides son los que proporcionan principalmente las actividades biológicas como la capacidad antioxidante. Los datos obtenidos para la actividad antioxidante de las muestras de propóleos colectados para cada una de las estaciones y de los exudados de *P. fremontii* van en el mismo sentido de los datos obtenido por Birtaş y col. Los propóleos mostraron una leve actividad neutralizante para el DPPH (en promedio 17.0 ± 0.2 %), mientras que la actividad de *P. fremontii*, resulta ser superior, aproximadamente el 30%. Estos resultados indican que si bien la presencia de los constituyentes químicos de manera cualitativa es conservada en los propóleos y en las resinas de *P. fremontii* de las cuatro estaciones del año, la concentración de los compuestos es distinta en la resina vegetal y en los propóleos, sugiriendo la posible participación de los exudados de otra especie vegetal en los propóleos, los cuales disminuya la concentración de los compuestos antioxidantes en *P. fremontii* y le proporcionen otras propiedades biológicas a su producto final, pues, previo a la determinación de la actividad antioxidante se realizó la deceración de los propóleos, por lo que la diferencia no se puede atribuir a la presencia de cera en las muestras.

Los datos obtenidos para la actividad antiproliferativa de los propóleos provenientes de las cuatro estaciones presentaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la proliferación de las células cancerosas *in vitro*. Estos resultados van en el mismo sentido de los obtenidos para el período 2008-2009 (Valencia y col., 2012), manteniendo constantes estas diferencias en dos períodos de colección distintos, preservándose los propóleos de primavera como los más efectivos en inhibir la proliferación celular en M12.C3.F6. Estas diferencias en la actividad antiproliferativa pueden ser atribuidas a la abundancia relativa que presenten los constituyentes bioactivos en las muestras

estacionales de propóleos. o posiblemente a la participación de otras especies botánicas en la recolección de exudados realizada por las abejas, exudados ricos en compuestos que intensifican la actividad antiproliferativa en las muestras de primavera e invierno, mismas que inducen cambios morfológicos similares a los que induce colchicina.. Colchicina se une covalentemente a los microtúbulos, específicamente a tubulina para impedir la polimerización de los microtúbulos, inhibiendo la fase de mitosis en una gran variedad de células de origen animal y vegetal, arretando así la progresión del ciclo celular y conduciendo a la muerte, particularmente para las células cancerosas que se dividen rápidamente (Taylor y col., 1967). De esta manera, los extractos de propóleos de invierno y primavera parecen ejercer su efecto antiproliferativo a partir de un mecanismo basado en la inducción de cambios morfológicos, capacidad inexistente en los propóleos de verano y otoño

En lo referente a la actividad antiproliferativa de exudados y resinas vegetales colectados en las diferentes estaciones se puede hablar de una actividad antiproliferativa aparentemente constante a lo largo del año. La recolección se realizó por estación considerando las posibles variaciones en la síntesis y presencia de metabolitos secundarios, dado que es lógico pensar que las condiciones ambientales regulen la secreción de compuestos en las especies vegetales, así como la época de floración. Al observar los resultados para la actividad antiproliferativa de cada resina vegetal se puede entender que los compuestos que generan el efecto de inhibición en la proliferación celular se encuentran todo el año dispuestos en la superficie de las plantas, ya sean en las hojas, tallos o brotes, encontrándose biodisponibles para la recolección por parte de las abejas, aunque si bien es cierto se observan ligeras diferencias en el caso de la actividad de las resinas de *P. fremontii* a lo largo del año. En el caso de *A. ambrosioides*, sus resinas mostraron poseer las IC_{50} más bajas, comparables a las de los compuestos empleados como controles positivos de inhibición de proliferación, sin embargo, se observaron cambios en su efecto antiproliferativo,

siendo las resinas extraídas en primavera las que poseen un IC₅₀ más elevada y menos eficiente.

La resina de *Populus fremontii* presenta una actividad antiproliferativa significativa (IC₅₀ = 29.6 ± 5.6 µg/mL) y parcialmente constante a lo largo de la colección y extracción en las distintas estaciones del año. A pesar de esto, su actividad no es tan eficiente como la de los propóleos de invierno y primavera, además, los exudados de *P. fremontii* no generan cambios morfológicos como los propóleos. Lo anterior lleva a pensar que aunque *P. fremontii* es la especie botánica principal, no es la que proporciona los constituyentes químicos capaces de inducir cambios morfológicos como los que generan los propóleos.

Los exudados de las especies botánicas *B. laxiflora* y *A. ambrosioides* tienen una actividad antiproliferativa significativa, son capaces de inducir cambios morfológicos previamente observados en los propóleos y en drogas antimetabólicas. Sugiriendo la posible participación de sus exudados en la formulación de los propóleos. La especie *A. ambrosioides* se encuentra con una amplia distribución en las áreas circundantes a las colmenas, situación que es la opuesta para *B. laxiflora*. Tomando en cuenta los resultados publicados por Wollenweber y col. acerca del origen botánico de los propóleos de Arizona, en los cuales está involucrada la especie *A. deltoidea* al no estar presentes las apetecidas especies de *Populus spp.* para las abejas (Valant-Vetschera y col., 2006). De esta manera, la especie *A. ambrosioides* puede jugar un papel muy importante en la colección de resinas por parte de las abejas para producir los propóleos.

En lo respectivo a los resultados de caracterización química de los propóleos, se ha encontrado la presencia de constituyentes químicos que son productos de la biosíntesis particular de las especies de *Populus ssp.* Tales como los flavonoides: pinocembrina, pinobanksina-3-acetato, crisina, quercitina-3-metileter, galangina, entre otros (Morrel y col., 2005; Bankova y col., 2005). Adicionalmente se identificó toda una nueva familia de ésteres de la

pinobanksina, la presencia de éstos ésteres ha sido reportada en estudios realizados por Gardana y col. y Bankova y col., quienes reportan la presencia de ésteres de pinobanksina como compuestos biosintetizados por las especies de *Populus spp.*, que a su vez, funcionan como compuestos marcadores para la identificación de la fuente botánica de propóleos de tipo *Populus*. Confirmando de esta manera que el origen botánico principal es *Populus fremontii*.

Adicionalmente, los resultados obtenidos para la actividad antiproliferativa de la fracción 4 permiten evidenciar una concentración de compuestos biológicamente activos que llegan a potencializar el efecto en la inhibición de la proliferación en la línea M12A^k.C3.F6 ($IC_{50} = 4.8 \pm 0.1$) en comparación de los propóleos de invierno ($IC_{50} = 10.1 \pm 1.6$), así como también se observa la presencia de cambios morfológicos característicos. Sin embargo, la composición química de esta fracción está dada principalmente por diversos ésteres de la pinobaksina como constituyentes mayoritarios, los cuales a pesar de mostrar una actividad antiproliferativa significativa individualmente, no fueron responsables de optimizar la actividad de la fracción de origen ni la de los propóleos, asimismo no generaron cambios morfológicos característicos.

En los resultados obtenidos por HPLC-MS-Q-TOF para la fracción 4 se observa la presencia de dos picos con una masa molecular ($[M-H]^1$) de 397 y 527 con los respectivos tiempos de retención de 48.07 y 50.71 min (figura 9), los cuales no fueron caracterizados ni asignados a un determinado compuesto. Interesantemente la presencia de estos dos picos vuelve a ser evidente solamente en la fracción número cinco y no se repite en las demás, como la capacidad de cambios morfológicos sólo es positiva para las fracciones 3,4 y 5. Sugiriendo la presencia de estos dos picos su posible participación en dicha actividad. Su tiempo de retención está muy desplazado a la derecha, indicando una naturaleza química poco polar de acuerdo al método cromatográfico, este tipo de naturaleza no es propia de los flavonoides, pues ellos tienen anillos aromáticos sustituidos con grupos hidroxilos, los cuales le proporcionan una

polaridad y actividad estabilizadora de radicales libres particular. Sin embargo este tiempo de retención pudiera ser debido a una sustitución de importante longitud alifática, como es el caso de Pinobanksina-3-O-hexanoato, teniendo un tiempo de elusión de 41.77 min.

Recapitulando de manera general, el perfil de composición química de los propóleos de Ures, Sonora está constituido principalmente por compuestos de naturaleza fenólica, específicamente flavonoides provenientes de *Populus fremontii*, los cuales se encuentran como constituyentes conservados durante todas las estaciones, sin embargo, es necesario ahondar más en la composición por medio de un análisis cuantitativo comparativo en las diferentes muestras de cada estación, para poder discutir al respecto de las variaciones porcentuales de cada compuesto. Adicionalmente, es necesario ver qué papel juegan las resinas de *Ambrosia ambrosioides* en la composición de los propóleos de las estaciones de primavera e invierno, identificar si ésta especie vegetal proporciona los compuestos con una masa molecular ($[M-H]^1$) de 529 y 397 que se consideran implicados en la optimización de la actividad antiproliferativa, para de esta manera concluir algo al respecto de las variaciones estacionales en la composición de propóleos que genera dicha actividad biológica. Sin embargo, la presencia de *Ambrosia ambrosioides* se encuentra en las zonas circundantes a las colmenas durante todo el año, aspecto que no permite del todo comprender si en realidad juega un papel en la elaboración de los propóleos sólo en dos estaciones del año y no en las cuatro. Los cambios morfológicos inducidos por *A. ambrosioides* y por los propóleos de invierno y primavera orientan a pensar en un mecanismo de acción similar al ejercido por colchicina y los compuestos desestabilizantes de los microtúbulos por medio de interacciones de los constituyentes químicos bioactivos con la proteína tubulina, alterando así la fase de mitosis en el ciclo celular y la posterior división para permitir la proliferación celular.

CONCLUSIONES

- La composición química de los propóleos de Ures, Sonora se mantiene cualitativamente estable con el paso de las estaciones en dos diversos períodos, indicando la presencia de una fuente vegetal disponible durante todo el año.
- El principal origen botánico de los constituyentes fenólicos (flavonoides) de propóleos de Ures, Sonora es la especie *Populus fremontii*.
- Se identificaron quince nuevos compuestos en propóleos de Ures, Sonora, la mayoría ésteres de pinobanksina.
- Los extractos de propóleos de las cuatro estaciones poseen una débil actividad antioxidante.
- Los propóleos colectados en invierno y primavera poseen una elevada actividad antiproliferativa, así como la capacidad de inducir cambios morfológicos característicos en dos distintos períodos de recolección.
- Se sugiere la participación de las resinas de *A. ambrosioides* como fuente botánica adicional en la actividad antiproliferativa *in vitro* y en la inducción cambios morfológicos de propóleos de Ures, Sonora.

REFERENCIAS

- ALONSO M., Benavides, M., García-Foncillas. J. 2006. Sociedad Española de Oncología Médica, Cáncer Hereditario. 24-38.
- AHN, M.R., S. Kumazawa, T. Hamasaka. 2004. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 7286-7292.
- ANAND, P., B. Kunnumakara, C. Sundaram. 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*. 25: 2097-2116.
- BANKOVA, V. (2005) Recent Trends and Important Developments in Propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 29-32.
- BANKOVA, V., R. Christov, A. Kujungiev, M. C. Marcucci, S. Popova (1995) Chemical-Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 50, 167-172.
- BANKOVA, V., M. Popova, S. Bogdanov, A. G. Sabatini (2002) Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 57, 530-533.
- BANKOVA, V. S., S. L. de Castro, M. C. Marcucci (2000) Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- BIRTAŞ,G., L. Marghitaş, D. Dezmirean, O. Stanciu, M. Tămas. 2010. Spectrophotometric Evaluation of Flavonoid Content of Propolis and Poplar Buds by ZrOCl₂ Reagent. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 67(1-2), 85-90.
- BOIK, J. 2001. Cancer at the Cellular Level / Clinical Considerations. Part I and part III in Natural Compounds in Cancer Therapy. Promising Nontoxic Antitumor Agents from Plants & and Other Natural Sources. Quality Books. 1-33, 251-267.

- BOUKRAË, L., S.A. Sulaiman. 2009. Rediscovering the Antibiotics of the Hive. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 4:206-213.
- BOZCUK-ERDEM, G., S. Ölmez., 2004. Inhibitory Effect of Bursa Propolis on Dental Caries Formation in Rats Inoculated with *Streptococcus sobrinus*. *Turk J Zool*. 28, 29-36.
- BURDOCK, G. A. (1998) Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.
- CASSIER, P., Y. Lensky. 1995. Ultrastructure of the Wax Gland Complex and Secretion of Beeswax in the Worker Honey Bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 26:17-26.
- CERVERA, M. V. Strome, B. Ivens, J. Gusmão, B. Liu, V. Hostyn, J. Van Slycken, M. Van Montagu W. Boerjan. 2001. Dense Genetic Linkage Maps of Three Populus Species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) Based on AFLP and Microsatellite Markers. Genetics Society of America. *Genetics*. 158: 787–809.
- CLARDY, J. C. Walsh. 2004. Lessons from Natural Molecules. *Nature*. 432: 829-837.
- CUESTA-RUBIO, O., A.L. Piccinelli, L. Rastrelli. 2007. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7502-7509.
- DINIZ CAMPOS, A., A. Gui Ferreira, M. Vozári Hampe. 2003. Induction of Chalcone Synthase and Phenylalanine Ammonia-lyase by Salicylic Acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in Common Bean. *Braz. J. Plant Physiol.*, 3:129-134.
- DYER, F. C. 2002. The Biology of the Dance Language. *Annu. Rev. Entomol.* 2002. 47: 917–49.
- FAHY, J., Hellier, P., Breillout, F. 2008. Vinflunine: Discovery and Synthesis of a Novel Microtubule Inhibitor. *Seminars in Oncology*. 35:S3-S5.

- FALCAO, S. I., M. Vilas-Boas, L. M. Estevinho, C. Barros, M. R. M. Domingues, S. M. Cardoso (2010) Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: Usual and Unusual Compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 887-897.
- FREITAS, S. F., L. Shinohara, J. M. Sforcin & S. Guimaraes (2006) In vitro Effects of Propolis on Giardia duodenals Trophozoites. *Phytomedicine*, 13, 170-175.
- GARDANA, C., M. Scaglianti, P. Pietta, P. Simonetti. 2007. Analysis of the Polyphenolic Fraction of Propolis from Different Sources by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45: 390–399.
- GHEDIRA, K., P. Goetz, R. Le Jeune. 2009. Propolis: Matière Médicale Pratique. *Phytothérapie*. 7: 100–105.
- GORDON, C. 2009. Nature: A Vital Source of Leads for Anticancer Drug Development. *Phytochemistry Reviews*. 8: 313-331.
- HAMEL, E. et al. 1996. Identification of Cysteine 354 of β -Tubulin as Part of the Binding Site for the A Ring of Colchicine. *The Journal of Biological Chemistry* . 21: 12639-12645.
- HANSON, J. 2003. The Classes of Natural Products and Their Isolation. Ch 1. In *Natural Products: The Secondary Metabolites*. The Royal Society of Chemistry (Ed).. p. 1-33. Cambridge, UK.
- HERNANDEZ, J., F. M. Goycoolea, J. Quintero, A. Acosta, M. Castaneda, Z. Dominguez, R. Robles, L. Vazquez-Moreno, E. F. Velazquez, H. Astiazaran, E. Lugo & C. Velazquez (2007) Sonoran propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, 73, 1469-1474.
- ISLA, M. 2005. Some Chemical Composition and Biological Activity of Northern Argentine Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1166-1172.

- KADOTA, S., Feng Li, Suresh Awale, Yasuhiro Tezuka,† Hiroyasu Esumi,‡ Et al. 2010. Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *J. Nat. Prod.* 73: 623–627.
- KAWABE, T. 2004. G2 Checkpoint Abrogators as Anticancer Drugs. *Molecular cancer therapeutics.* 4: 513-519.
- Koehn, F. E. & G. T. Carter (2005) The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 206-220.
- KUMAZAWA, S., M. Yoneda, I. Shibata. 2003. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. *Chem Pharm Bull.* Vol. 51: 740-742.
- LEE, K. 1999. Anticancer Drug Design Based on Plant-Derived Natural Products. *Journal of Biomedical Science.* 6(4): 236-250.
- LESLIE, B. et al. 2010. Phenylcinnamides as Novel Antimitotic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry.* 53: 3964–3972.
- LOTFY, M. 2006. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7, 22-31.
- LOTTI, C., M. Campo Fernandez, A. L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, I. Marquez Hernandez & L. Rastrelli. 2010. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2209-2213.
- MANN, J. (2002) Natural Products in Cancer Chemotherapy: Past, Present and Future. *Nature Reviews Cancer*, 2, 143-148.
- MARCUCCI, M. C. 1995. Propolis - Chemical - Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A., R., Llorach, M.L., Gil. 2007. Identification of New Flavonoid Glycosides and Flavonoid Profiles to Characterize Rocket Leafy Salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J Agric Food Chem.* 55:1356-63.

- MELLO, B., J.C. Cunha Petrus, M. Dupas Hubinger. 2010. Concentration of Flavonoids and Phenolic Compounds in Aqueous and Ethanolic Propolis Extracts Through Nanofiltration. *Journal of Food Engineering* 96: 533–539.
- MIGUEL, M., S. Nunes, S. Dandlen, A. Cavaco. 2010. Phenols and Antioxidant Activity of Hydro-Alcoholic Extracts of Propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 418-342.
- MIORIN, P. L., N. C. L. Junior, A. R. Custodio, W. A. Bretz, M. C. Marcucci (2003) Antibacterial Activity of Honey and Propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* Against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 913-920.
- MORREEL, K., G. Goeminne, V. Storme, L. Sterck, J. Ralph, W. Coppieters, P. Breyne, M. Steenackers, M. Georges, E. Messens, Wout Boerjan. 2006. Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a Case Study. *The Plant Journal*. 47, 224–237.
- MORRISSEY, J. 2009. Biological Activity of Defence-Related Plant Secondary Metabolites, Ch. 13. in *Plant-derived Natural Products*, Springer (Ed), p. 283-299. Cork, Ireland.
- MUNZ, T. 2005. The Bee Battles: Karl von Frisch, Adrian Wenner and the Honey Bee Dance Language Controversy. *Journal of the History of Biology*. 38: 535-570.
- OTA, C., C. Unterkircher, V. Fantinato, M. T. Shimizu. 2001. Antifungal activity of Propolis on Different Species of *Candida* / Antimyzetische Aktivita Èt von Propolis Gegen Verschiedene *Candida*-Arten. *Mycoses*. 44, 375-378.
- PAINTZ, M., J Metzner. 1979. On the Local Anaesthetic Action of Propolis and Some of its Constituents. *Pharmazie*. 34, 839-841.

- PEREZ, E. 2009. Microtubule inhibitors: Differentiating & Tubulin-inhibiting Agents Based on mechanisms of Action, Clinical Activity, and Resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*. 8: 2086-2095.
- POPOVA, M. V. Bankova, S. Bogdanov. 2006. Chemical Characteristics of Poplar Type Propolis of Different Geographic Origin. *Apidologie*. 38: 306-311.
- PRYTZYK, E., A. P. Dantas, K. Salomao, A. S. Pereira, V. S. Bankova, S. L. De CASTRO, F. Neto (2003) Flavonoids and Trypanocidal Activity of Bulgarian Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 189-193.
- RATNIEKS, F.L. 2000. How Far Do Honey Bees Forage? *Bee Improvement*. 6: 10-11.
- RIVERA, D., C. Obón, F. Tomás-Barberán, M.J. Arenas. 1997. Study of the Flavonoids as Chemotaxonomic Markers in *Populus* (Salicaceae) of Spain. *Lagascalia*. 19, 813-818.
- ROBLES-ZEPEDA, R., J. Hernández, A. Garibay, Dora Valencia, Carlos Velázquez. 2012. Medicinal Plants, Biodiversity and Drugs. 18 Botanical Origin and Biological Activity of Propolis . Science Publishers. ISBN 978-1-57808-000-0.
- SALATINO, A., E. W. Teixeira, G. Negri & D. Message (2005) Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 33-38.
- SÁNCHEZ, J. Plantas Nativas de Sonora: las Plantas del Desierto Sonorense. *Revista Universidad de Sonora*. Pg. 20 - 22. <http://www.revistauniversidad.uson.mx/revistas/19-19articulo%207.pdf>
- SANTOS, F. 2003. Brazilian Propolis: Physicochemical Properties, Plant Origin and Antibacterial Activity on Periodontopathogens. *Phytotherapy Research*. 17: 285–289.

- SARMA, M., H. Esch, J. Tautz. 2004. A Comparison of the Dance Language in *Apis mellifera carnica* and *Apis florea* Reveals Striking Similarities. *J Comp Physiol A*. 190: 49–53.
- SATYAJIT, D. Sarker, Zahid Latif, Alexander I. Gray. 2006. Natural Products Isolation. Ch. 1. Methods in Biotechnology: Natural Products isolation. Humana Press (Ed), p.1-26. Totowa, NY., USA.
- SFORCIN, J. M. (2007) Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1-14.
- SHIGENORI, K. 2003. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. *Chem.Pharm.Bull.* 51: 740-742.
- SHIGENORI, K. et al. 2008. Plant Origin of Okinawan Propolis: Honeybee Behavior Observation and Phytochemical Analysis. *Nature wissen chaften*. 95: 781-786.
- SHREVE, F.; I. Wiggins. 1964, reimpresión 1998. Vegetation of the Sonoran Desert. Parte I en *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert*. Stanford University Press. 3-127.
- TEICHER, B.A. 2008. Newer Cytotoxic Agents: Attacking Cancer Broadly. *Clin Cancer Res*. 14: 1610-1617.
- TEIXEIRA, E. W., D. Message, G. Negri, A. Salatino, P. C. Stringheta (2010) Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7, 307-315.
- TEIXEIRA, E. W., G. Negri, R. Meira, D. Message, A. Salatino (2005) Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 85-92.
- TOLOSA, L. 2002. The Collection, Characterisation and Evaluation of Antimicrobial Activity of Propolis Extracts from Campeche, Mexico. *Ars Pharmaceutica*. 43: 187-204.

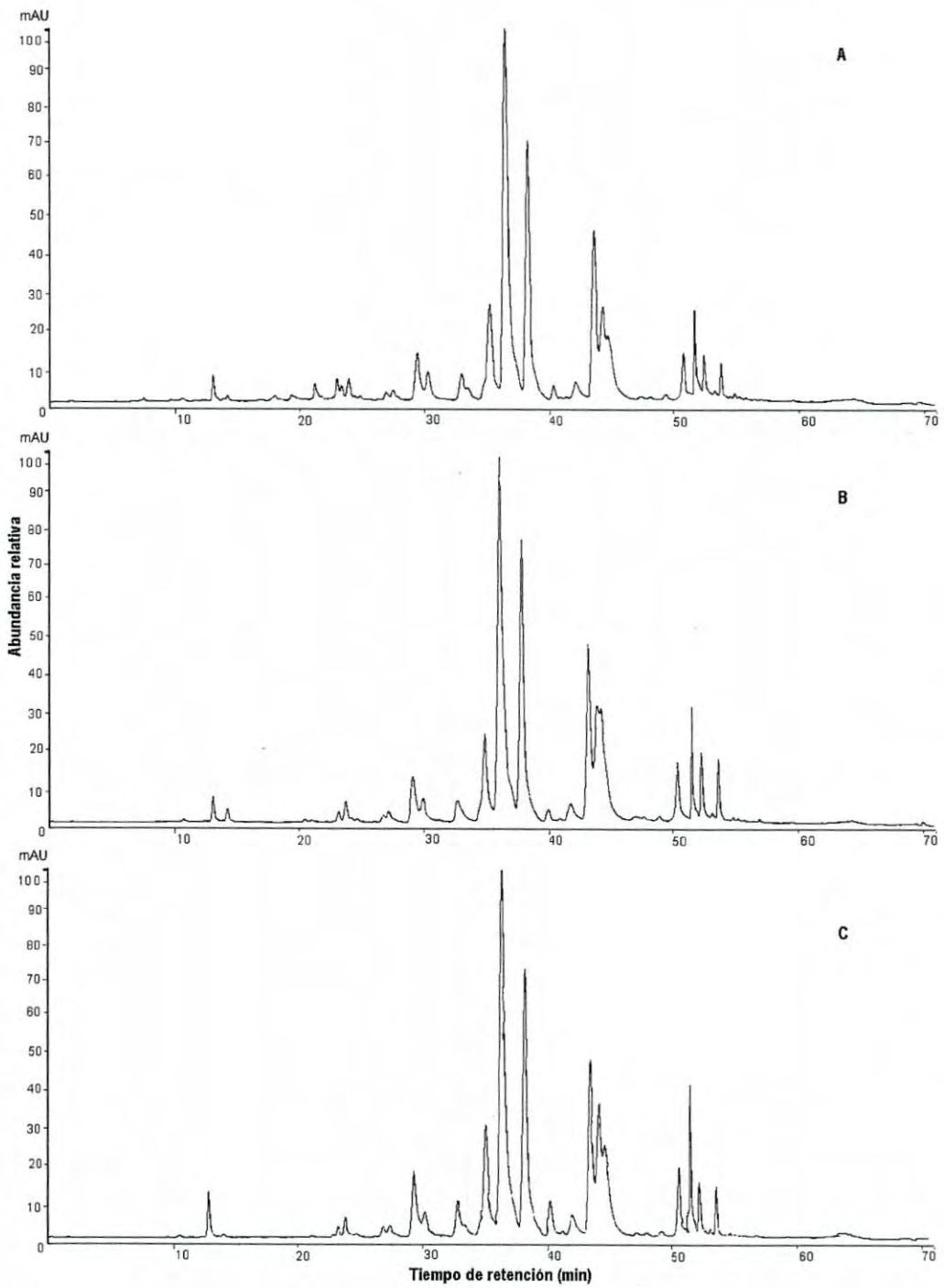
- USIA, T., A. H. Banskota, Y. Tezuka, K. Midorikawa, K. Matsushige, S. Kadota (2002) Constituents of Chinese Propolis and their Antiproliferative activities. *Journal of Natural Products*, 65, 673-676.
- UZEL, A. K. Sorkun, Ö. Öncü. 2005. Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Four Different Anatolian Propolis Samples. *Microbiological Research* 160: 189-195.
- VALANT-VETSCHERA, K. M. & B. Brem (2006) Chemodiversity of exudate Flavonoids, as Highlighted by Selected Publications of Eckhard Wollenweber. *Natural Product Communications*, 1, 921-926.
- VALENCIA, R. E. Alday, R. Robles-Zepeda, A. Garibay-Escobar, J.C. Galvez-Ruiz, M. Salas-Reyes, M. Jiménez-Estrada, E. Velazquez-Contreras, J. Hernandez, C. Velazquez. 2012. Seasonal Effect on Chemical Composition and Biological Activities of Sonoran Propolis. *Food Chemistry*. 131, 645–651.
- VELAZQUEZ, C., M. Navarro, A. Acosta, A. Angulo, Z. Dominguez, R. Robles, R. Robles-Zepeda, E. Lugo, F. M. Goycoolea, E. F. Velazquez, H. Astiazaran & J. Hernandez (2007) Antibacterial and Free-Radical Scavenging Activities of Sonoran Propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1747-1756.
- VENKATESH, P., M. Jaiprakash, P. Prasad. 2007. Flavonoid Biosynthesis in Tea (*Camellia sinensis*). *International Journal of Tea Science*. 6:11-17.
- VERMEULEN, K. 2003. The cell cycle: a Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Proliferation*. 36:131–149.
- WAGNER, G. et al. 2004. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Annals of Botany*. 93: 3-11.
- WEINSTEIN, E. 2008. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. *Evid based Complement Alternat Med*. 10: 1093-1102.

YUANJUN, X., L. Luo, B. Chen, Y. Fu. 2009. Recent Development of Chemical Components in Propolis. *Front. Biol. China.* 4: 385–391.

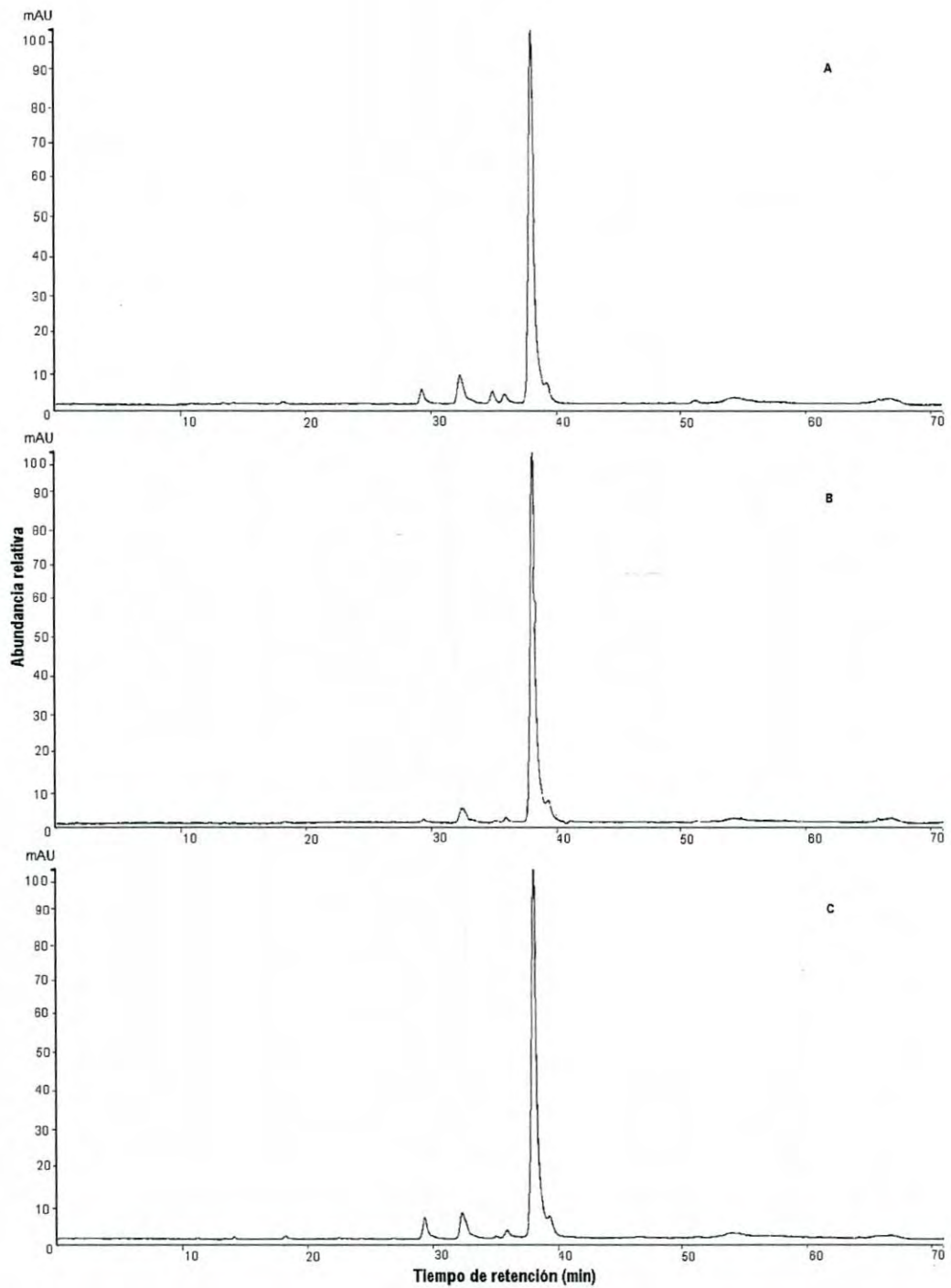
APÉNDICES

Apéndice I. Extracción de resinas y exudados de especies vegetales por inmersión en metanol, acetato de etilo y diclorometano en invierno

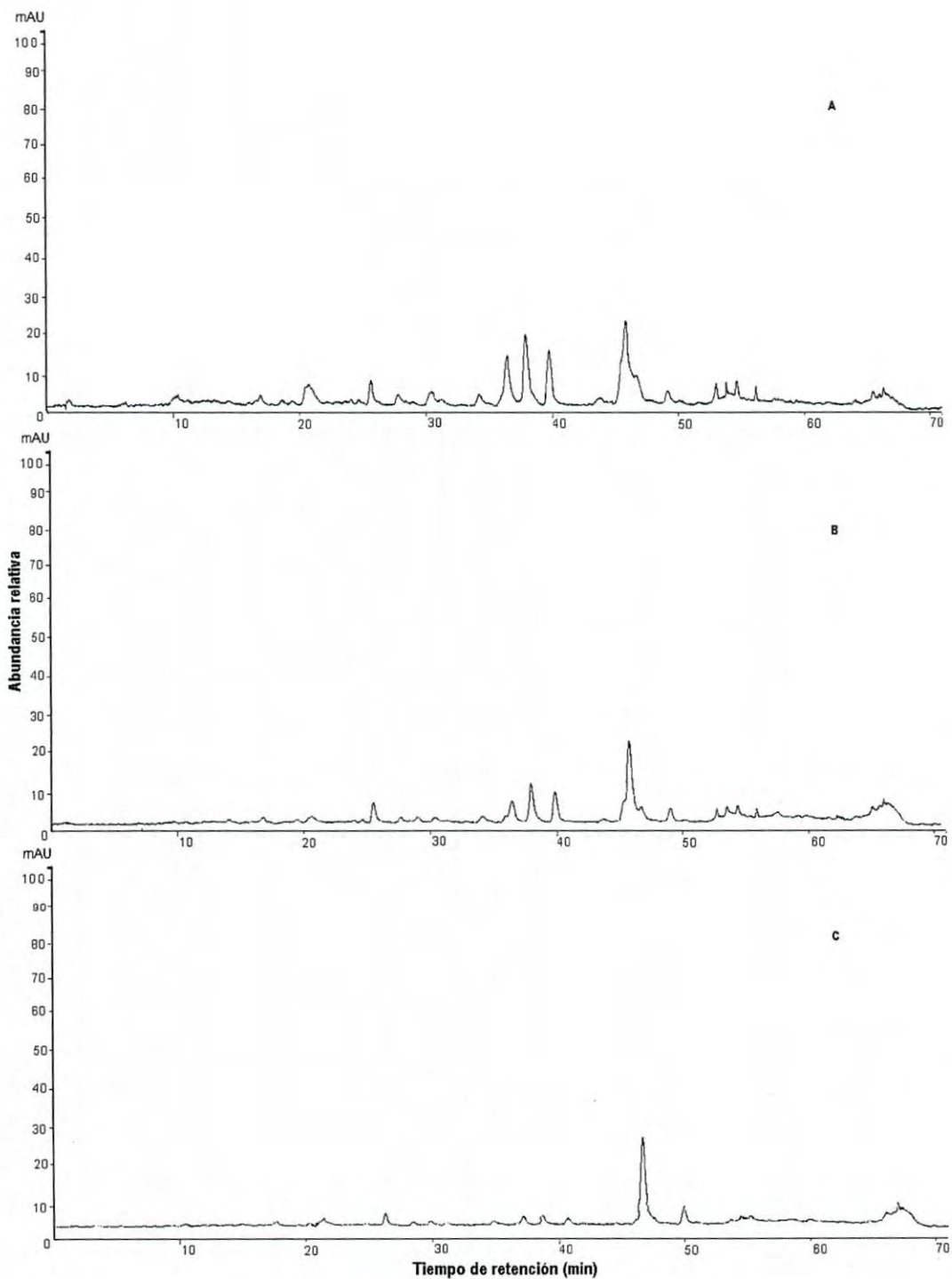
Especie botánica	Inmersión con disolvente	Cantidad colectada (g)	Cantidad extracto recuperado (g)	Rendimiento en porcentaje
<i>Populus fremontii</i>	Metanol	64	0.50	0.78
	Diclorometano	112	0.86	0.77
	Acetato de etilo	94	0.73	0.78
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	Metanol	54	1.05	1.90
	Diclorometano	52	1.08	2.07
	Acetato de etilo	47	0.95	2.0
<i>Bursera laxiflora</i>	Metanol	19	0.03	0.15
	Diclorometano	51	0.131	0.26
	Acetato de etilo	25	0.06	0.23
<i>Prosopis velutina</i>	Metanol	84	0.100	0.12
	Diclorometano	125	0.135	0.08
	Acetato de etilo	112	0.120	0.09



Apéndice II. Perfil cromatográfico de *Populus fremontii* extracción por inmersión. **A:** metanol, **B:** diclorometano y **C:** acetato de etilo.



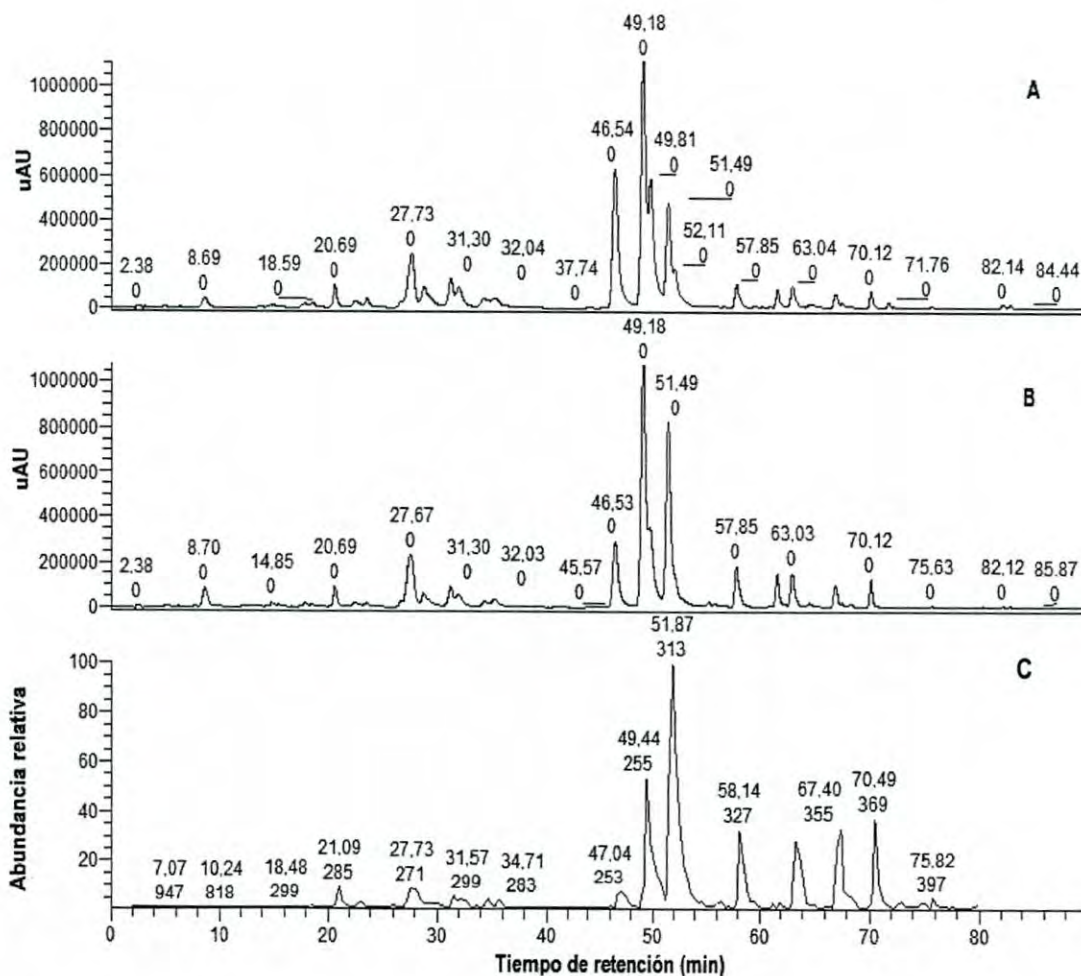
Apéndice III. Perfil cromatográfico de *Ambrosia ambrosioides* extracción por inmersión. **A:** metanol, **B:** diclorometano y **C:** acetato de etilo.



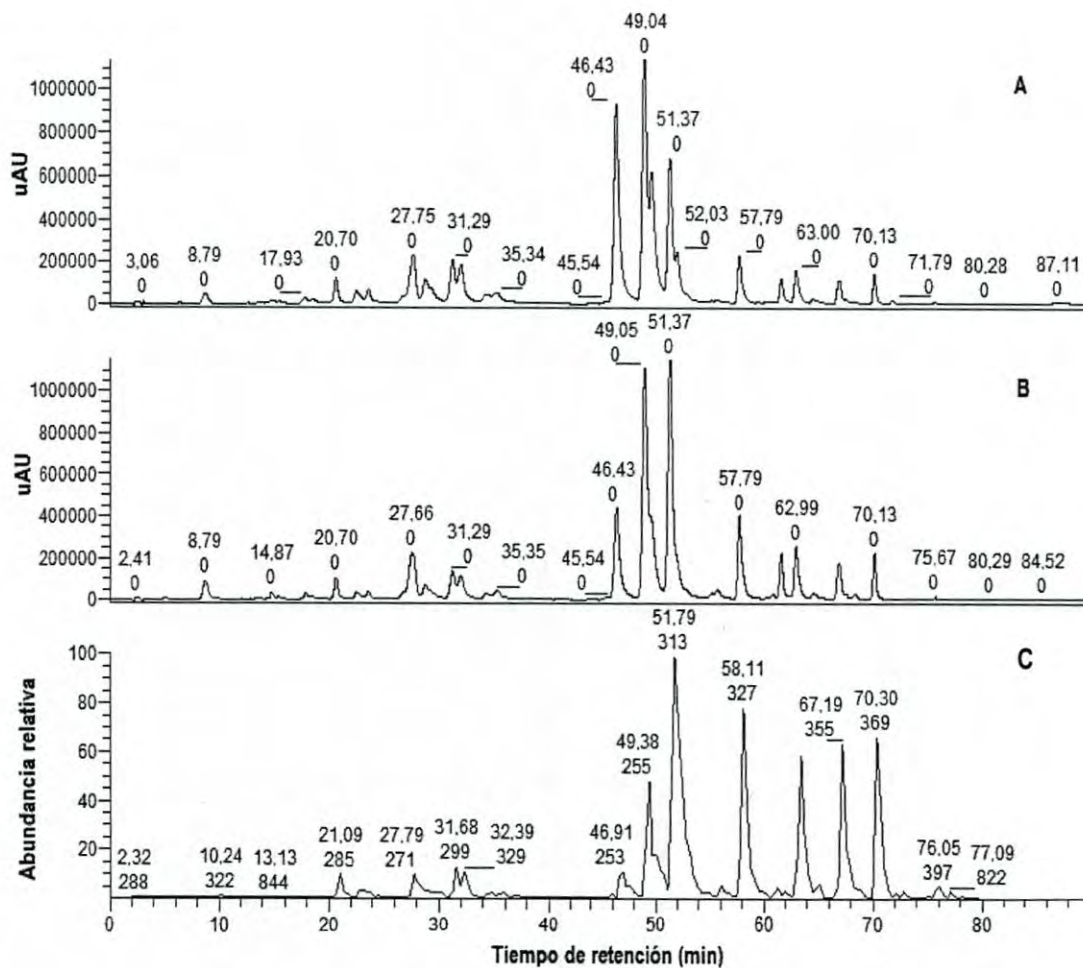
Apéndice IV. Perfil cromatográfico de *Bursera laxiflora* extracción por inmersión. **A:** metanol, **B:** diclorometano y **C:** acetato de etilo.

Apéndice V. Tabla de recolección y extracción de resinas vegetales por inmersión en metanol correspondiente a primavera (24 Marzo, 2010) y verano (11 Julio, 2010).

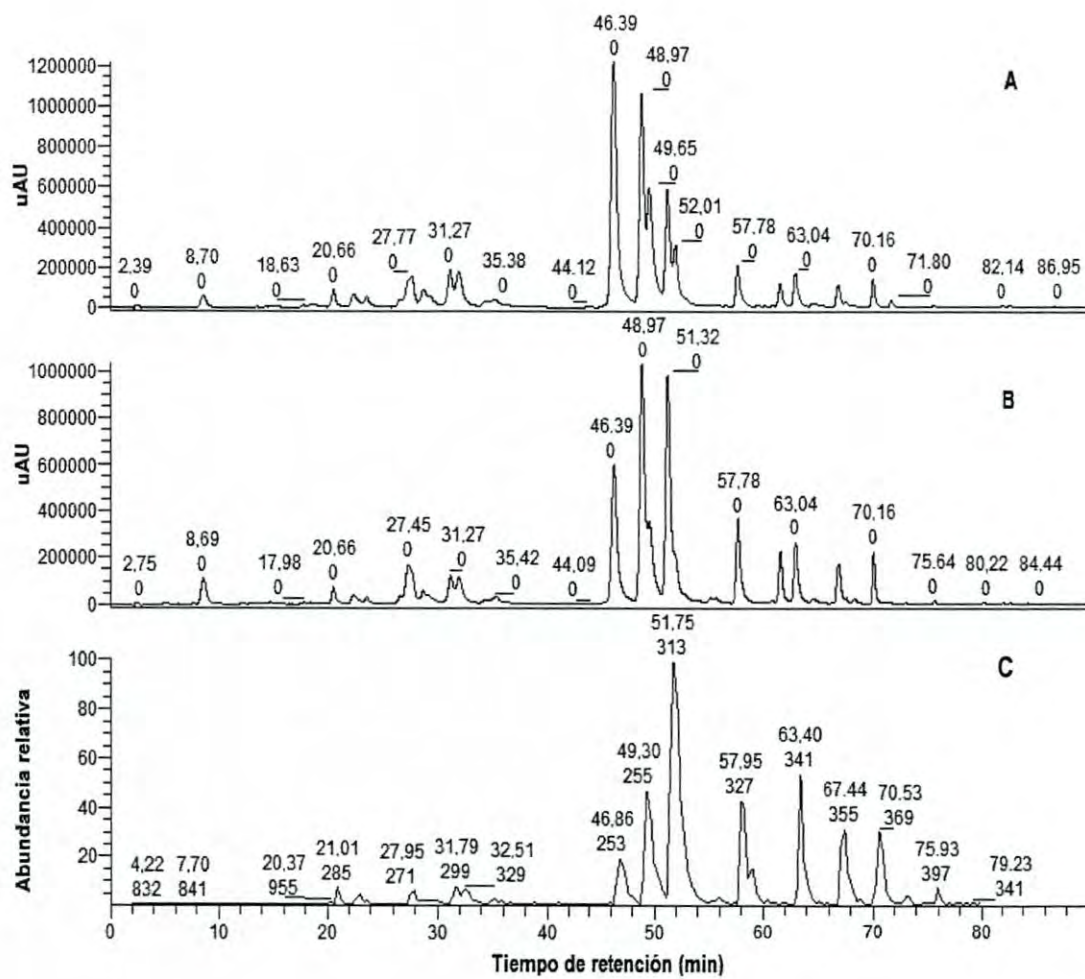
Especie botánica	Cantidad		Cantidad de		Cantidad de	
	recolectada (g)	resina recuperada (g)	Rendimiento en porcentaje	Cantidad colectada (g)	resina recuperada (g)	Rendimiento en porcentaje
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	208	4.31	2.10	230	4.74	2.00
<i>Populus fremontii</i>	75	0.61	0.82	230	1.80	0.80
<i>Bursera laxiflora</i>	229	0.74	0.32	300	0.72	0.24
<i>Prosopis velutina</i>	350	0.32	0.09	550	0.56	0.10



Apéndice VII. Cromatograma obtenido en HPLC-MS-Q-TOF para propóleos recolectados en primavera, donde **A:** registro a λ 280 nm, **B:** registro a λ 340 nm. **C:** Análisis por Espectrometría de masas, mostrando el valor de las masas completas de los compuestos.



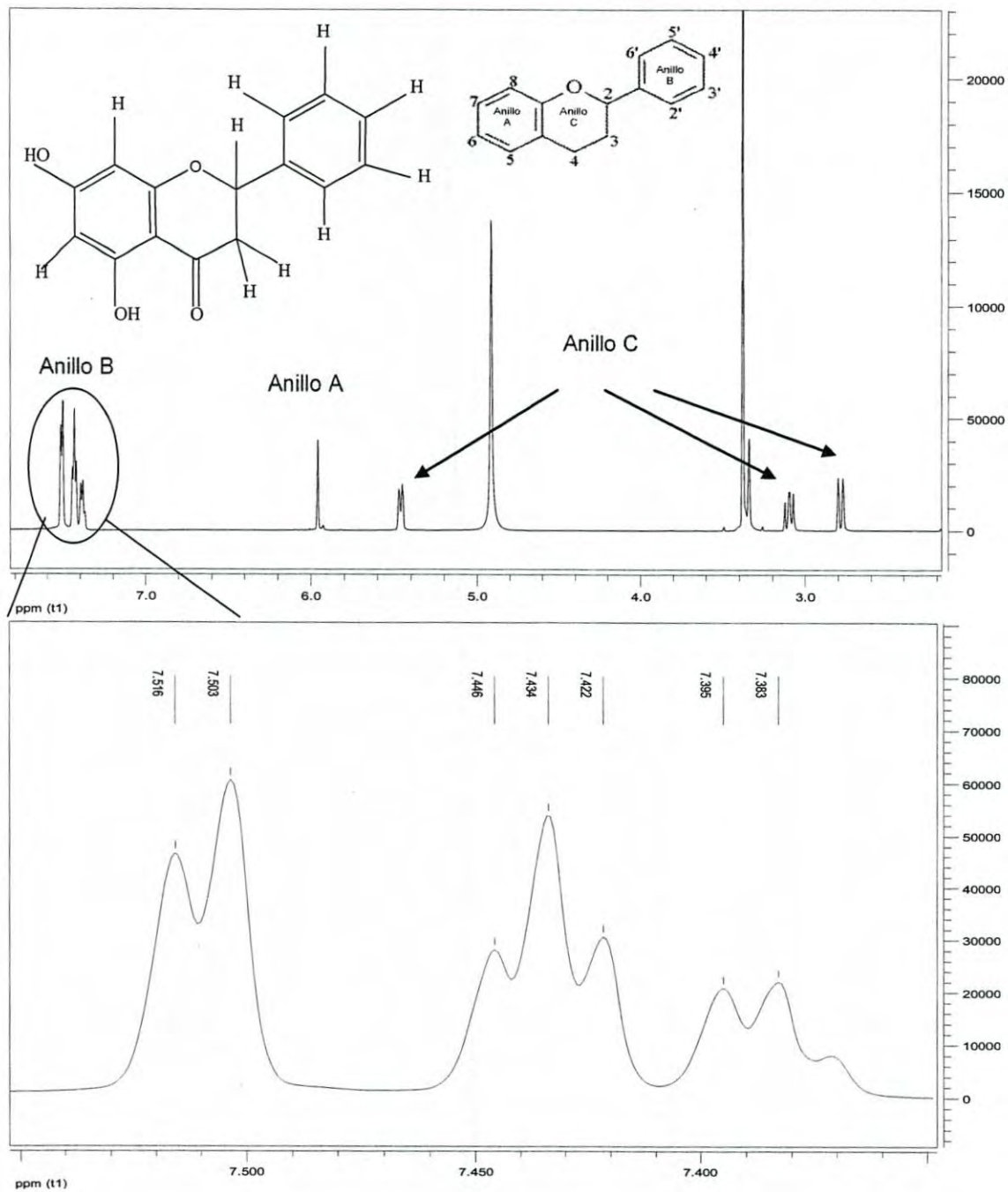
Apéndice VIII. Cromatograma obtenido en HPLC-MS-Q-TOF para propóleos recolectados en verano, donde **A**: registro a λ 280 nm, **B**: registro a λ 340 nm. **C**: Análisis por Espectrometría de masas, mostrando el valor de las masas completas de los compuestos.



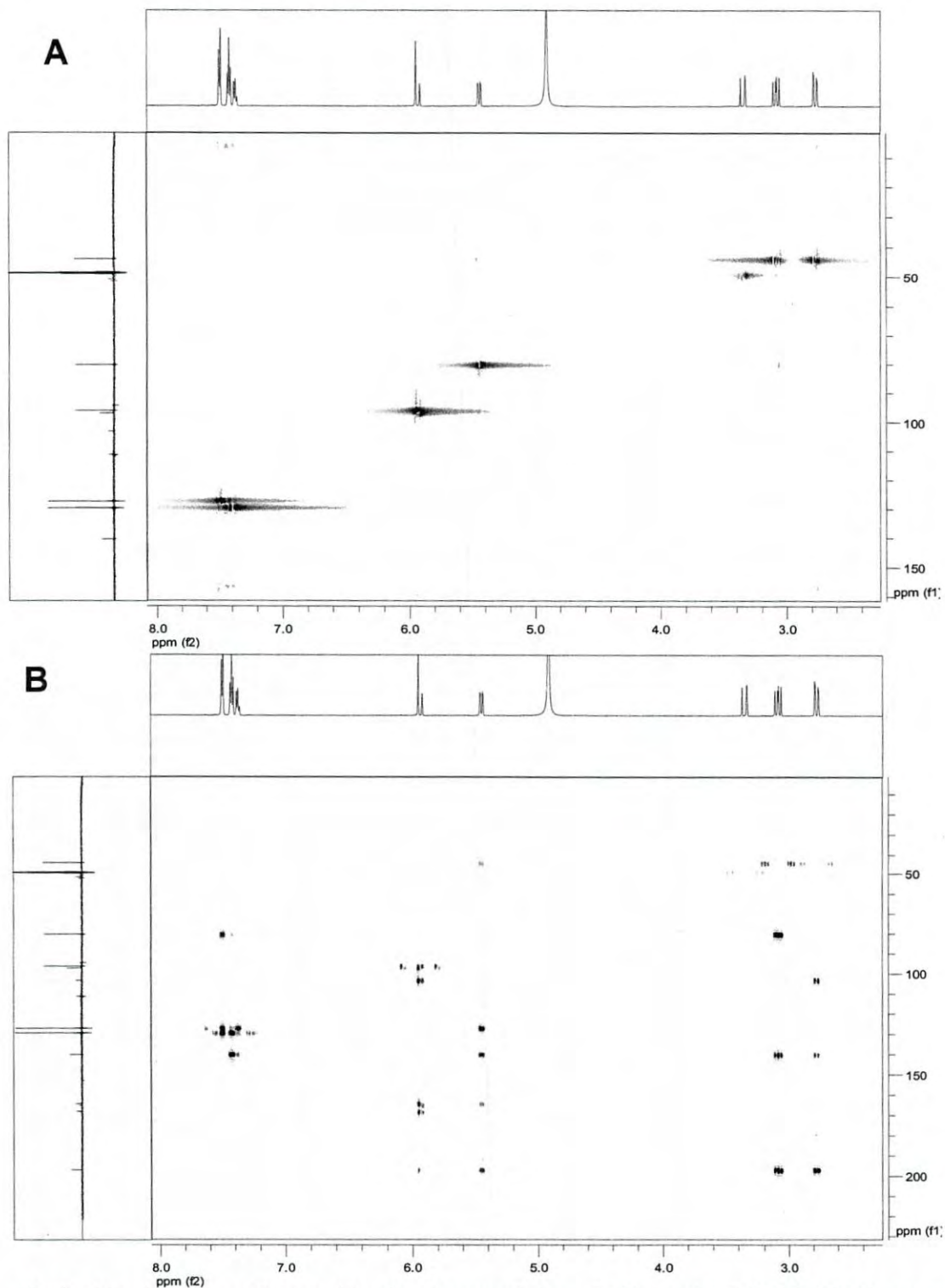
Apéndice IX. Cromatograma obtenido en HPLC-MS-Q-TOF para propóleos recolectados en otoño, donde **A**: registro a λ 280 nm, **B**: registro a λ 340 nm. **C**: Análisis por Espectrometría de masas, mostrando el valor de las masas completas de los compuestos.

Apéndice X. Tabla de número de subfracciones obtenidas por HPLC semi-preparativo para cada fracción de Sephadex LH-20

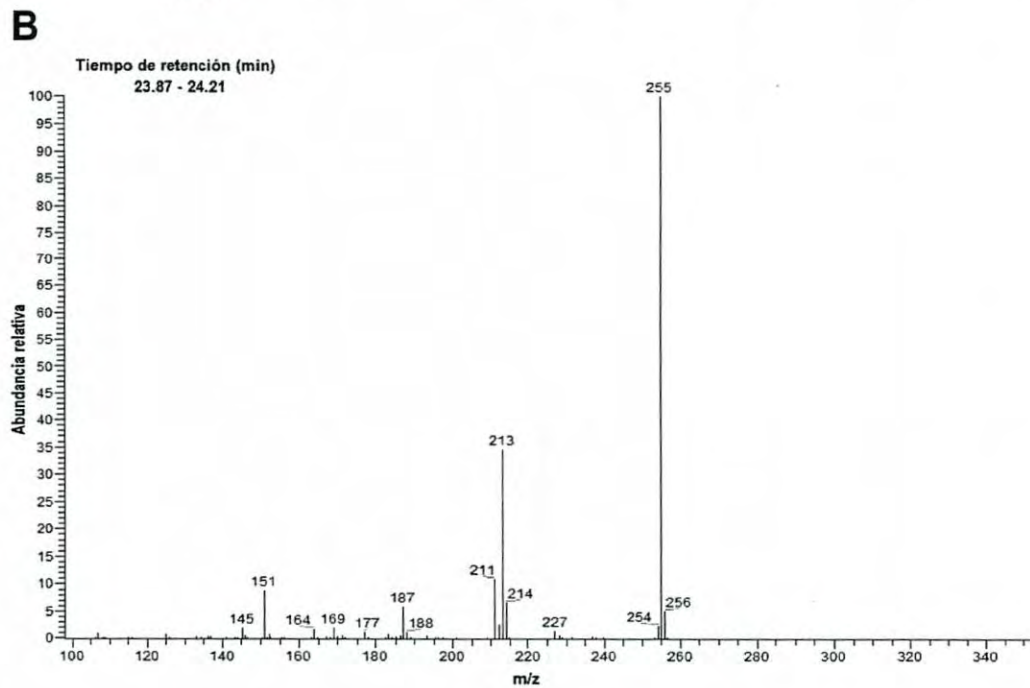
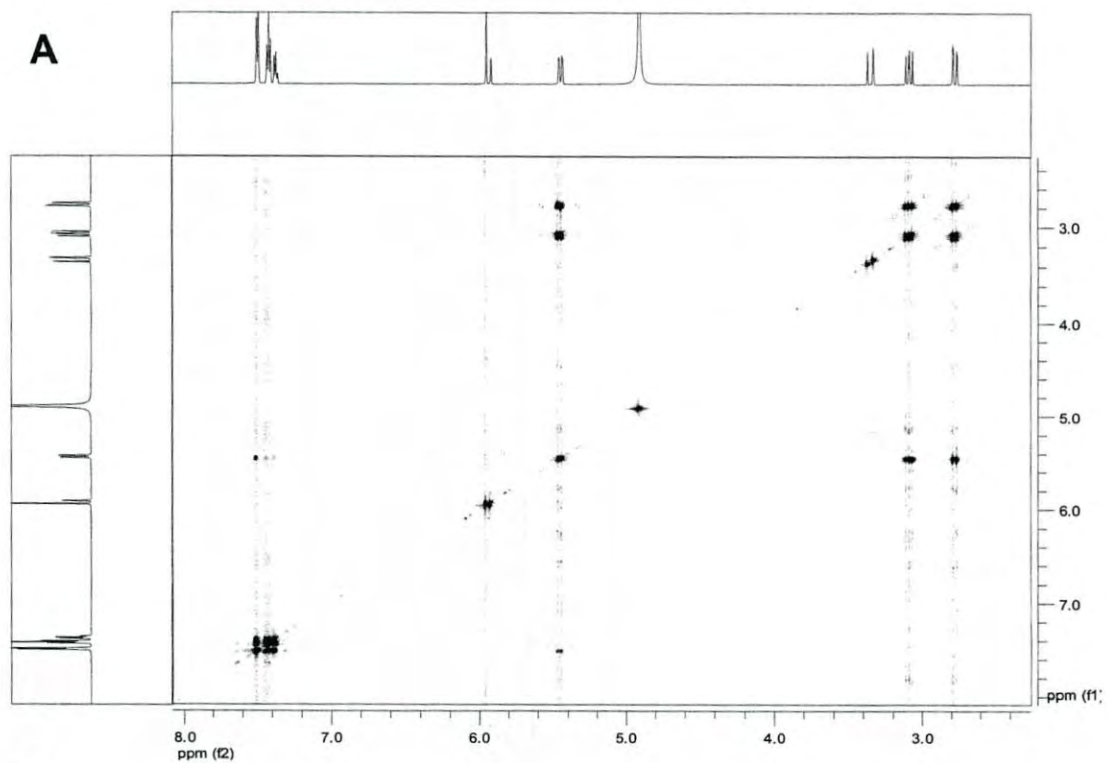
		Número de fracción obtenida en Sephadex						
		Cantidad en miligramos (mg)						
Número de subfracciones obtenidas por HPLC		4	5	6	7	8	9	10
	1	2.1	4.6	2.2	0.5	0.2	1.8	0.6
	2	0.2	1.7	1.4	1.4	0.7	1.1	1.8
	3	0.3	2.3	1.8	1.0	0.4	1.1	1.2
	4	0.7	2.5	10	0.5	0.4	1.0	0.9
	5	0.5	3.0	3.3	1.0	0.3	2.9	1.4
	6	0.6	1.2	7.6	1.9	0.6	0.6	0.5
	7	0.6	0.9	4.5	1.9	0.1	0.7	1.3
	8	1.4	8.3	20.5	17.8	2.7	1.0	-
	9	1.6	3.7	12.6	0.6	0.8	2.8	-
	10	1.1	1.0	4.1	3.1	1.4	2.4	-
	11	1.7	1.2	9.5	2.6	2.7	2.6	-
	12	1.4	3.6	4.6	2.1	0.2	2.5	-
	13	0.5	0.8	2.0	-	2.4	3.4	-
	14	0.5	2.7	-	-	1.6	-	-
	15	0.7	2.3	-	-	1.2	-	-
	16	1.3	2.7	-	-	-	-	-
	17	0.9	1.7	-	-	-	-	-
	18	1.4	4.5	-	-	-	-	-
	19	0.3	1.1	-	-	-	-	-
	20	0.1	-	-	-	-	-	-
	21	0.1	-	-	-	-	-	-
Lavado	10.2	3.2	5.5	2.7	5.0	8.3	1.8	



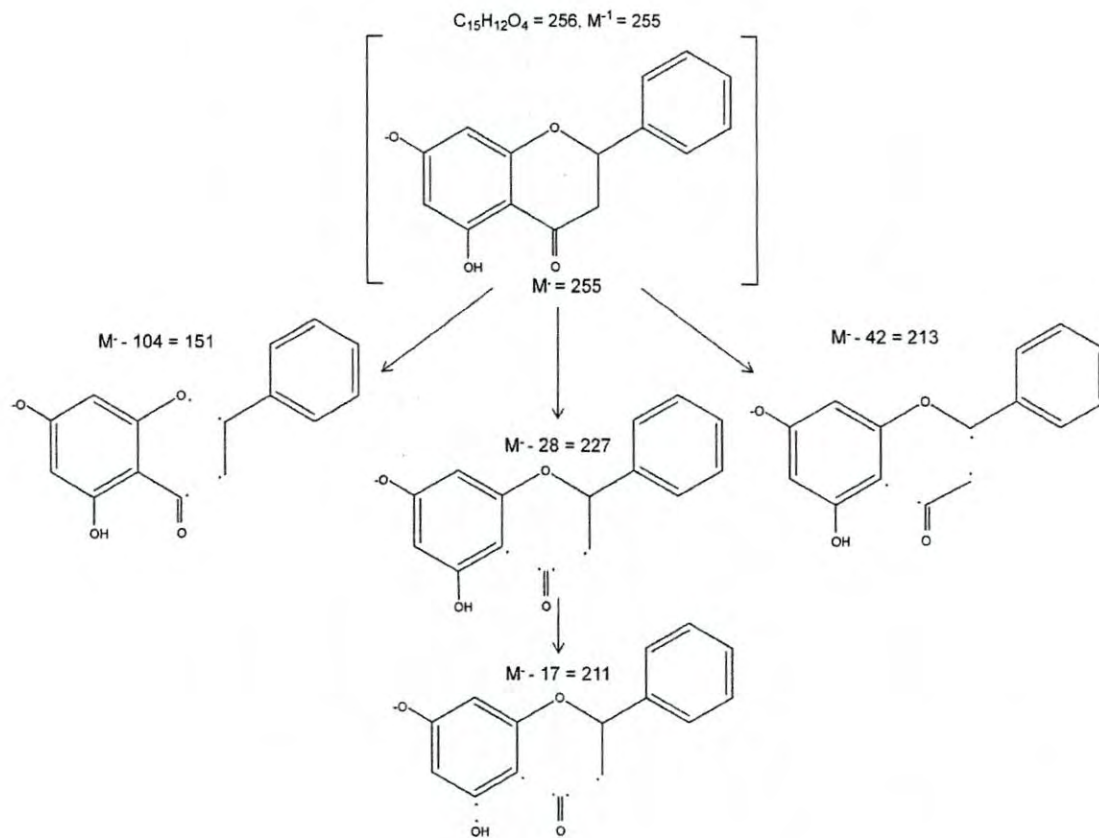
Apéndice XI. Caracterización de pinocembrina. Espectro Protónico ^1H NMR 600 MHz



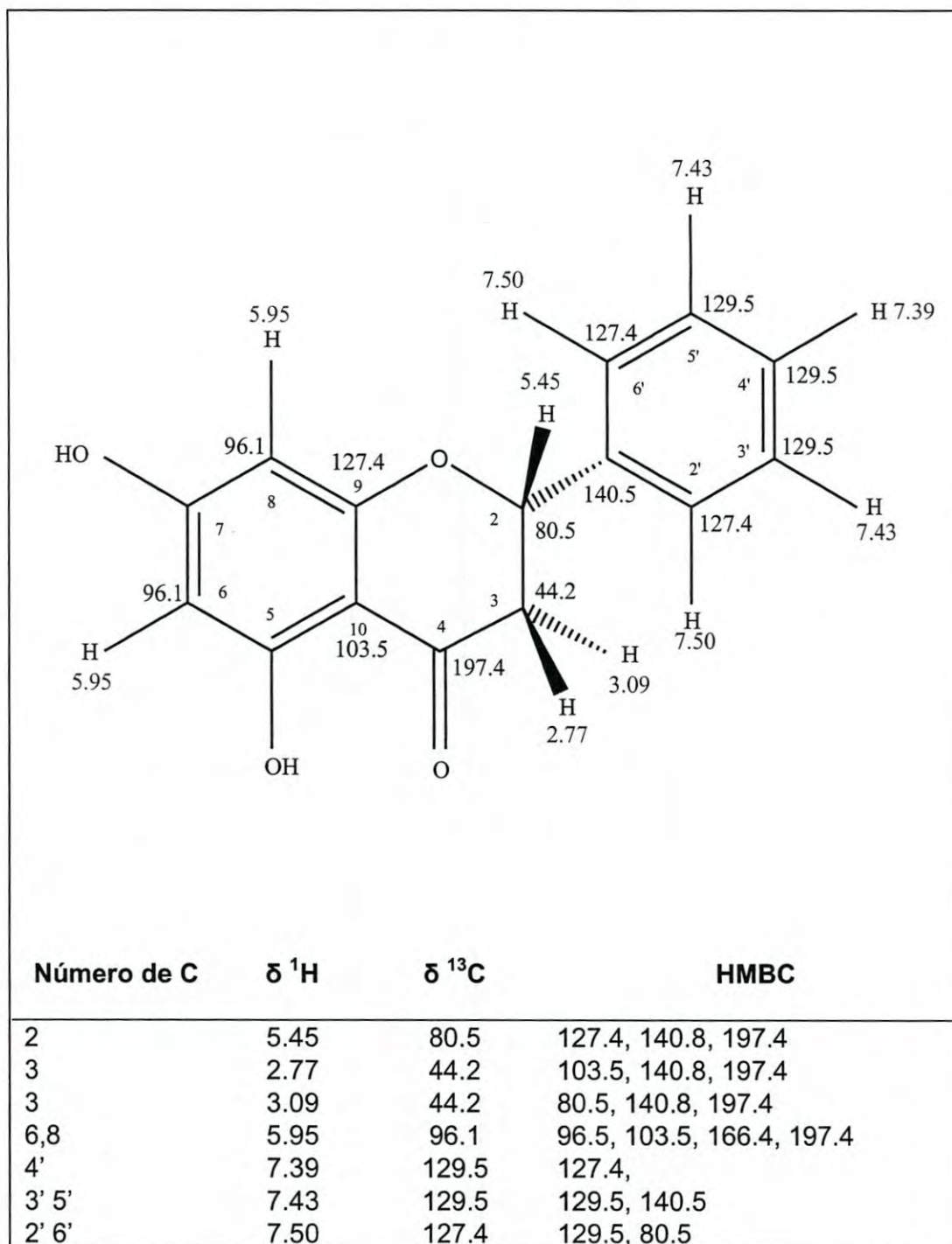
Apéndice XII. Caracterización de pinocembrina. A: Espectro HSQC. B: Espectro HMBC.



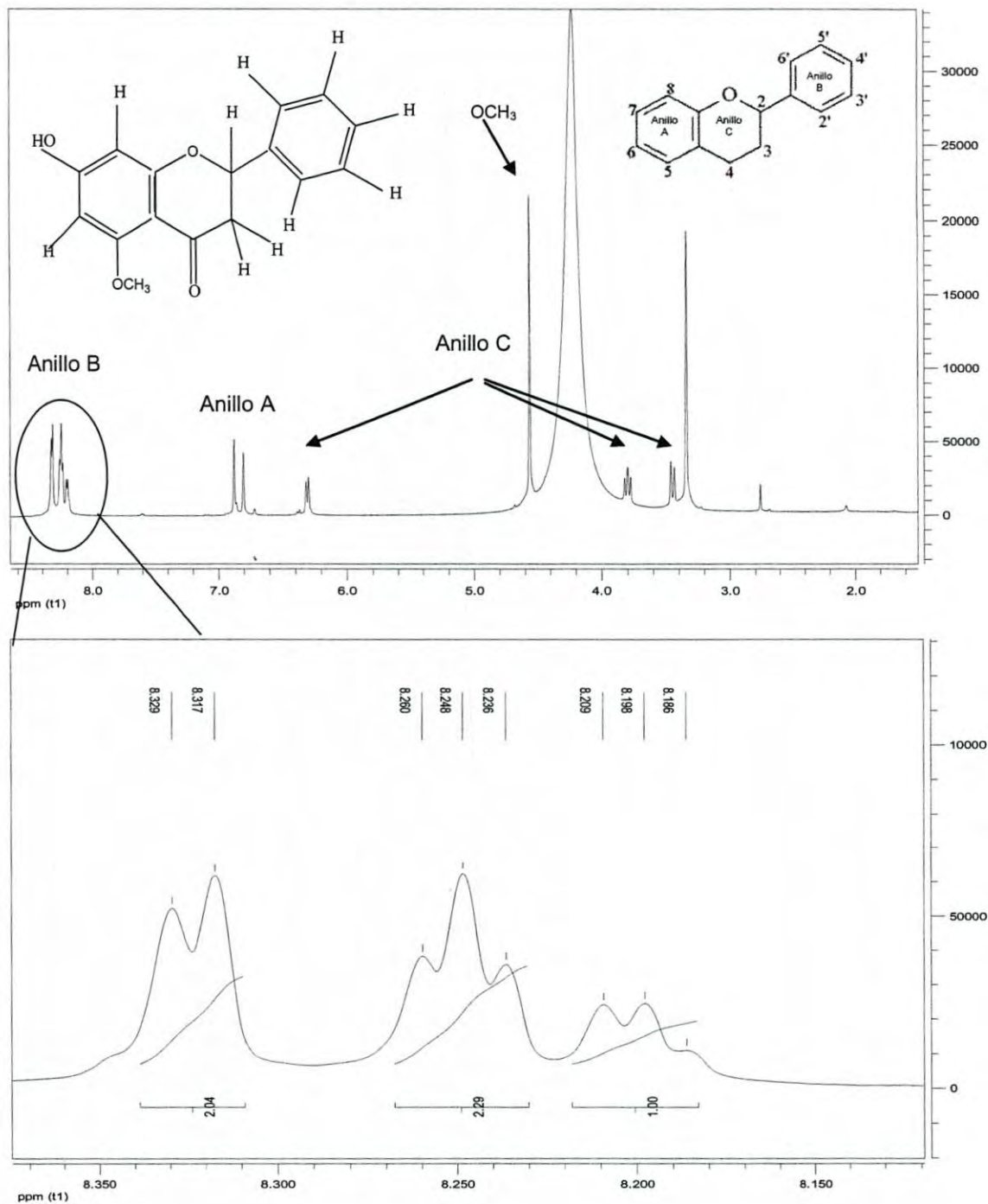
Apéndice XIII. Pinocembrina. A: Espectro bidimensional COSY, **B:** Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF.



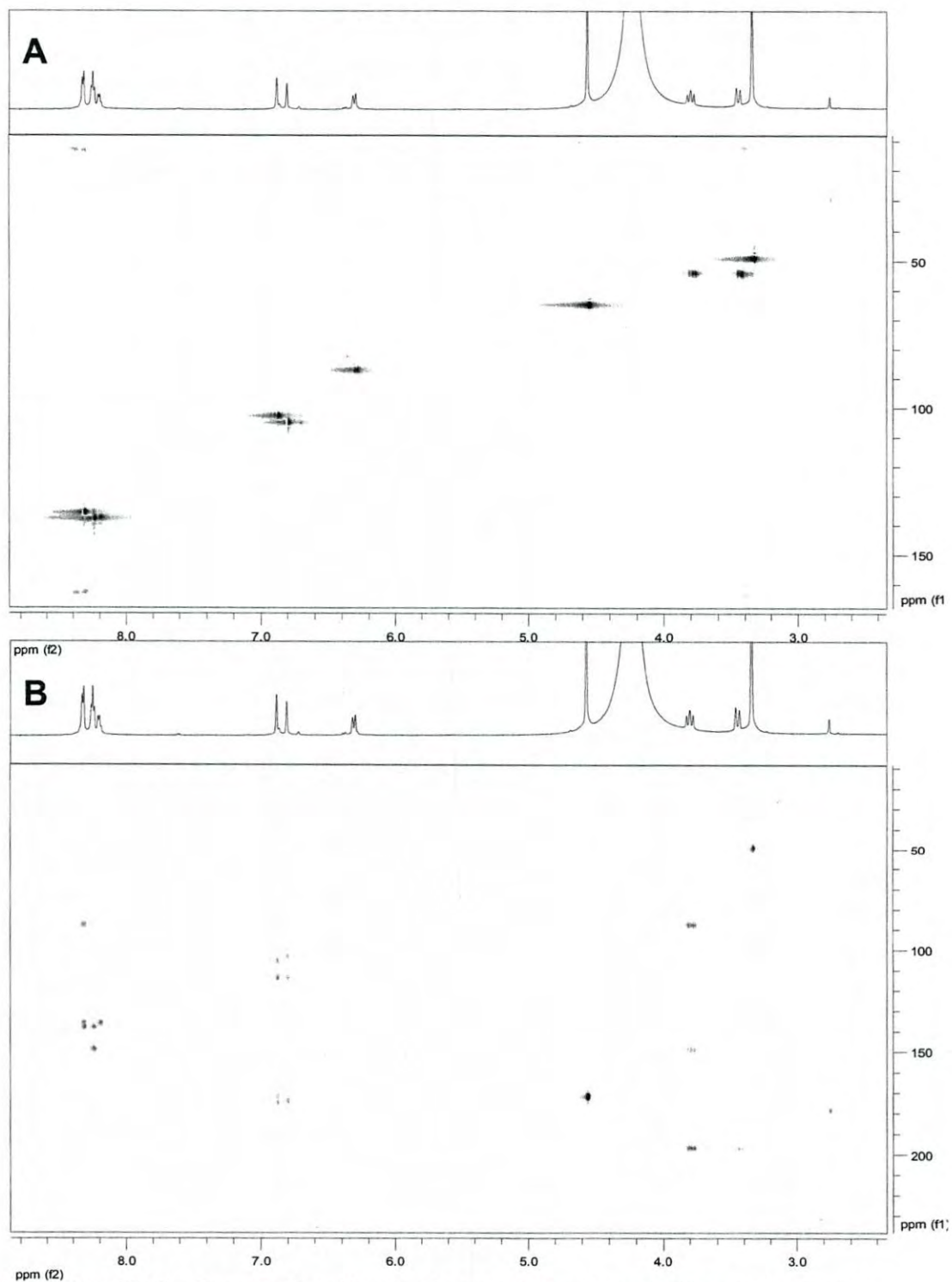
Apéndice XIV. Patrón de fragmentación de pinocembrina en HPLC-MS-Q-TOF.



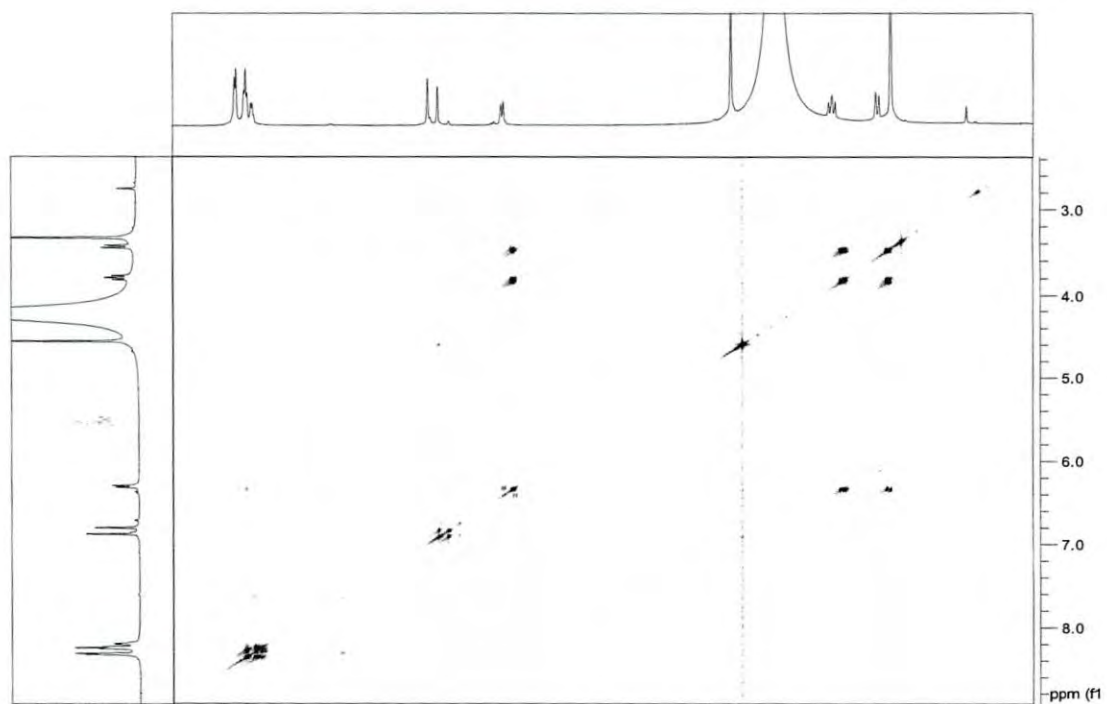
Apéndice XV. Estructura de pinocembrina



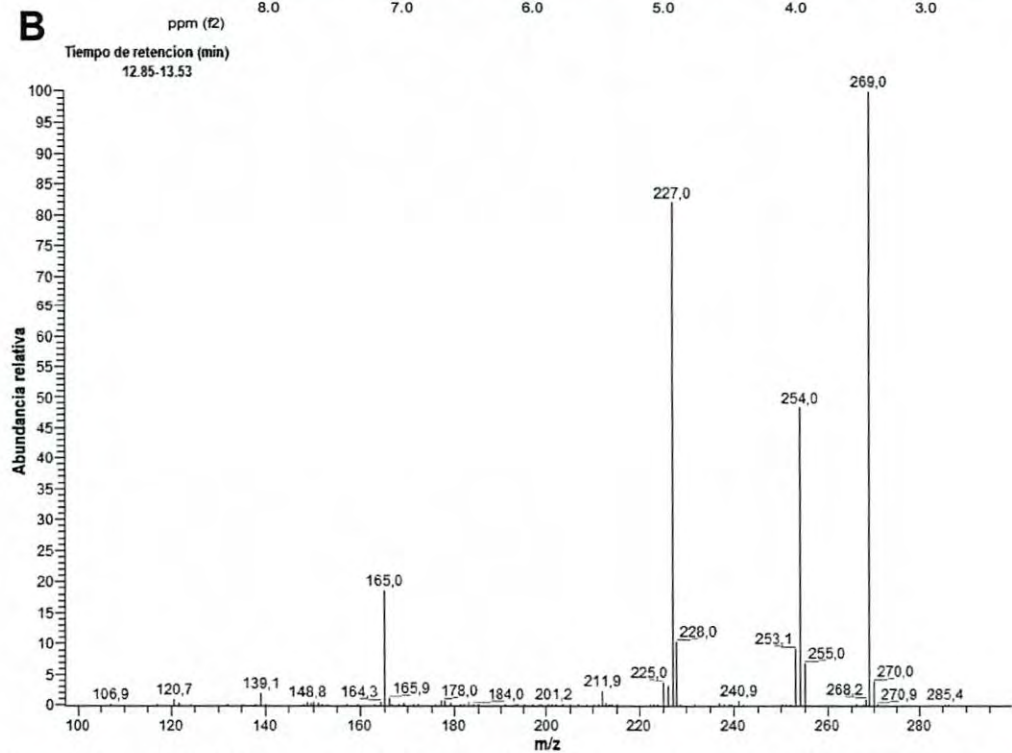
Apéndice XVI. Caracterización de pinocembrina-5-metil éter. Espectro Protónico ^1H NMR 600 MHz



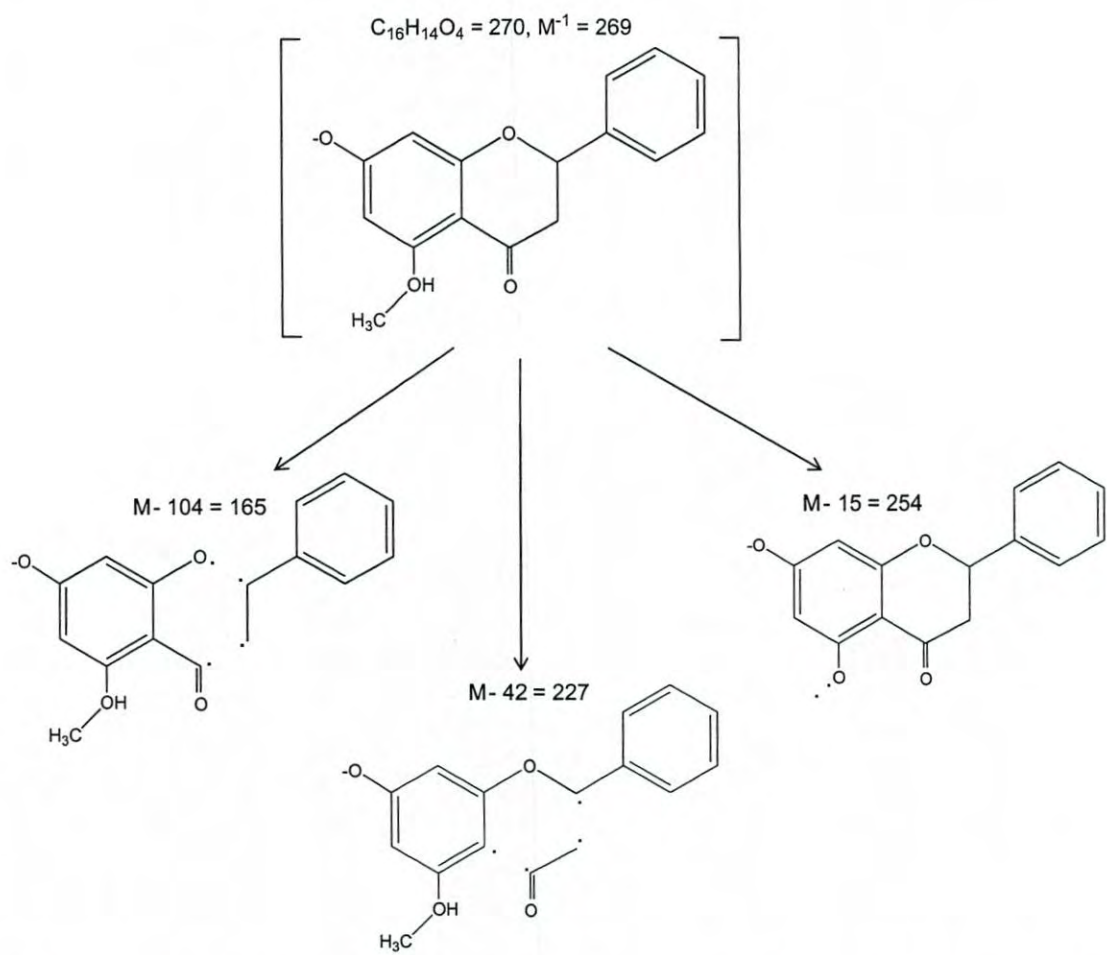
Apéndice XVII. Caracterización de pinocembrina-5-metil éter. **A:** Espectro HSQC. **B:** Espectro HMBC.



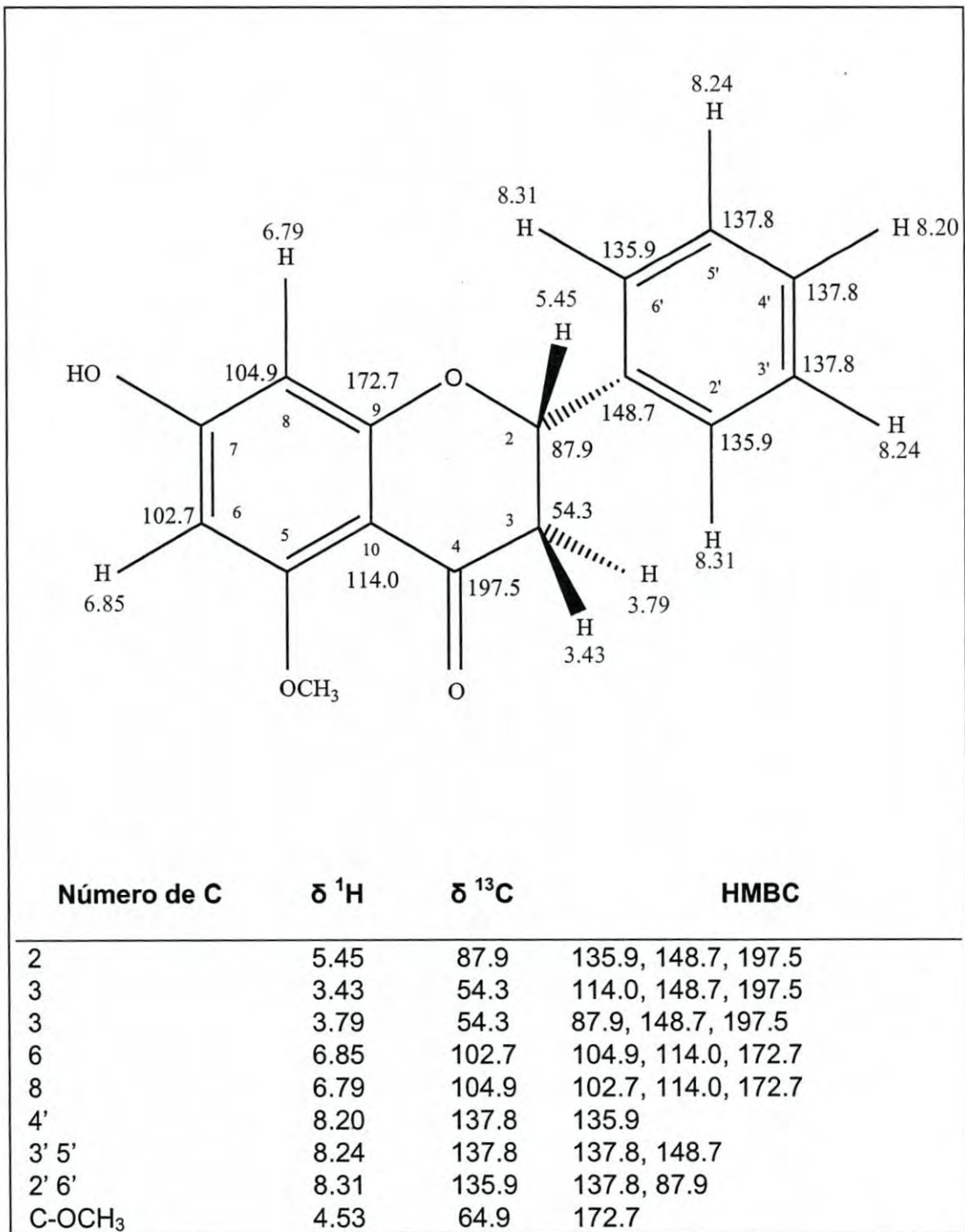
B



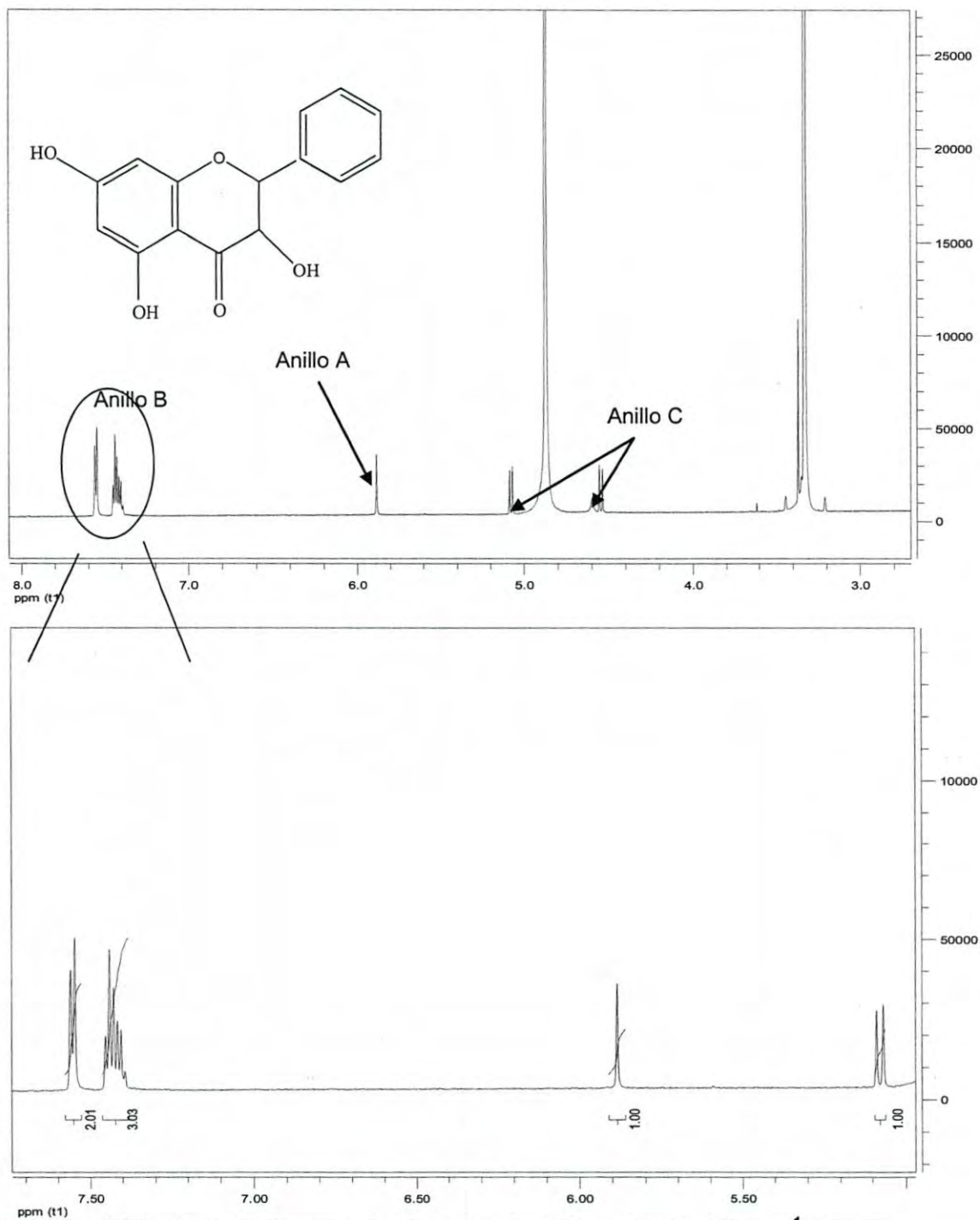
Apéndice XVIII. Pinocembrina-5-metil éter. **A:** Espectro bidimensional COSY, **B:** Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF.



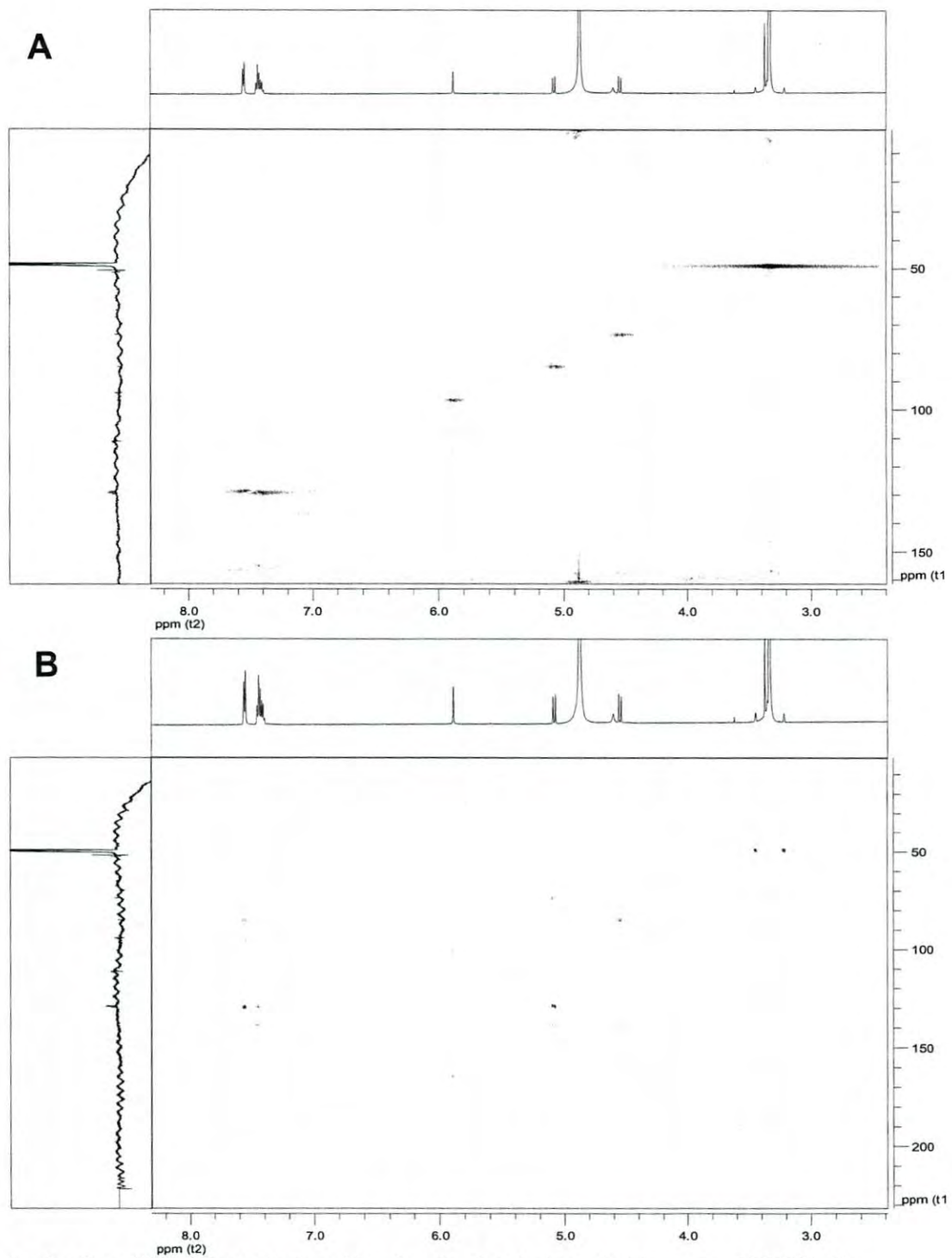
Apéndice XIX. Patrón de fragmentación de pinocembrina-5-metil éter en HPLC-MS-Q-TOF



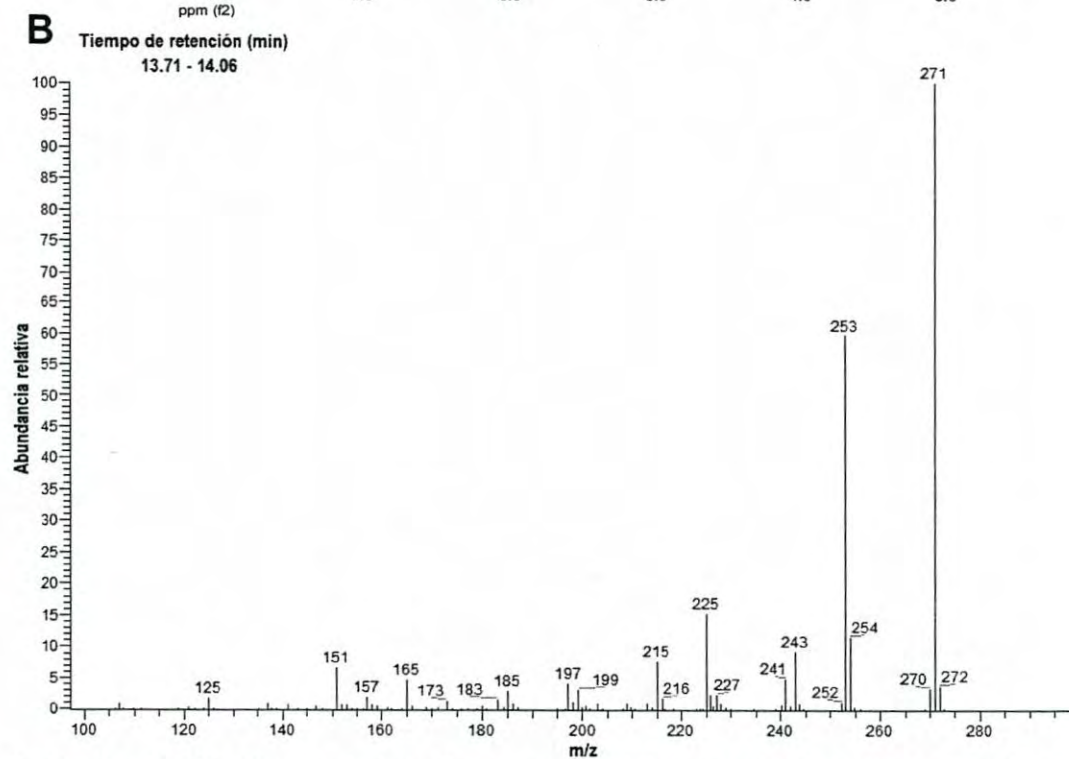
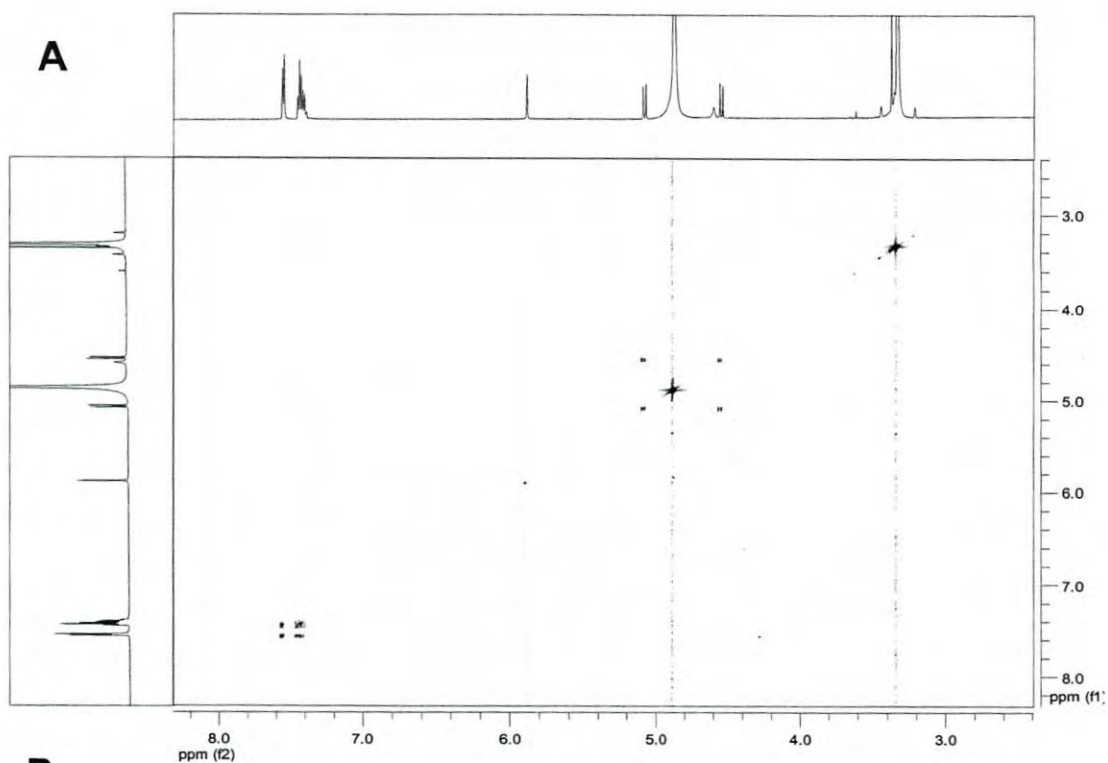
Apéndice XX. Estructura de pinocembrina-5-metil éter



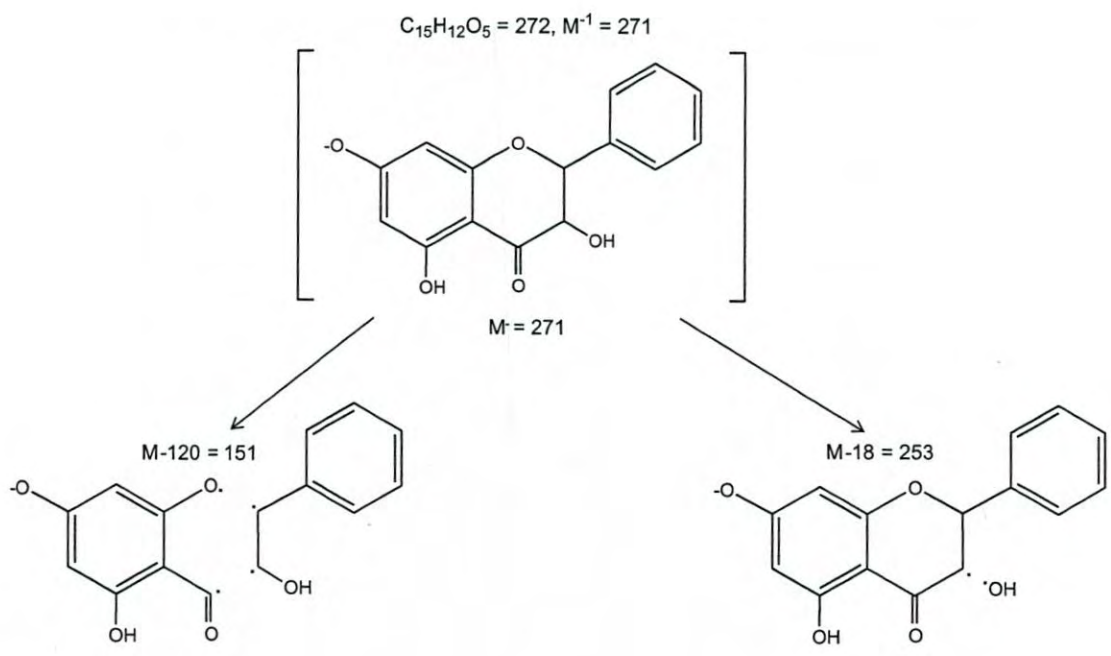
Apéndice XXI. Caracterización de pinobanksina. Espectro Protónico ¹H NMR 600 MHz



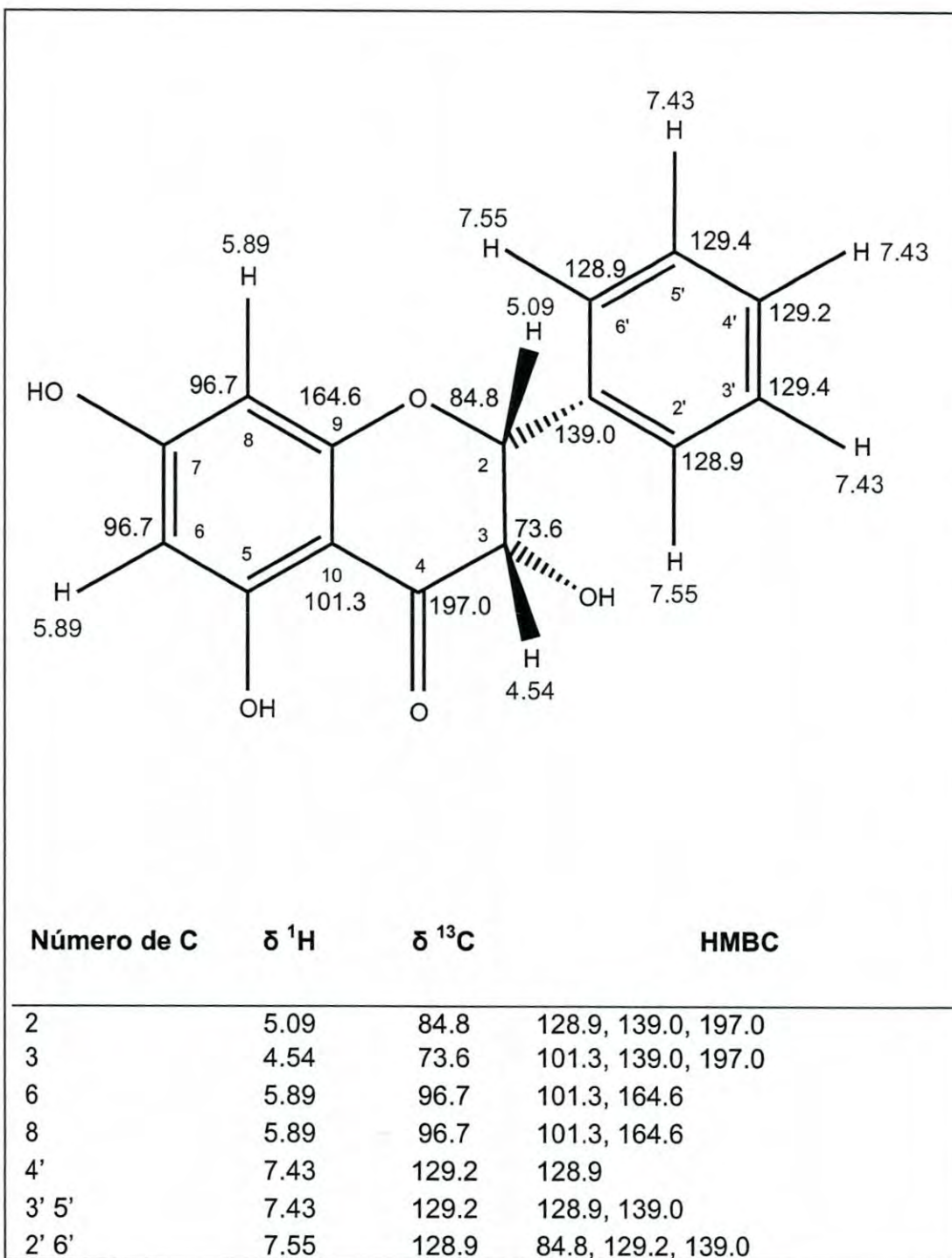
Apéndice XXII. Caracterización de pinobanksina. **A:** Espectro HSQC. **B:** Espectro HMBC.



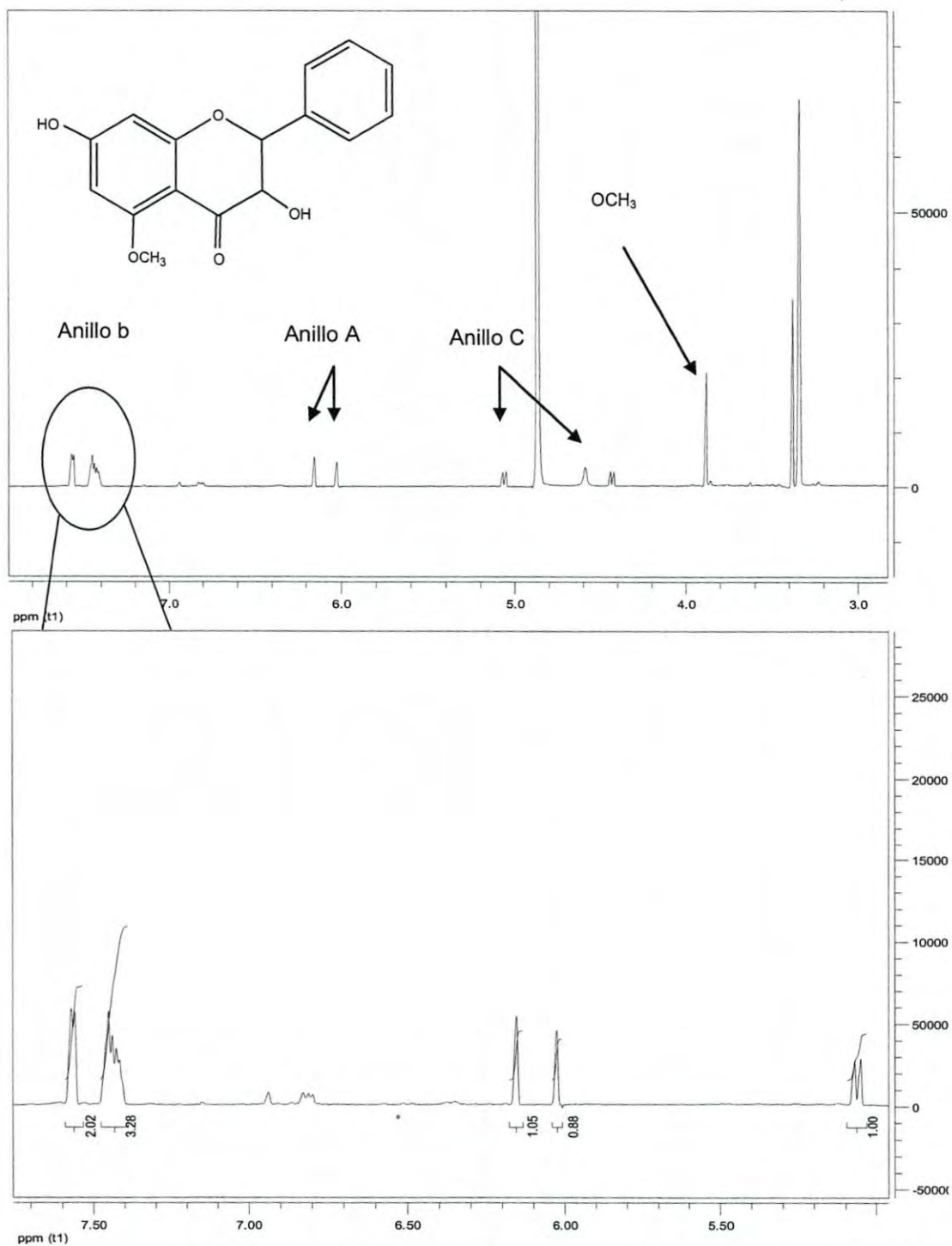
Apéndice XXIII. Pinobanksina. A: Espectro bidimensional COSY, **B:** Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF.



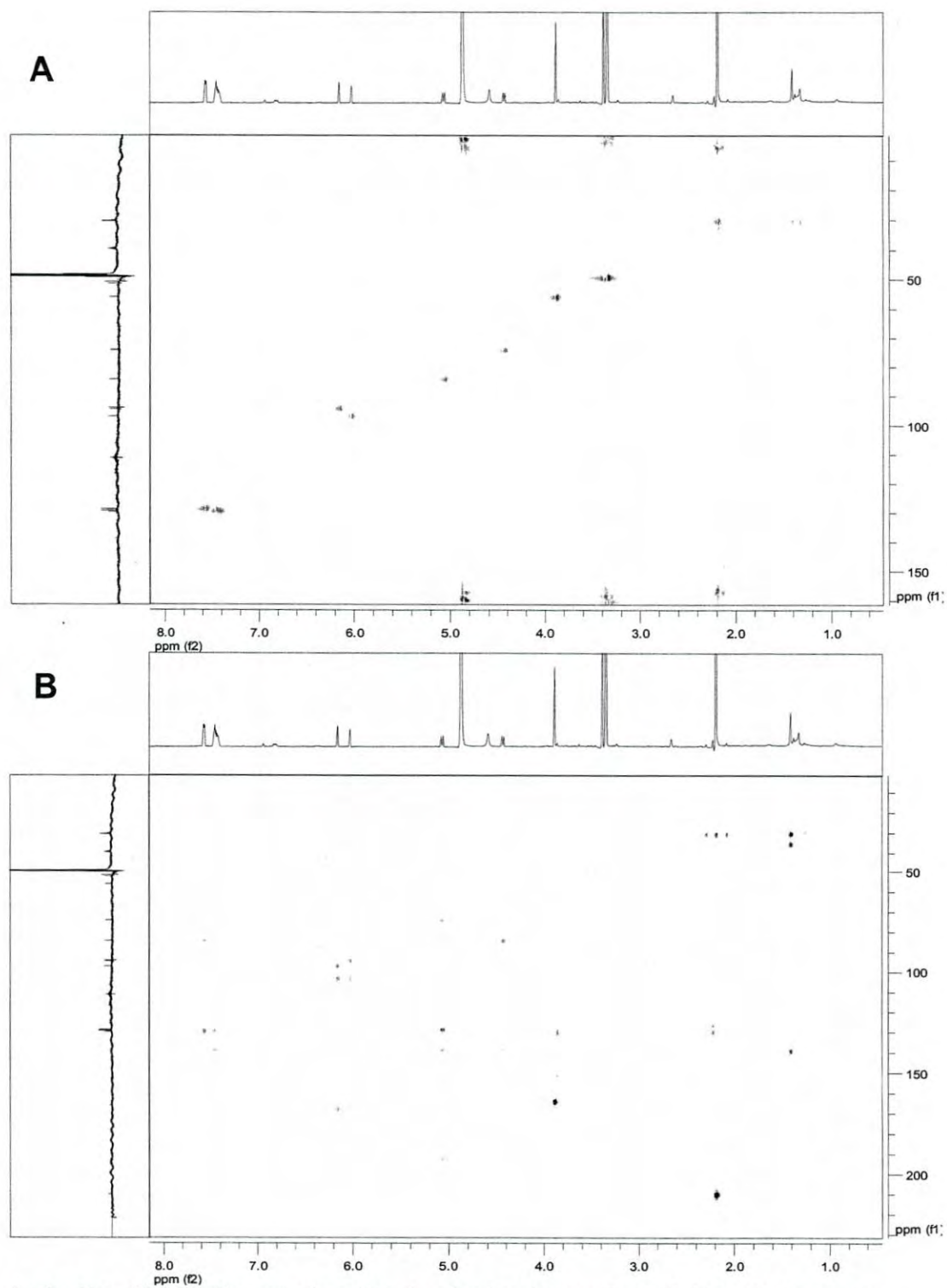
Apéndice XXIV. Patrón de fragmentación de pinobanksina en HPLC-MS-Q-TOF



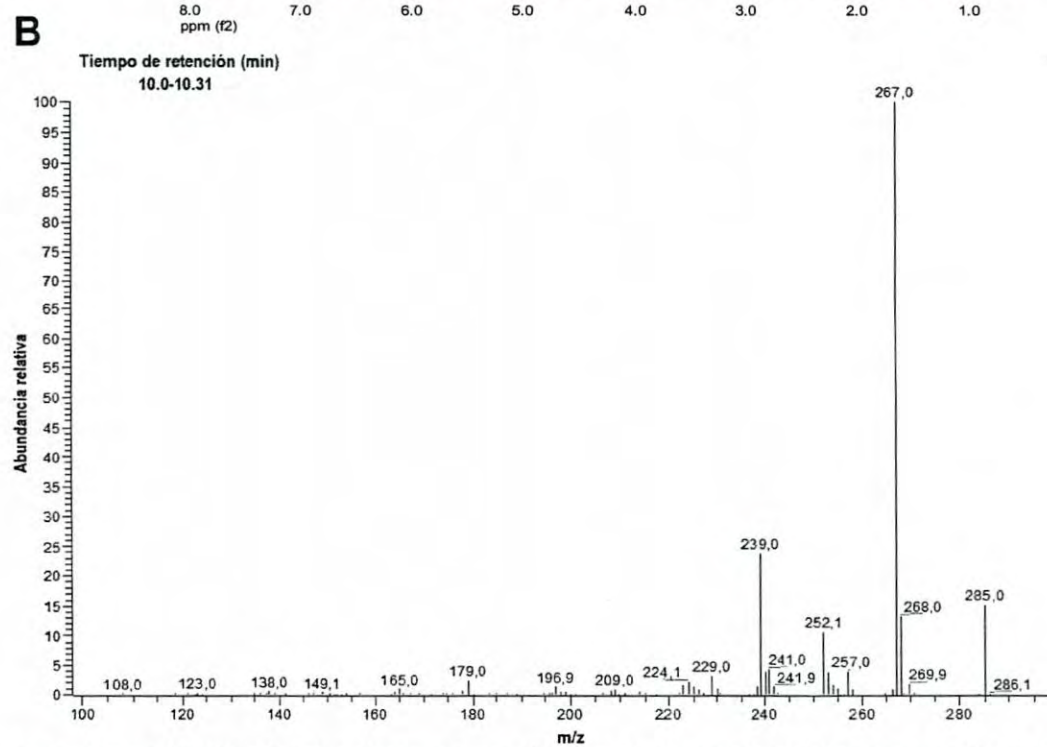
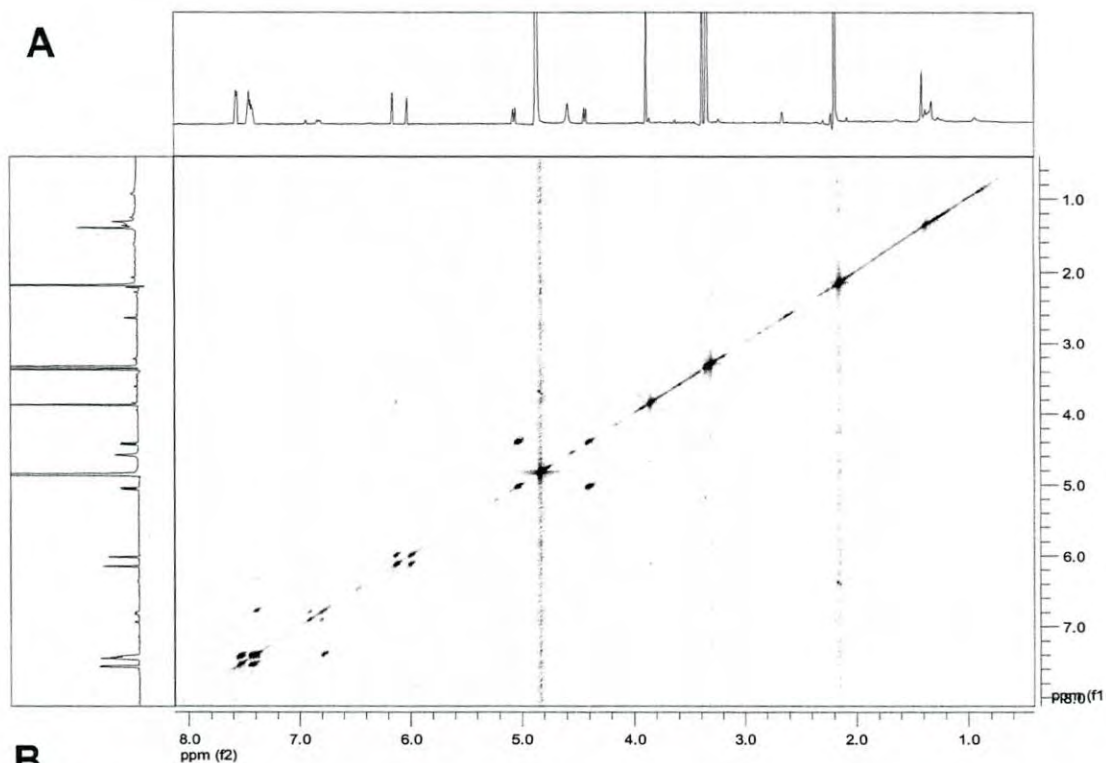
Apéndice XXV. Estructura de pinobanksina.



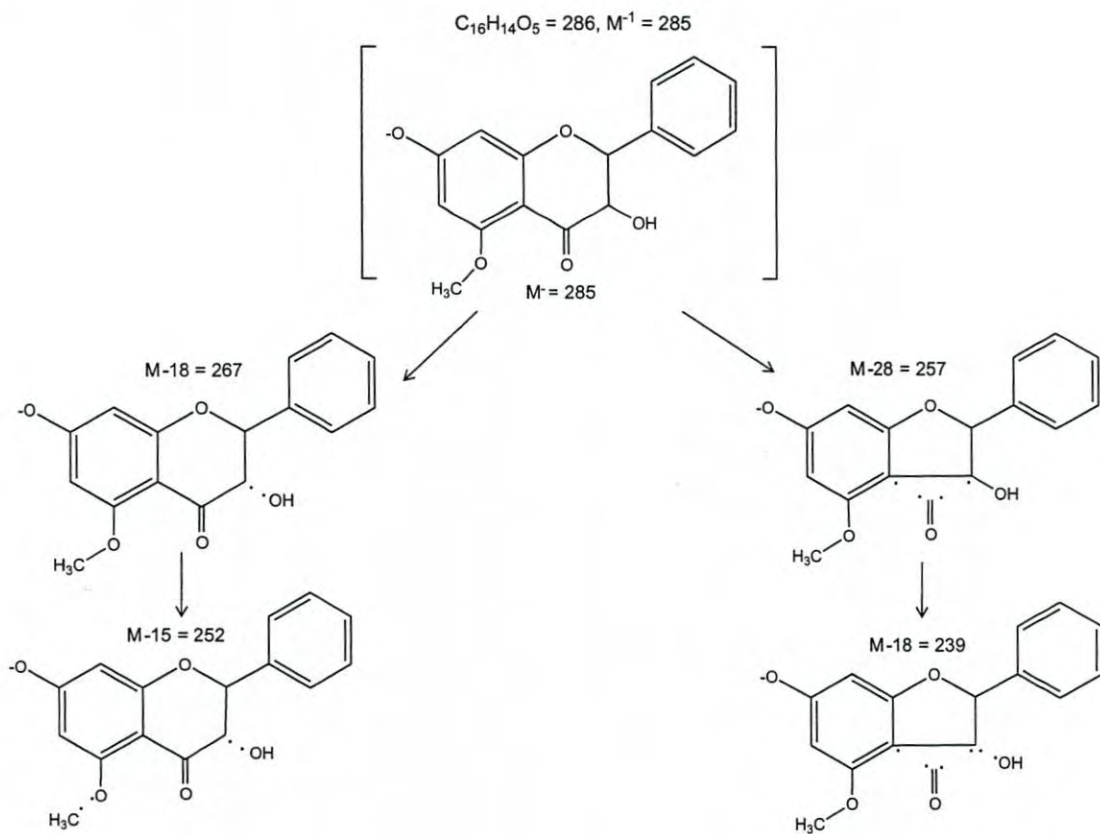
Apéndice XXVI. Caracterización de pinobanksina-5-metil éter. Espectro Protónico ^1H NMR 600 MHz



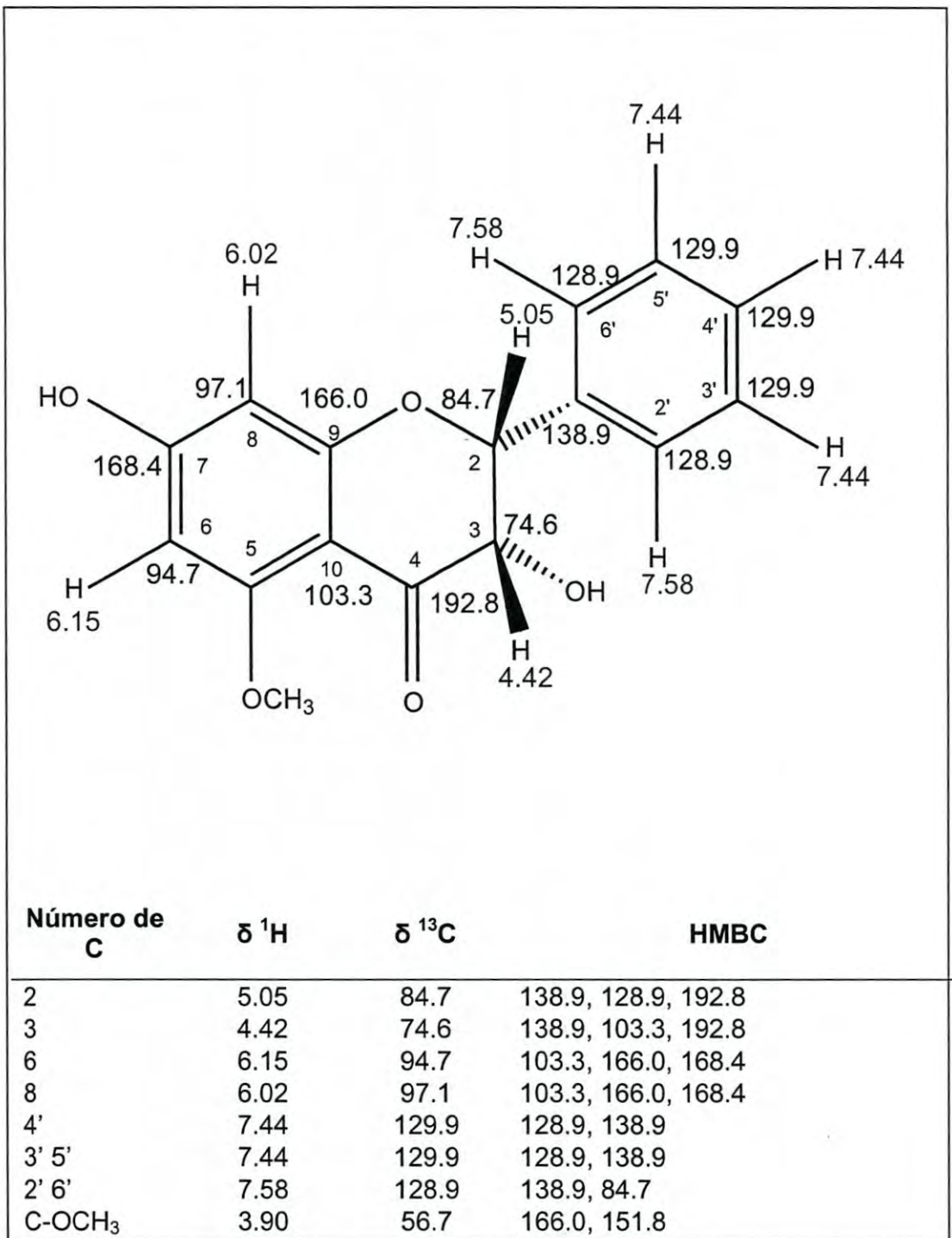
Apéndice XXVII. Caracterización de pinobanksina-5-metil éter. **A:** Espectro HSQC. **B:** Espectro HMBC.



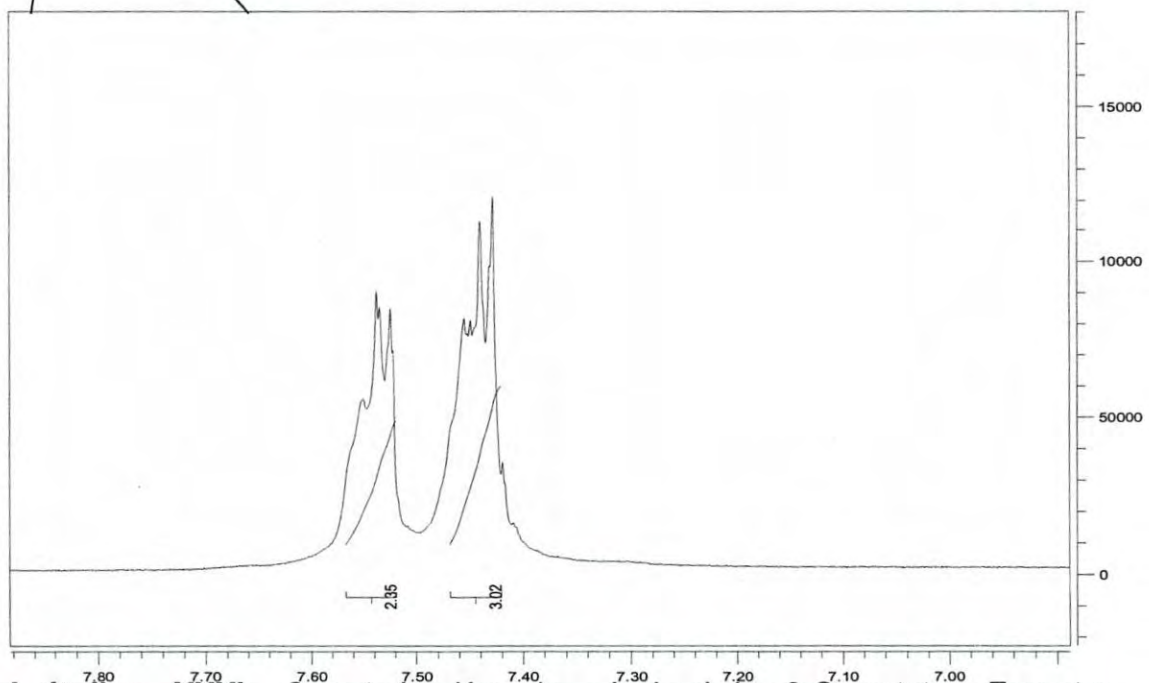
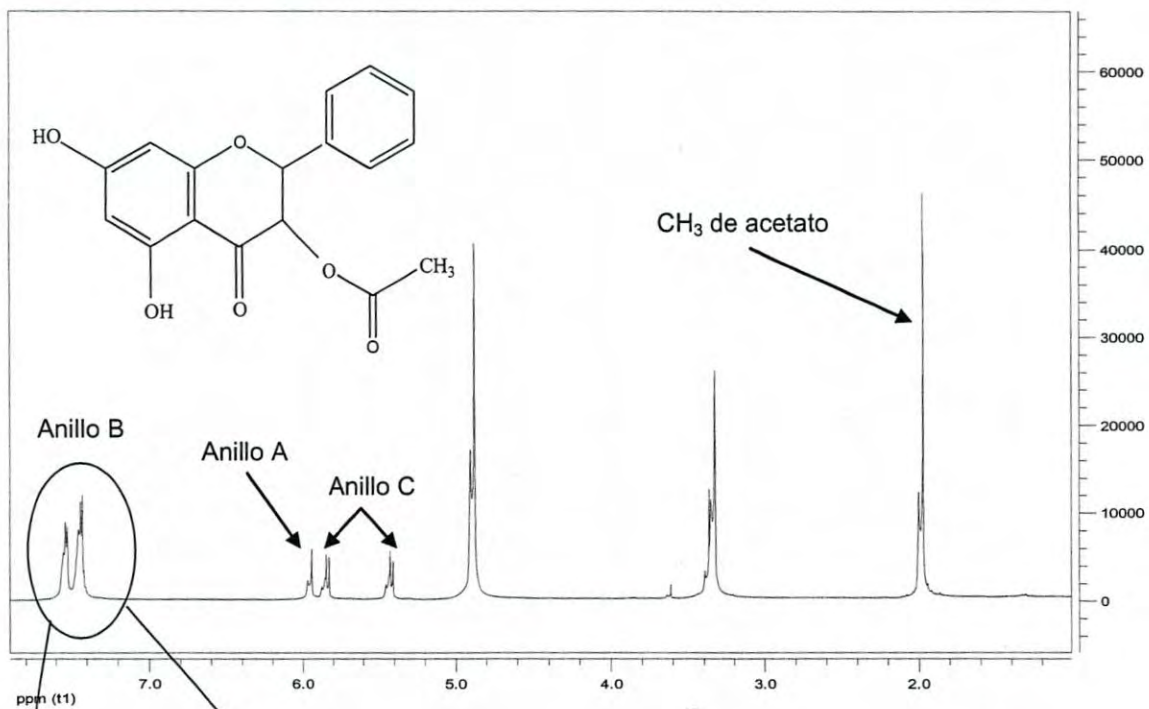
Apéndice XXVIII. Pinobanksina-5-metil éter. A: Espectro bidimensional COSY, B: Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF.



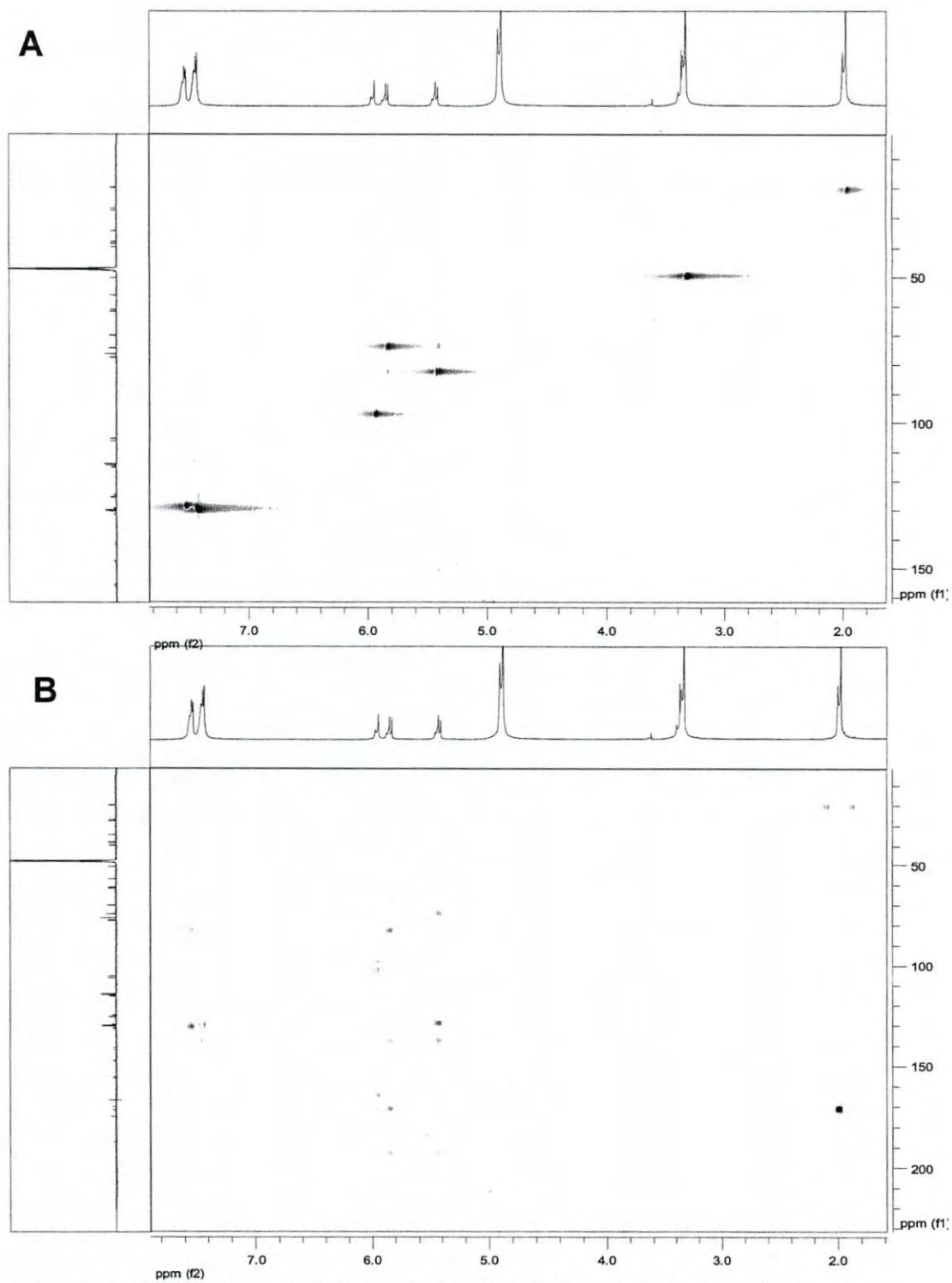
Apéndice XXIX. Patrón de fragmentación propuesto para pinobanksina-5-metil éter por HPLC-MS-Q-TOF.



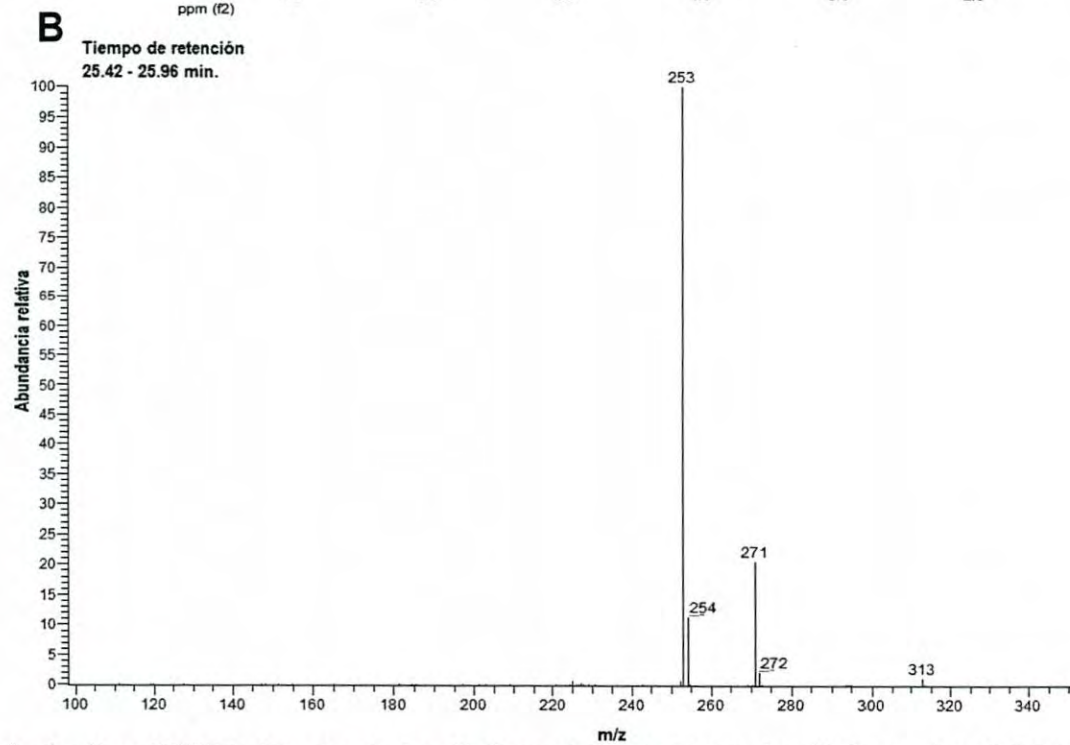
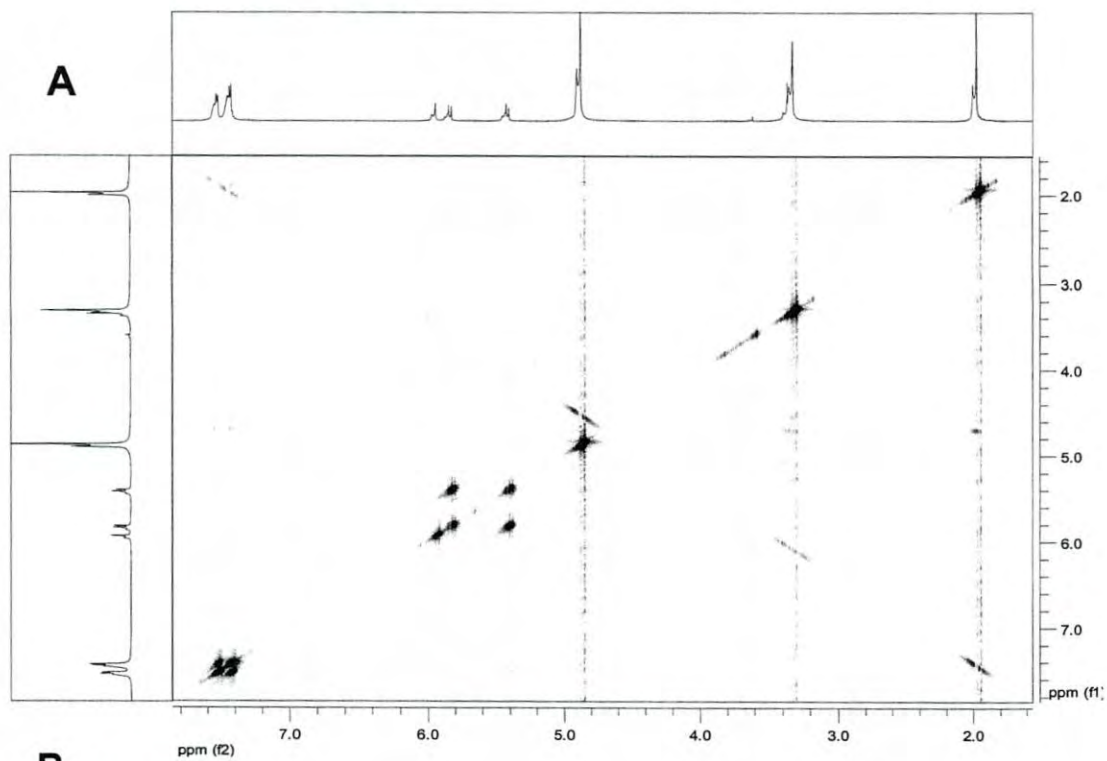
Apéndice XXX. Estructura de pinobanksina-5-metil éter



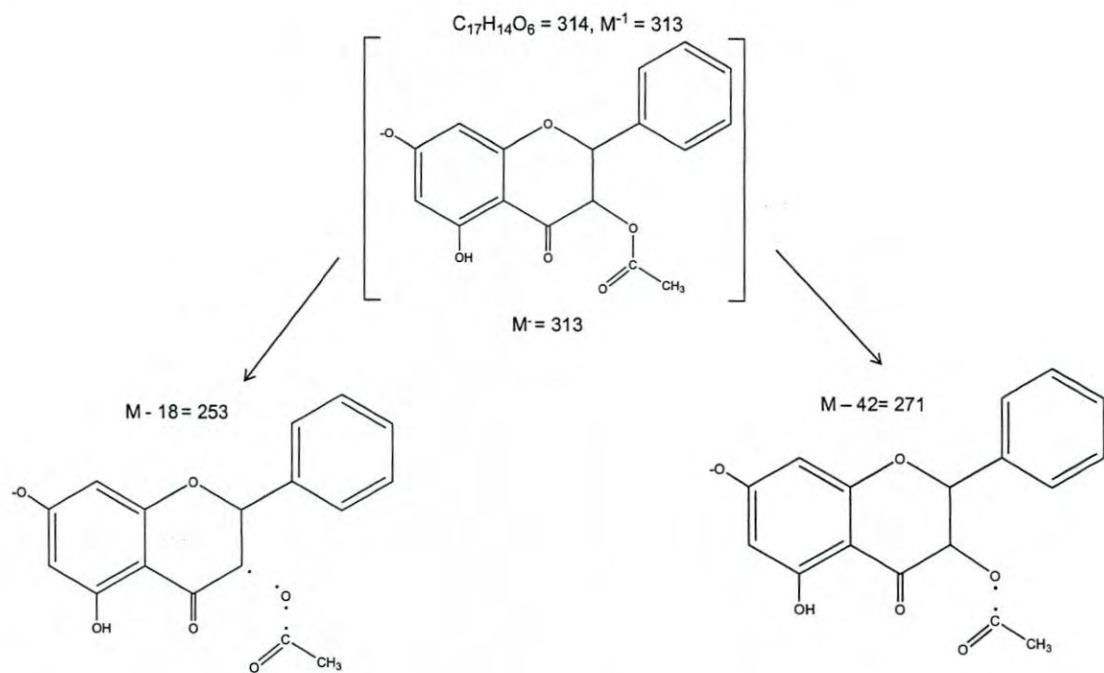
Apéndice XXXI. Caracterización de pinobanksina-3-O-acetato. Espectro Protónico ¹H NMR 600 MHz



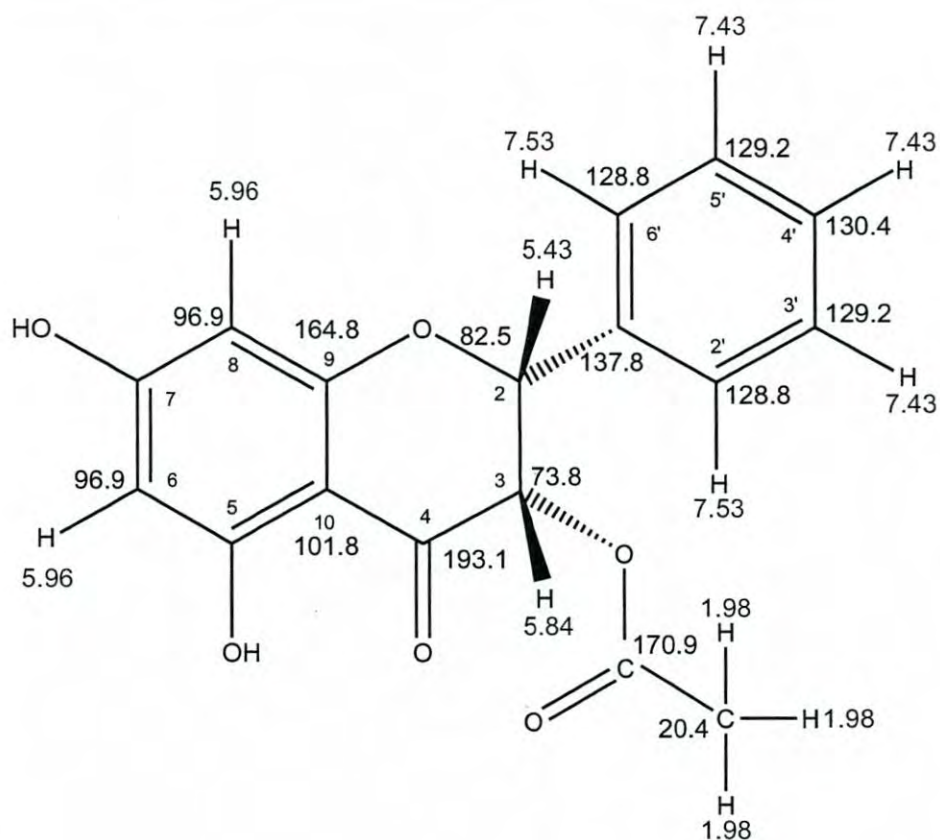
Apéndice XXXII. Caracterización de pinobanksina-3-O-acetato. **A:** Espectro HSQC. **B:** Espectro HMBC.



Apéndice XXXIII. Pinobanksina-3-O-acetato. A: Espectro bidimensional COSY, B: Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF.

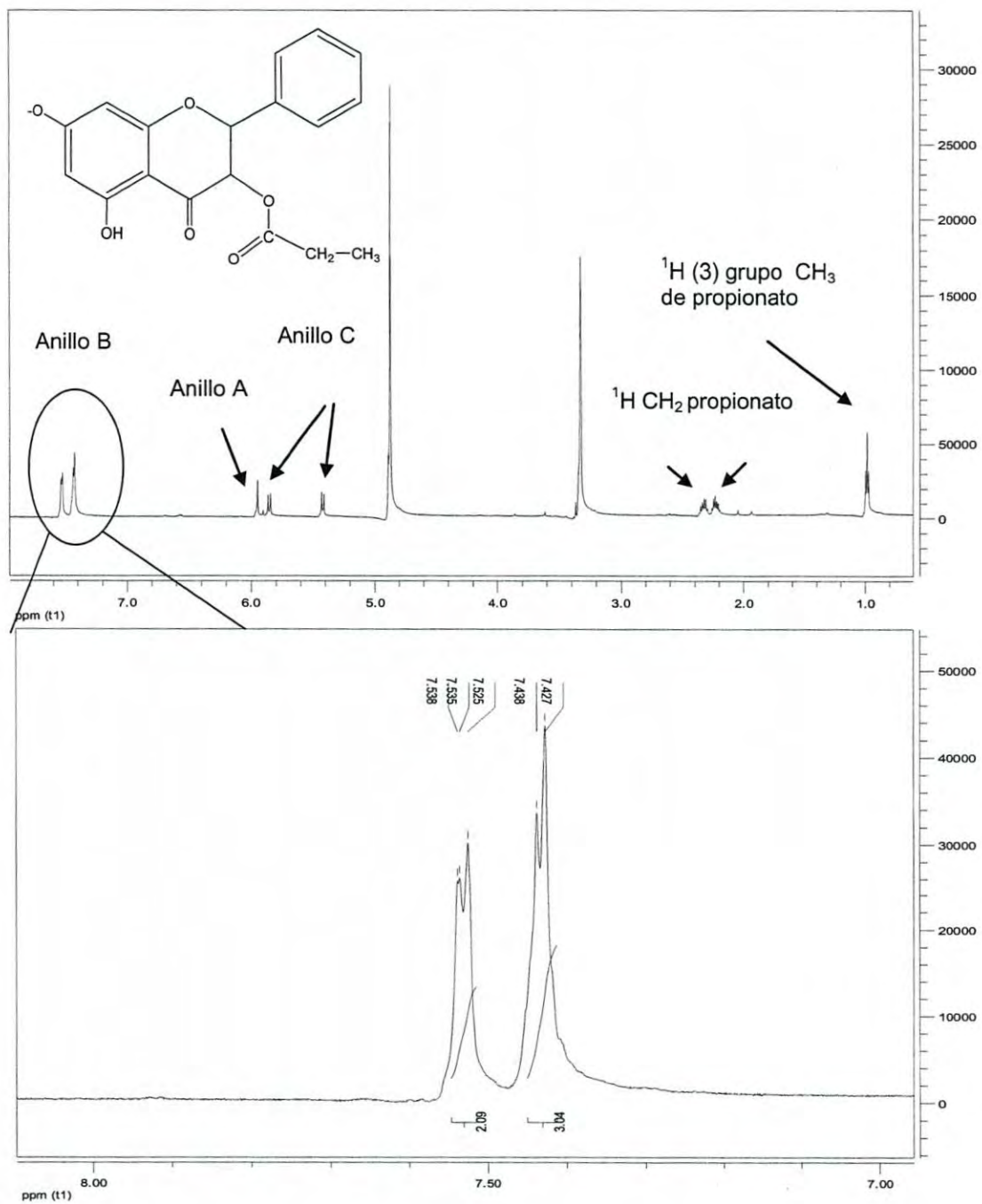


Apéndice XXXIV. Patrón de fragmentación propuesto para pinobanksina-3-O-acetato por HPLC-MS-Q-TOF.

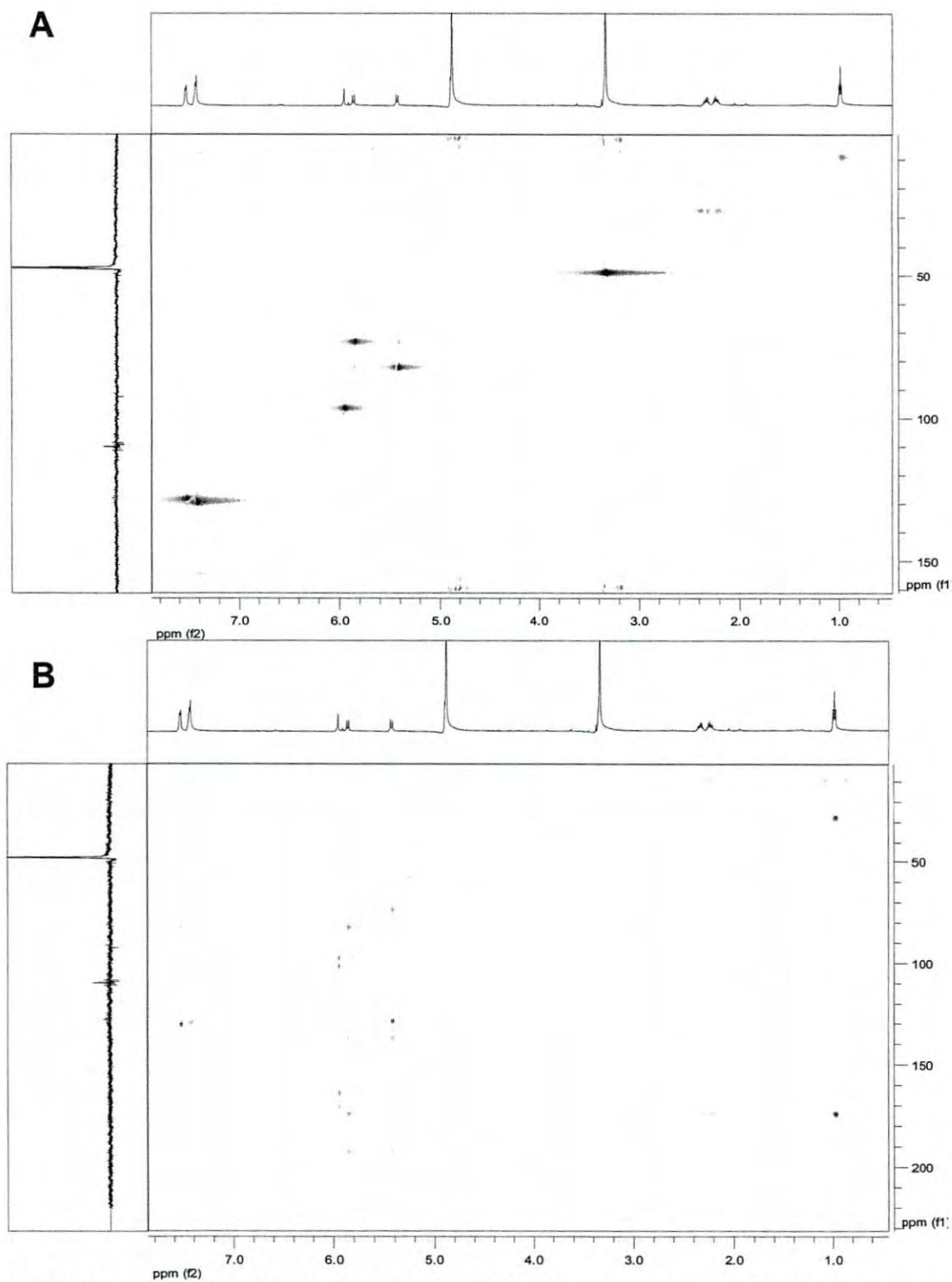


Número de C	δ ^1H	δ ^{13}C	HMBC
CH ₃ acetato	1.98	20.4	170.9
2	5.43	82.5	73.8, 128.8, 137.8, 193.1
3	5.84	73.8	82.5, 137.8, 170.9, 193.1
6	5.96	96.9	96.5, 101.8, 164.8
8	5.96	96.9	96.5, 101.8, 164.8
4'	7.39	130.4	137.8, 129.2
3' 5'	7.43	129.2	137.8, 129.2
2' 6'	7.53	128.8	82.5, 129.2, 13.6

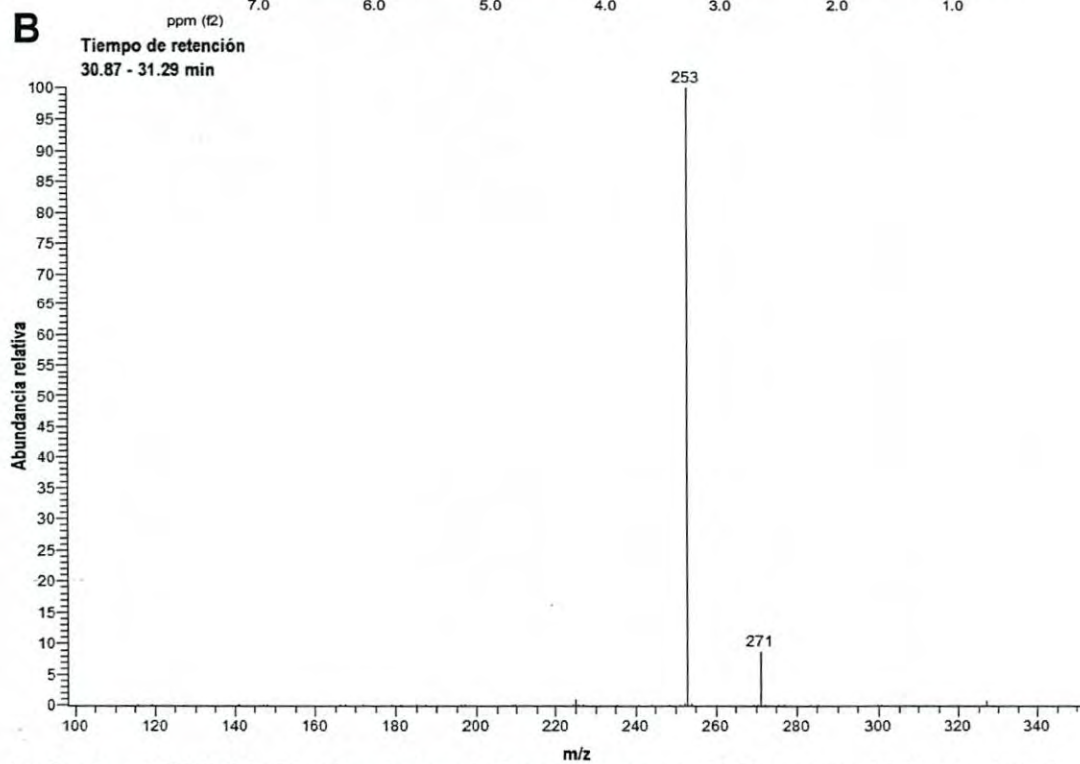
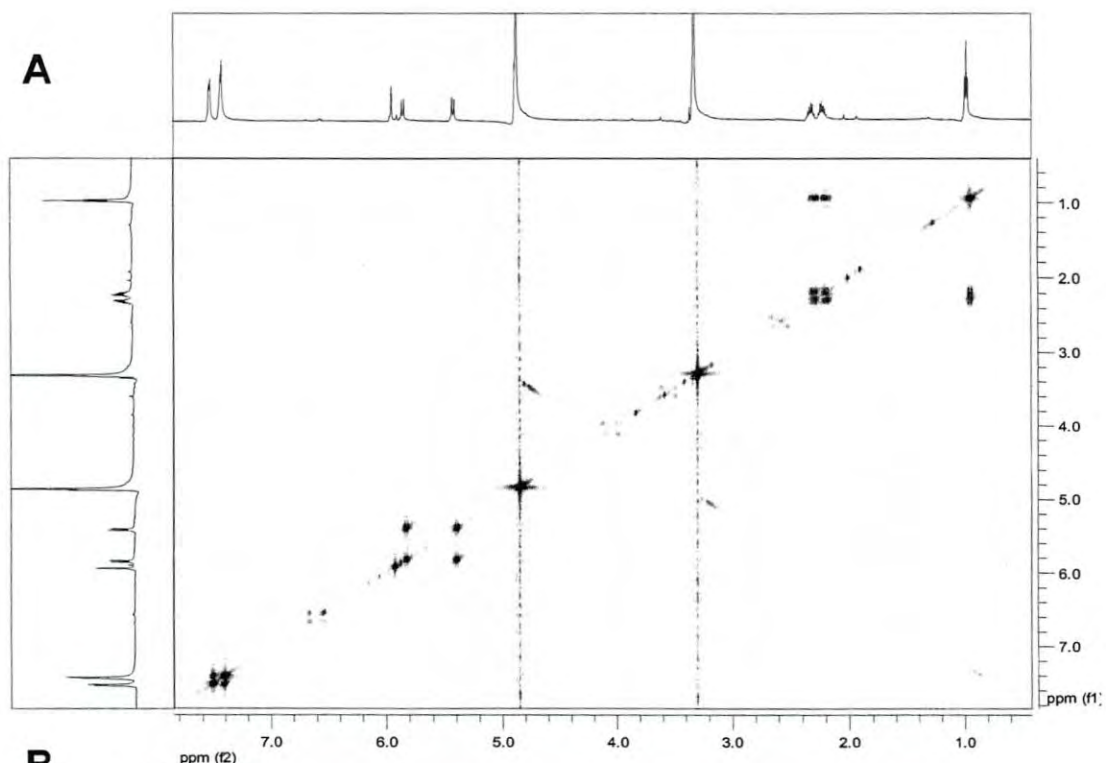
Apéndice XXXV. Estructura de pinobanksina-3-O-acetato



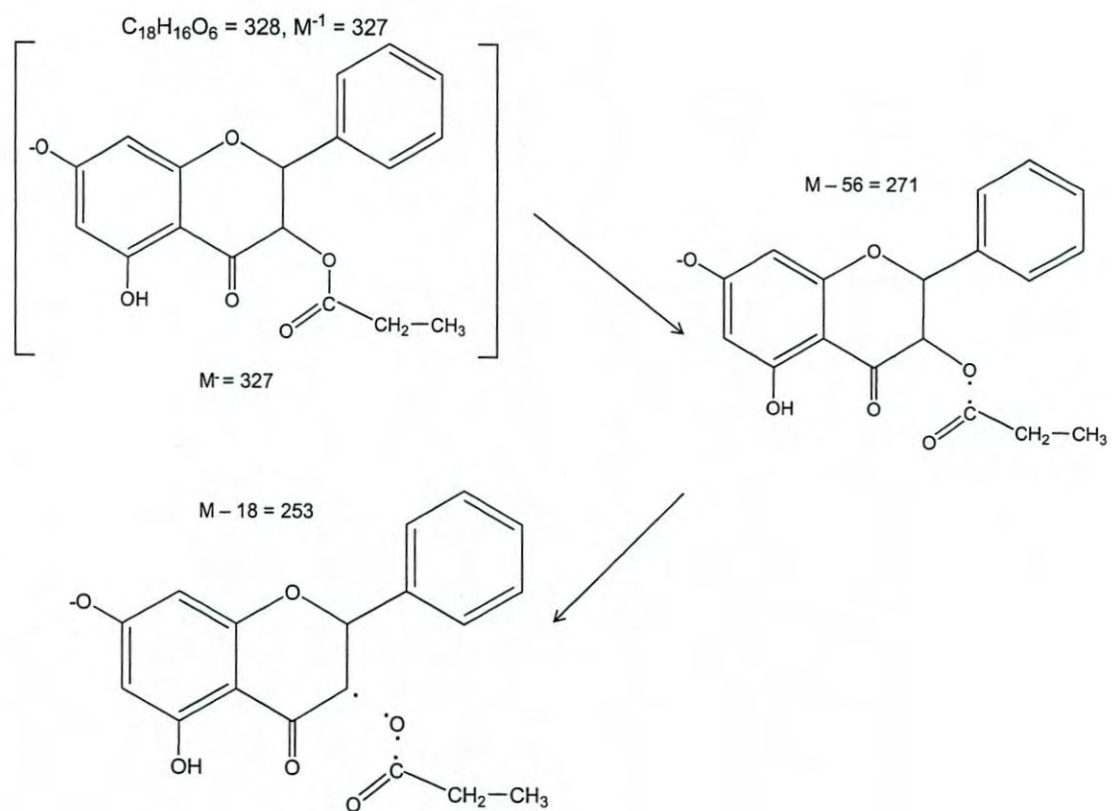
Apéndice XXXVI. Caracterización de pinobanksina-3-O-propanoato. Espectro Protónico ^1H NMR 600 MHz



Apéndice XXXVII. Caracterización de pinobanksina-3-O-propanoato **A:** Espectro HSQC. **B:** Espectro HMBC.



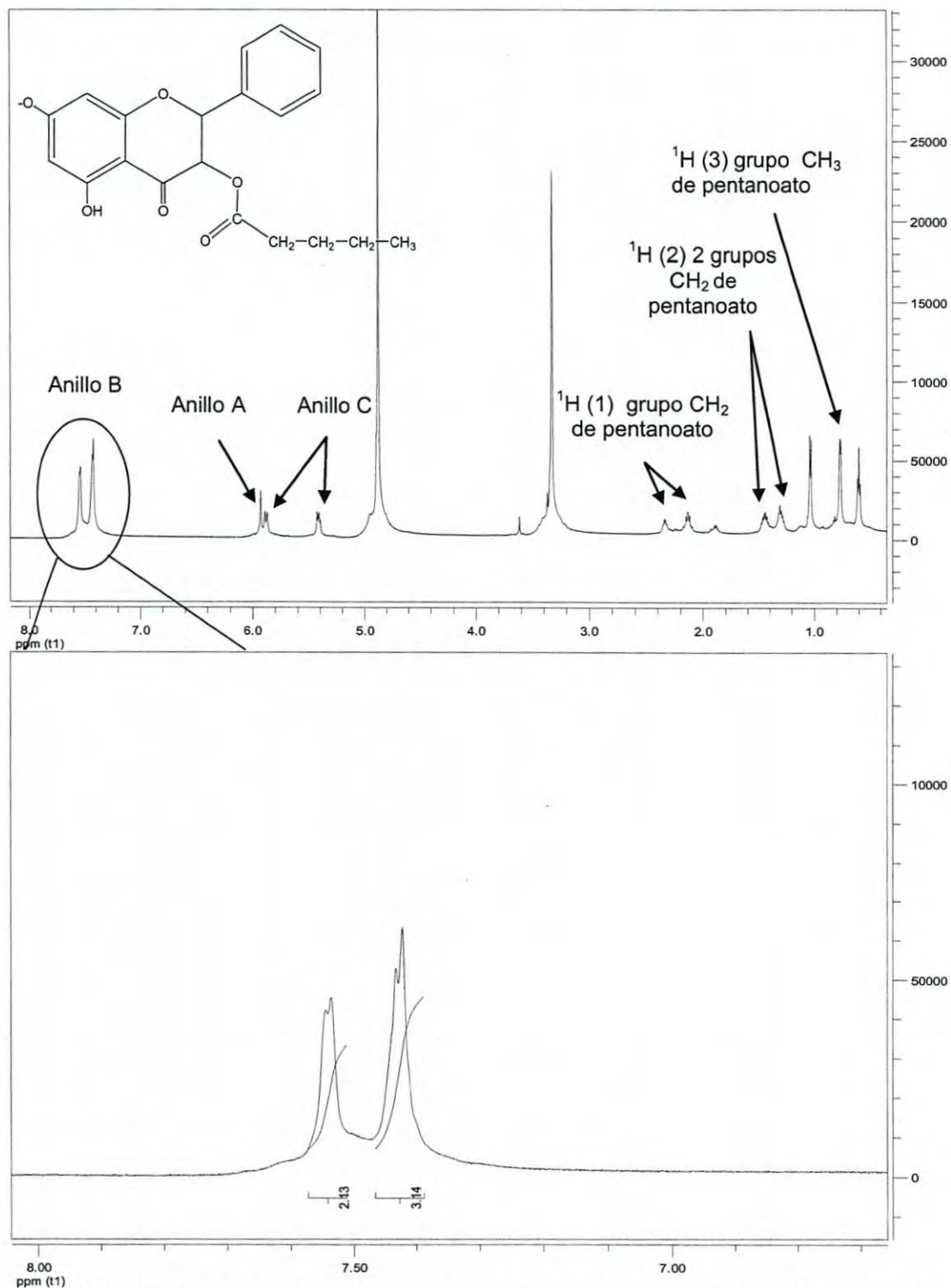
Apéndice XXXVIII. Pinobanksina-3-O-propanoato. **A:** Espectro bidimensional COSY, **B:** Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF.



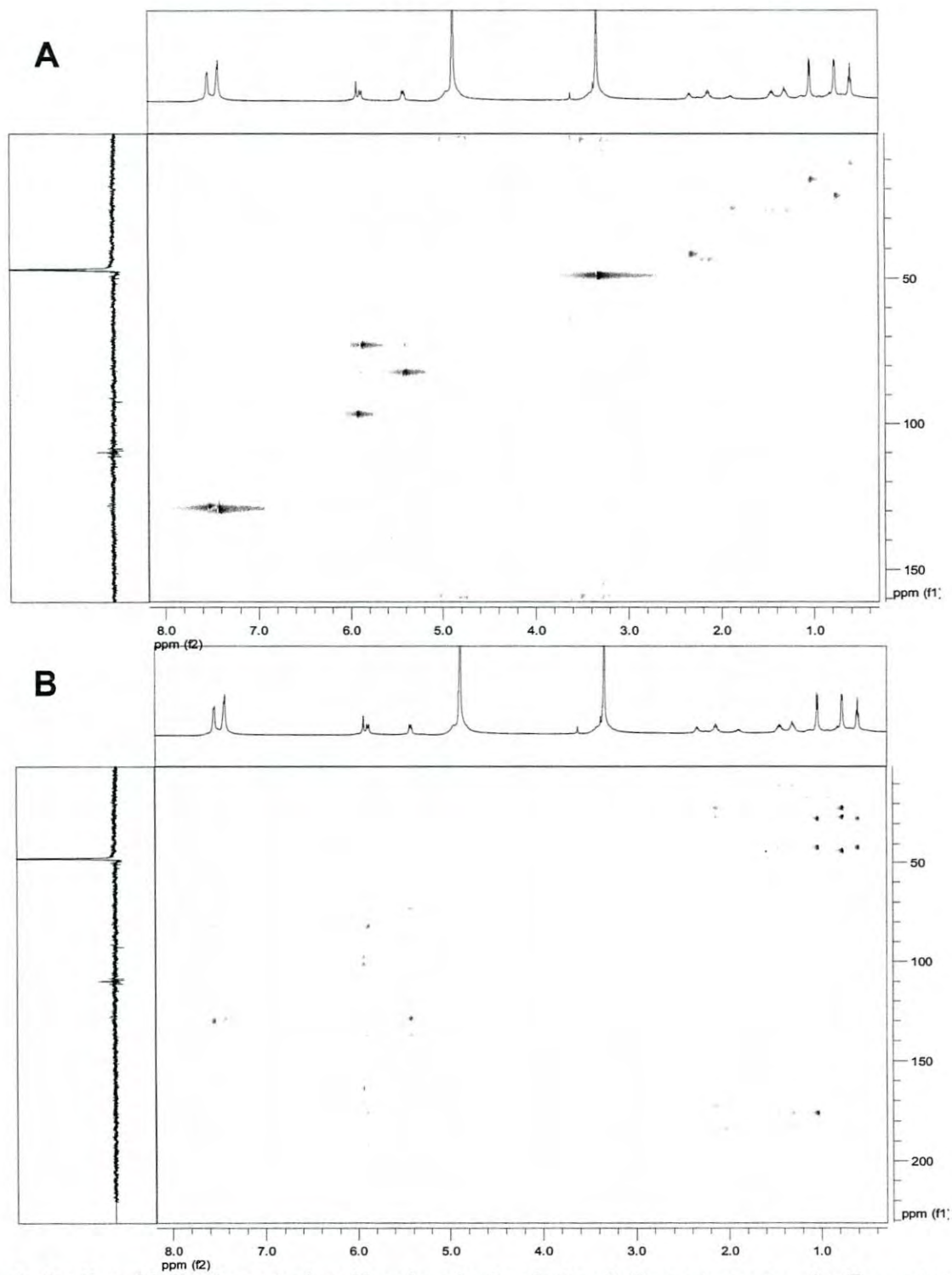
Apéndice XXXIX. Patrón de fragmentación propuesto para pinobanksina-3-O-propanoato por HPLC-MS-Q-TOF.

Número de C	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC
CH ₃ propanoato	0.98	9.0	27.7, 170.4
CH ₂ propanoato	2.24, 2.32	27.7	9.0, 170.4
2	5.43	82.1	73.7, 128.4, 137.1, 193.3
3	5.84	73.4	82.3, 137.1, 170.4, 193.3
6	5.94	96.5	98.0, 101.1, 164.0, 170.4
8	5.94	96.5	98.0, 101.1, 164.0, 170.4
4'	7.43	129.6	129.6, 137.1
3' 5'	7.43	129.6	129.6, 137.1
2' 6'	7.53	128.4	82.3, 129.6

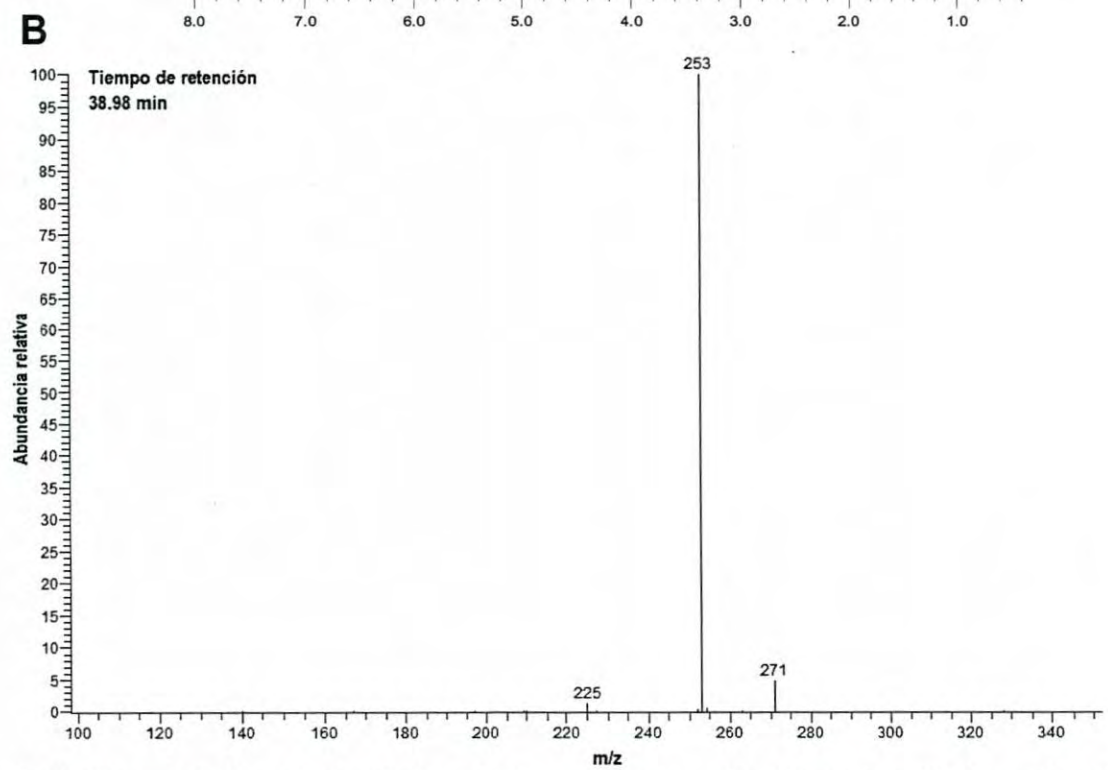
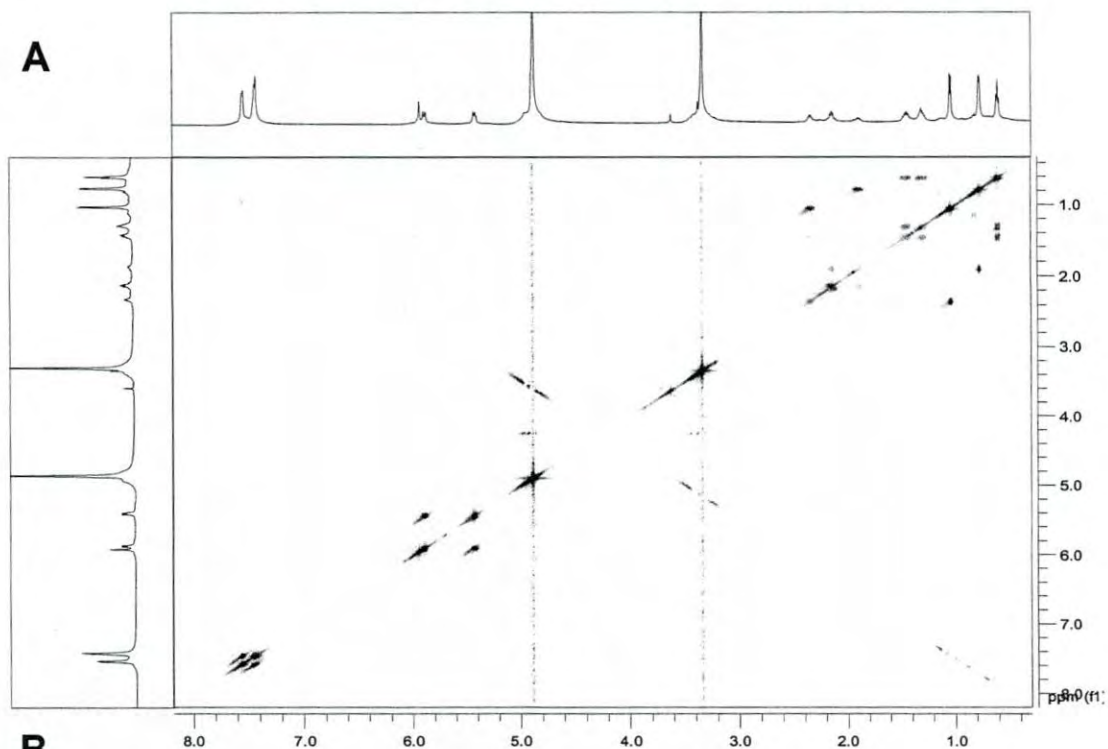
Apéndice XL. Estructura de pinobanksina-3-O-propanoato



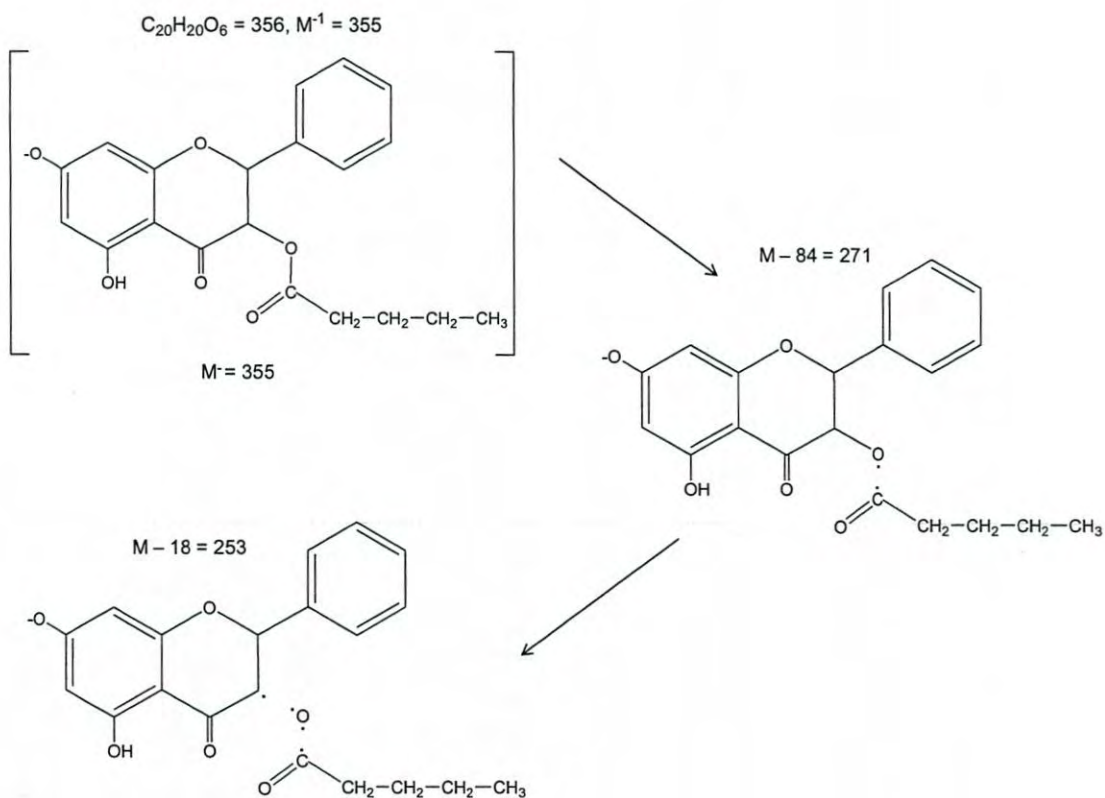
Apéndice XLI. Caracterización de pinobanksina-3-O-pentanoato. Espectro Protónico ^1H NMR 600 MHz



Apéndice XLII. Caracterización de pinobanksina-3-O-pentanoato. A: Espectro HSQC. B: Espectro HMBC.



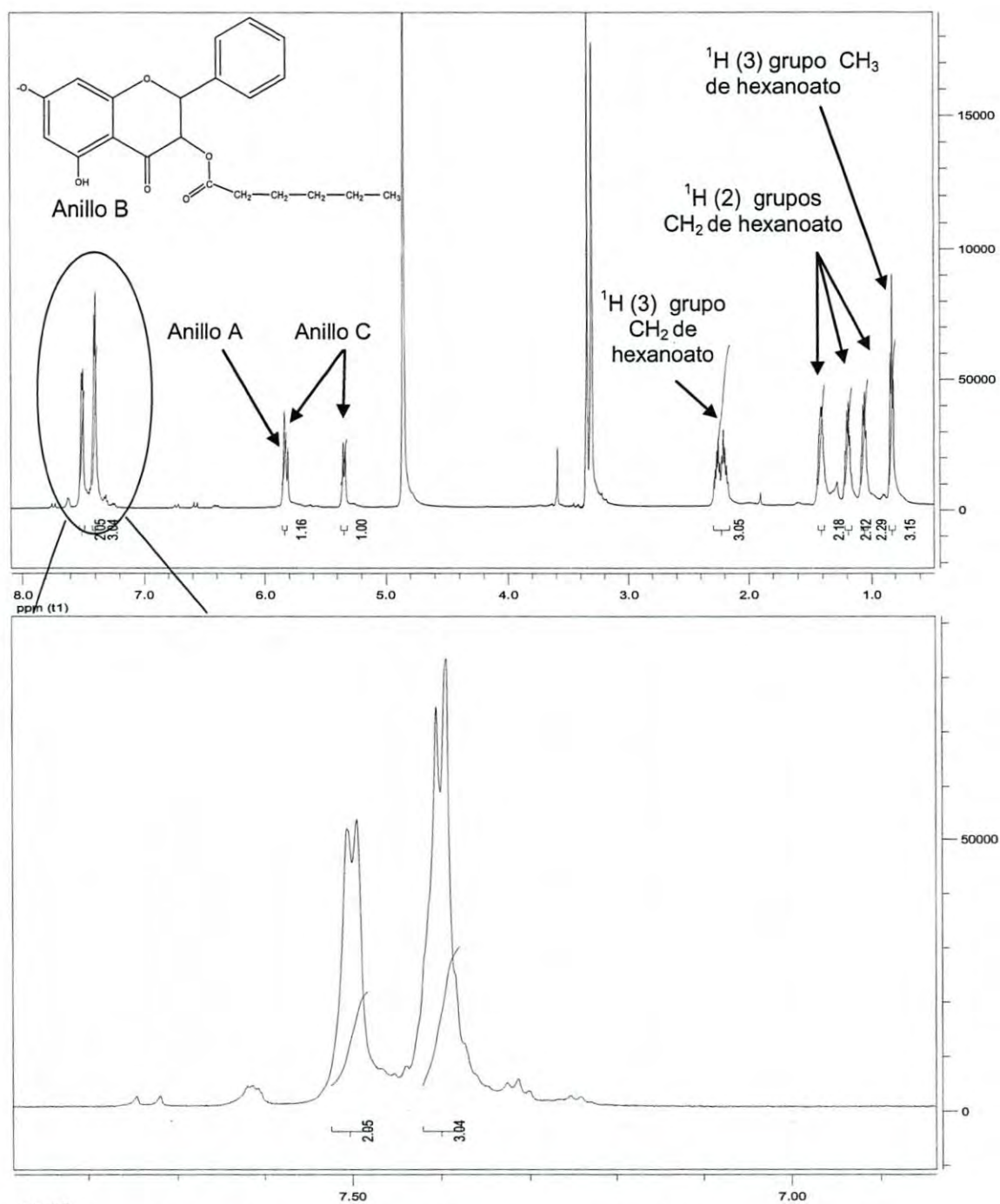
Apéndice XLIII. pinobanksina-3-O-pentanoato. **A:** Espectro bidimensional COSY, **B:** Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF



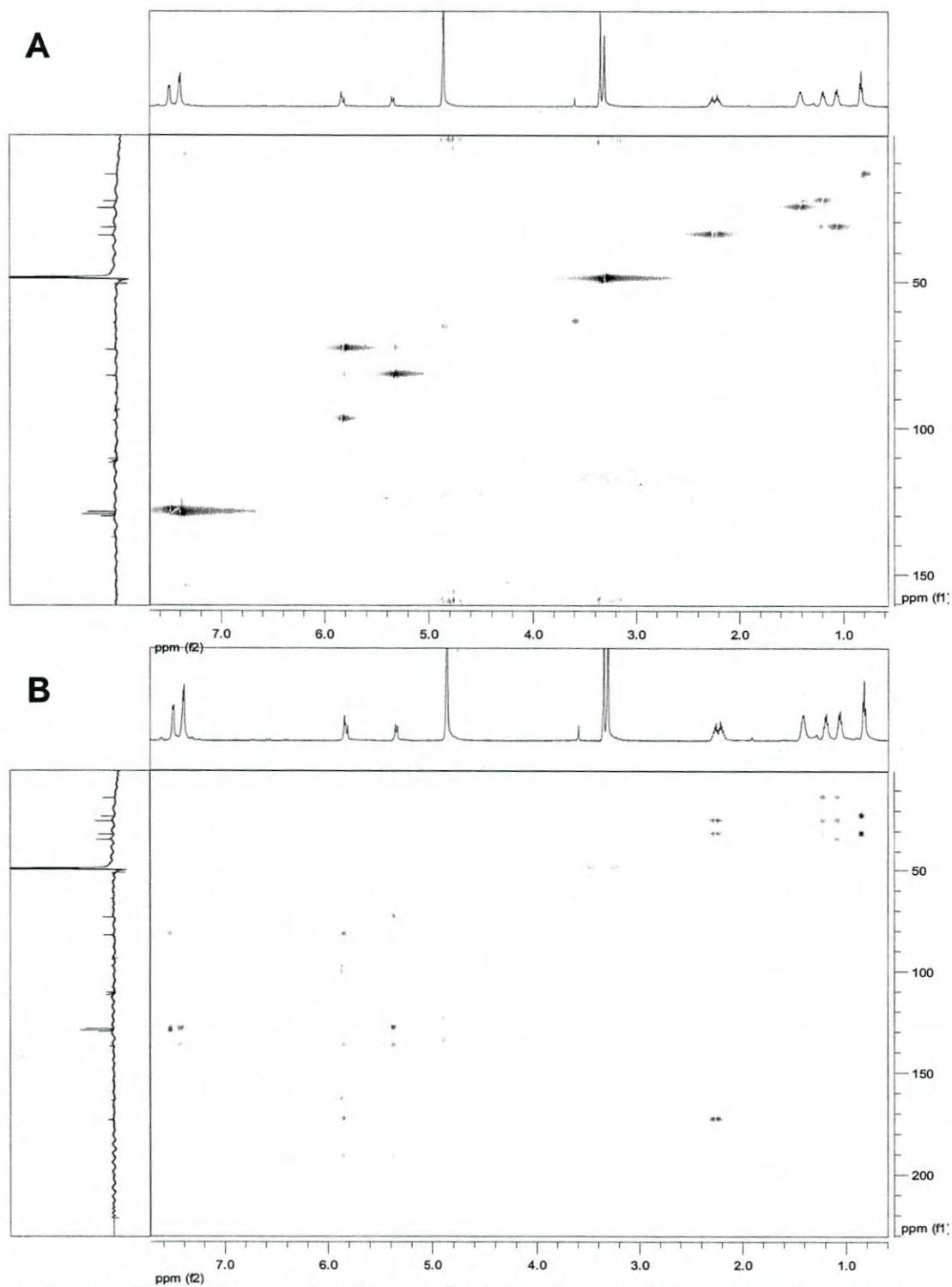
Apéndice XLIV. Patrón de fragmentación propuesto para pinobanksina-3-O-pentanoato por HPLC-MS-Q-TOF.

Número de C	δ ^1H	δ ^{13}C	HMBC
CH ₃ pentanoato	0.77	22.4	27.4, 43.7
CH ₂ pentanoato	1.30, 1.46	27.4	41.9
CH ₂ pentanoato	2.14	43.7	22.4, 27.4, 172.5
CH ₂ pentanoato	2.35	41.9	27.4
2	5.42	82.0	73.0, 128.7, 137.3, 192.6
3	5.89	73.0	82.0, 137.3, 172.3, 192.6
6	5.93	96.8	96.8, 101.8, 164.2
8	5.93	96.8	96.8, 101.8, 164.2
4'	7.43	129.6	128.7, 137.3
3' 5'	7.43	129.6	128.7, 137.3
2' 6'	7.54	128.7	82.0, 129.6

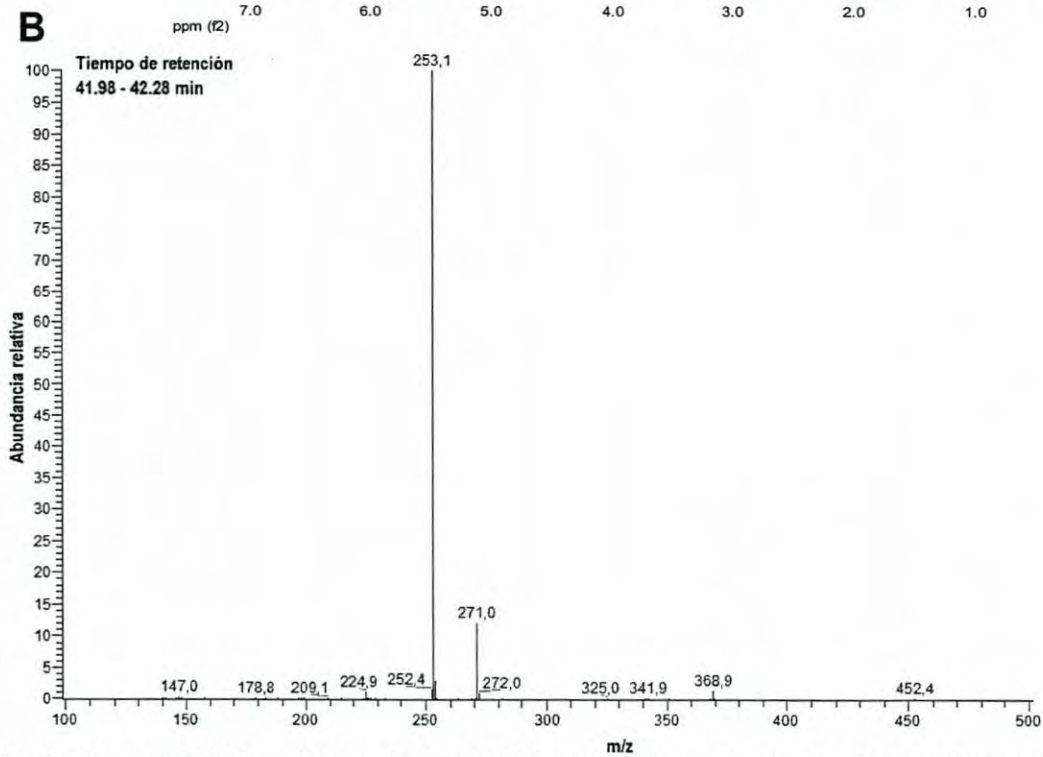
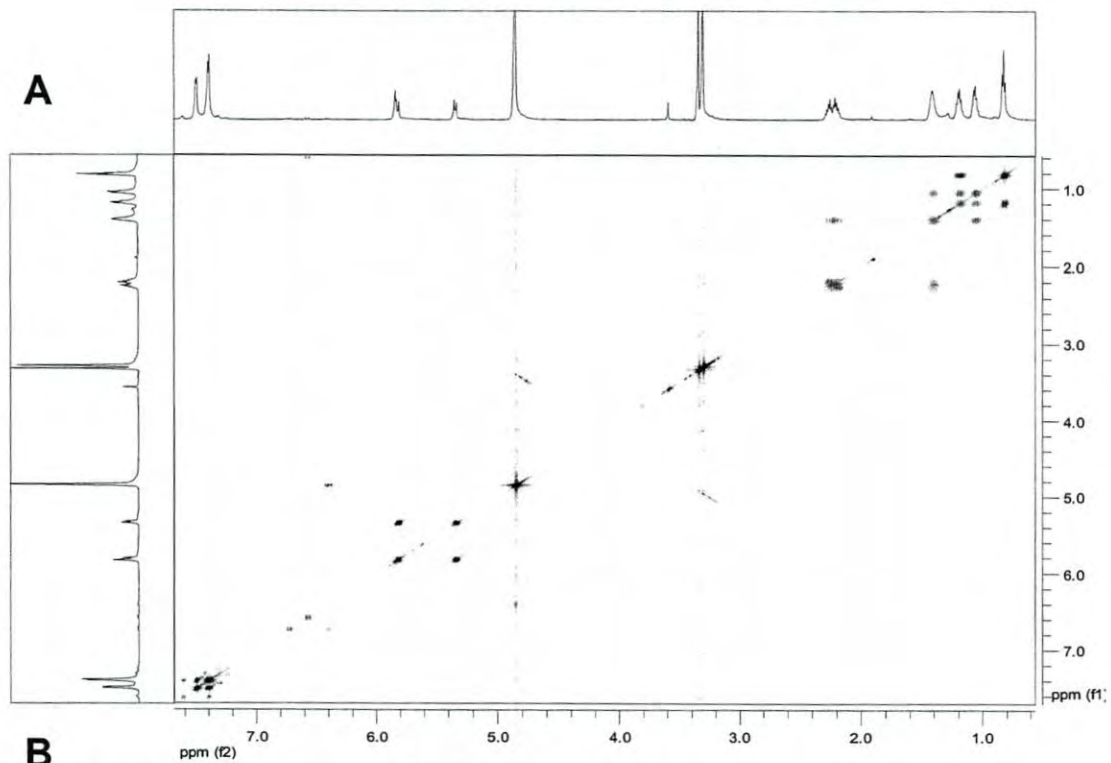
Apéndice XLV. Estructura de pinobanksina-3-O-pentanoato



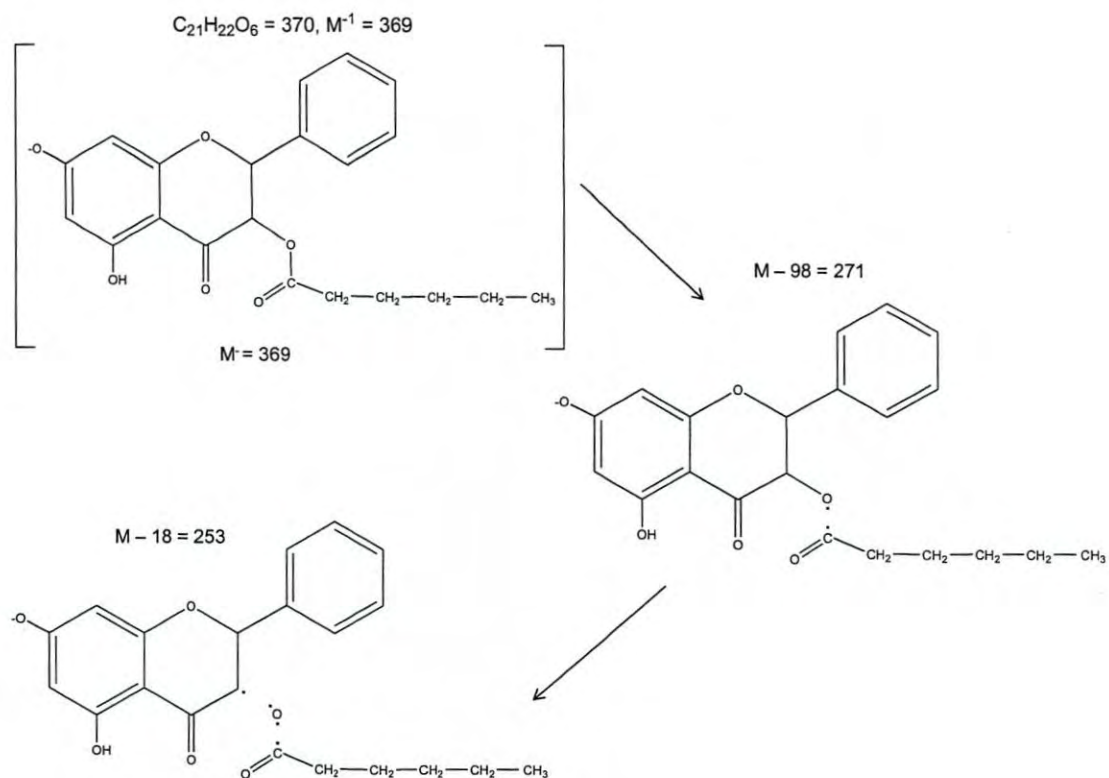
Apéndice XLVI. Caracterización de pinobanksina-3-O-hexanoato. Espectro Protónico ^1H NMR 600 MHz



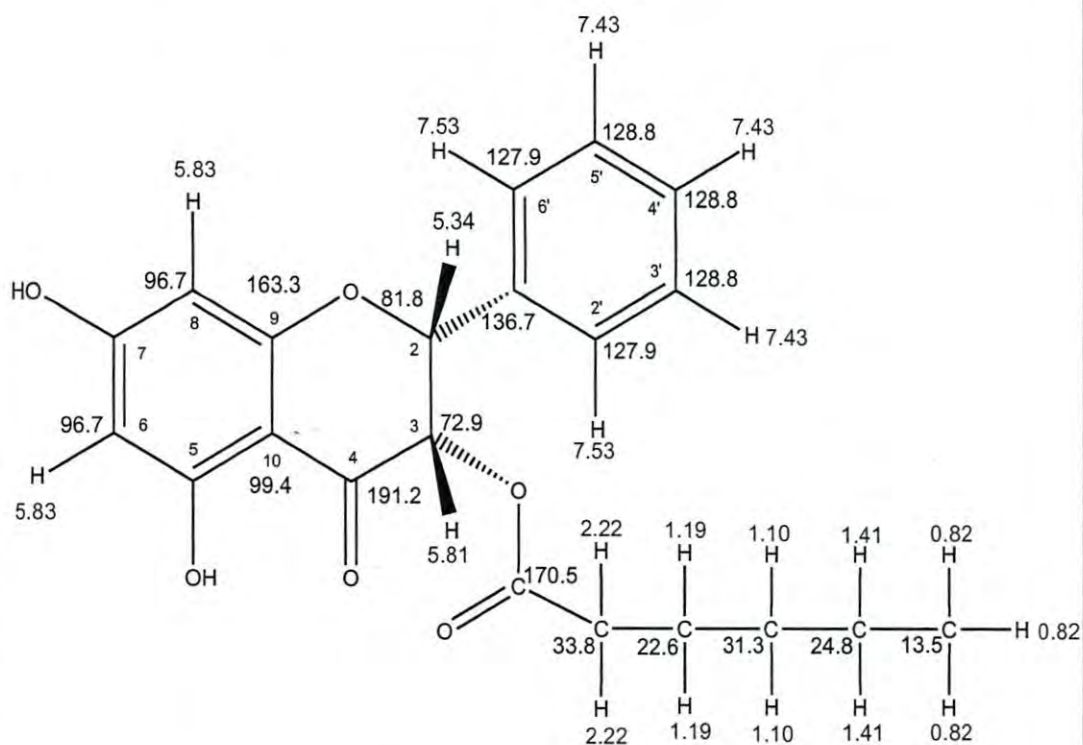
Apéndice XLVII. Caracterización de pinobanksina-3-O-hexanoato. A: Espectro HSQC. B: Espectro HMBC.



Apéndice XLVIII. pinobanksina-3-O-hexanoato. **A:** Espectro bidimensional COSY, **B:** Patrón de fragmentación por HPLC-MS-Q-TOF

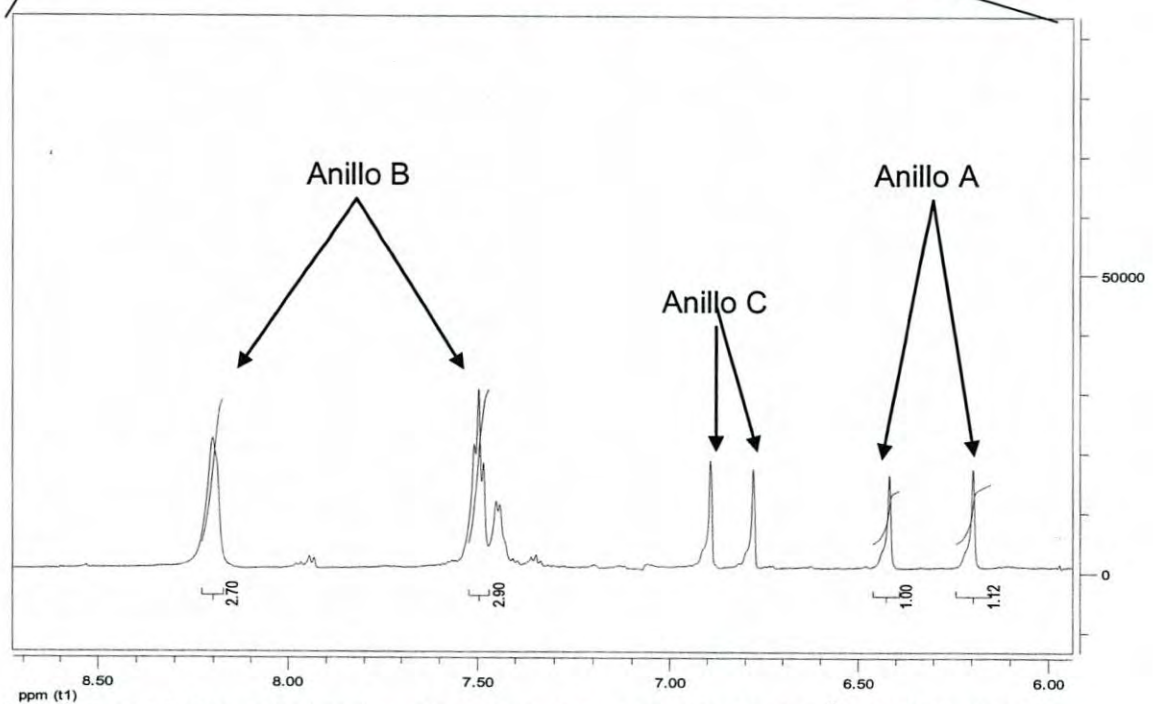
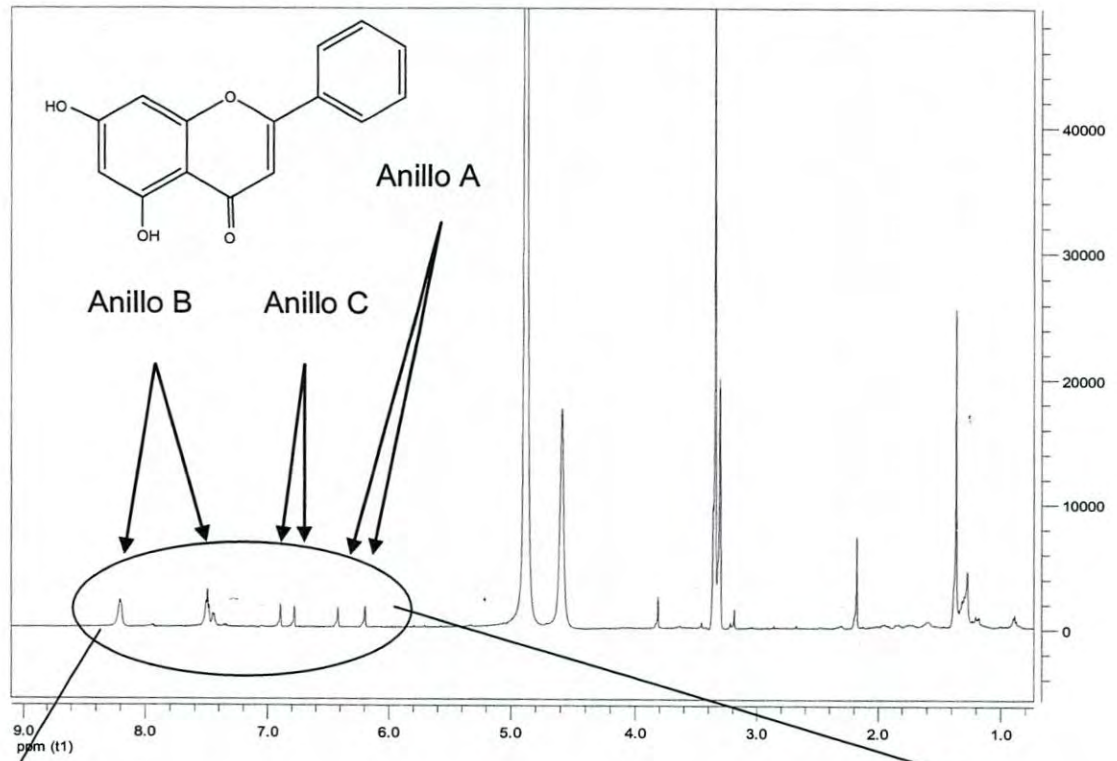


Apéndice XLIX. Patrón de fragmentación propuesto para pinobanksina-3-O-hexanoato por HPLC-MS-Q-TOF.

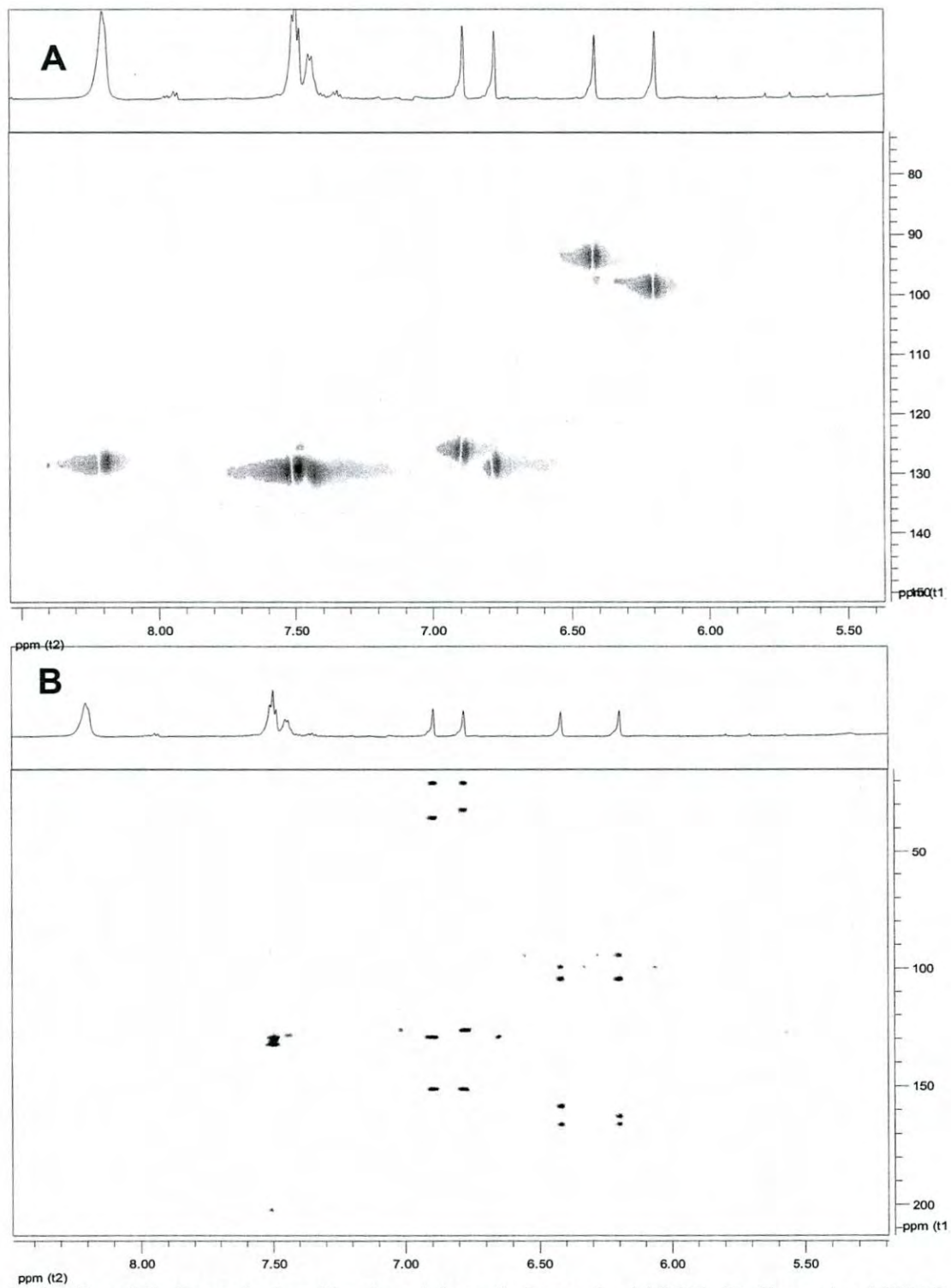


Número de C	δ ¹ H	δ ¹³ C	HMBC
CH ₃ hexanoato	0.82	13.5	22.6, 31.3
CH ₂ hexanoato	1.41	24.8	13.5, 22.6, 31.3
CH ₂ hexanoato	1.06	31.3	13.3, 24.8, 33.8
CH ₂ hexanoato	1.19	22.6	24.8, 31.3, 172.8
CH ₂ hexanoato	2.22	33.8	31.3
2	5.34	81.8	72.9, 127.9, 136.7, 191.2
3	5.81	72.9	81.8, 136.7, 172.8, 191.2
6	5.83	96.7	96.7, 99.4, 164.3
8	5.83	96.7	96.7, 99.4, 164.3
4'	7.43	128.8	127.9, 136.7
3' 5'	7.43	128.8	127.9, 136.7
2' 6'	7.54	127.9	81.8, 128.8

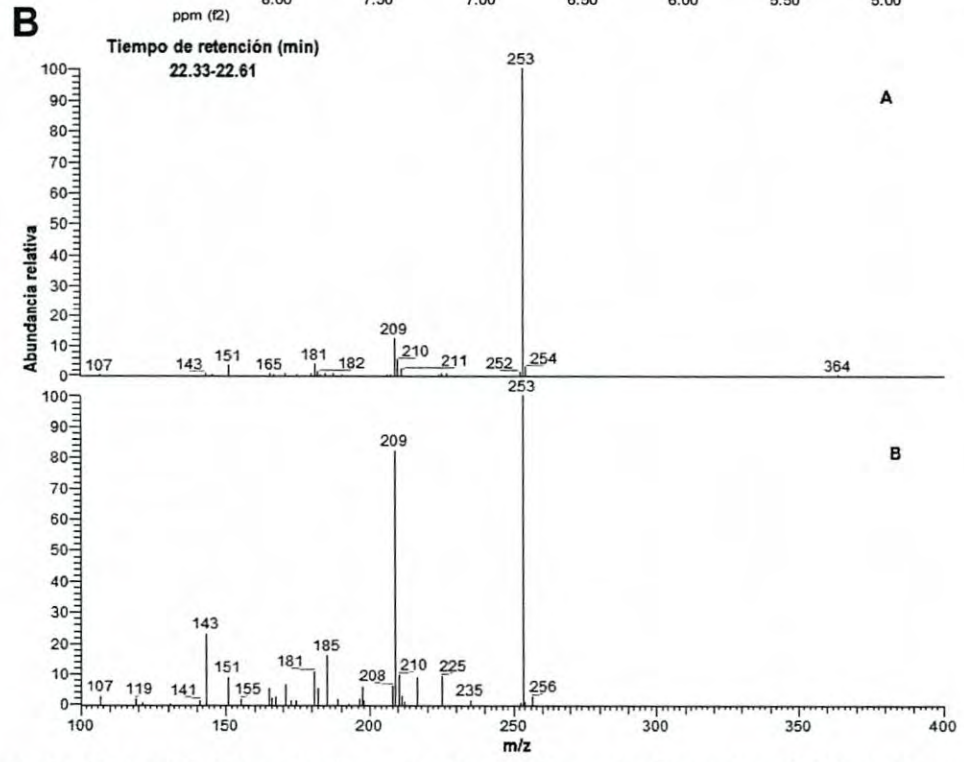
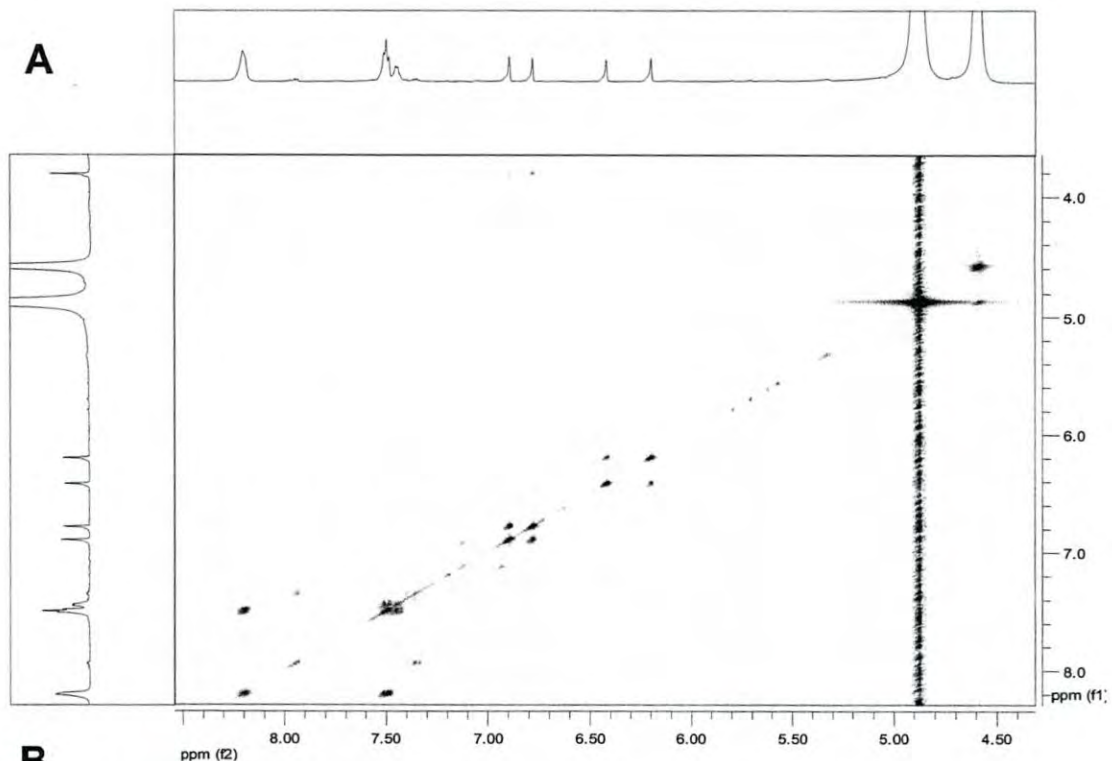
Apéndice L. Estructura de pinobanksina-3-O-hexanoato



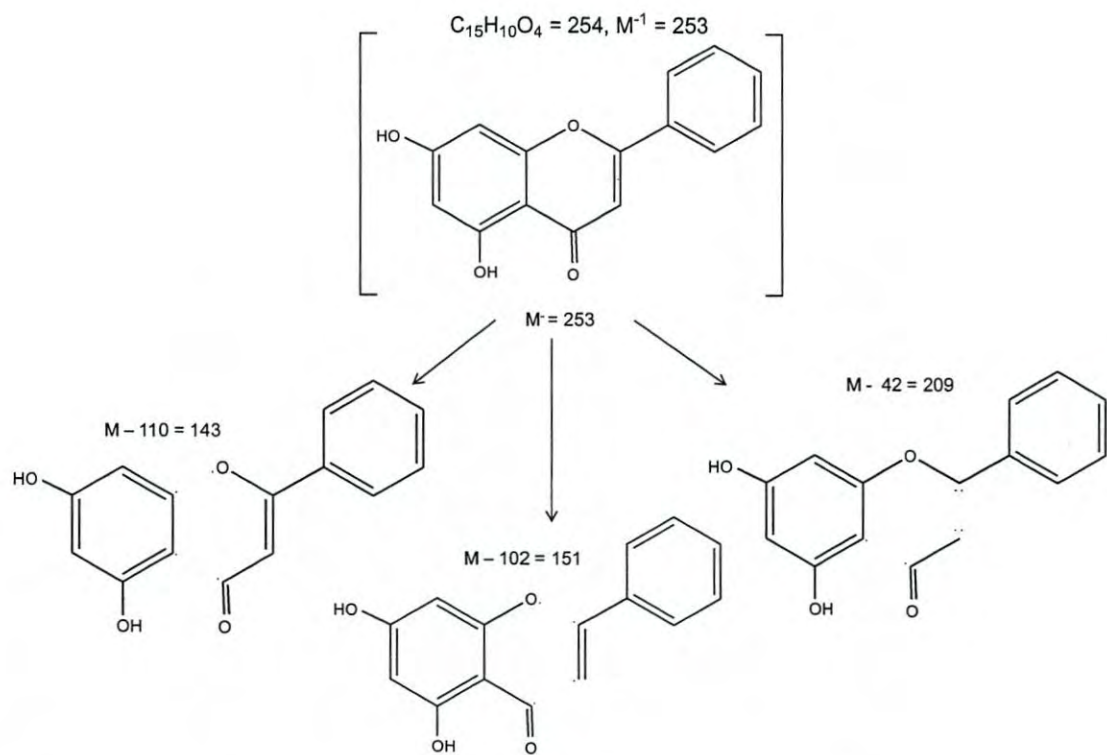
Apéndice LI. Caracterización de crisin. Espectro Protónico ¹H NMR 600 MHz



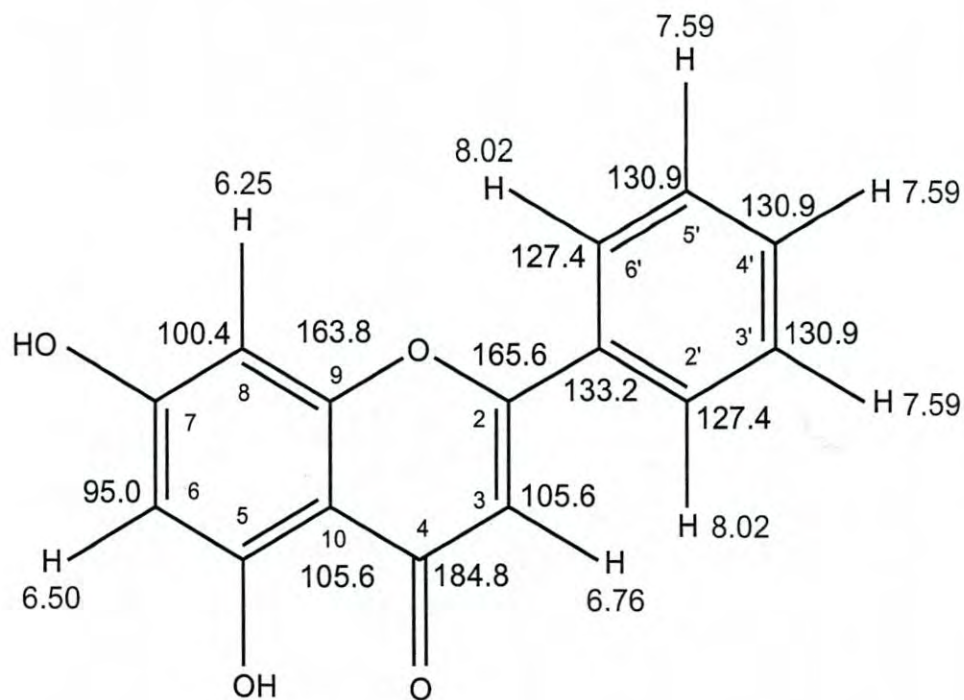
Apéndice LII. Caracterización de crisina. A: Espectro HSQC. B: Espectro HMBC



Apéndice LIII. Caracterización de Crisina. **A:** Espectro COSY. **B:** Espectro de masas obtenido en HPLC-MS-Q-TOF.

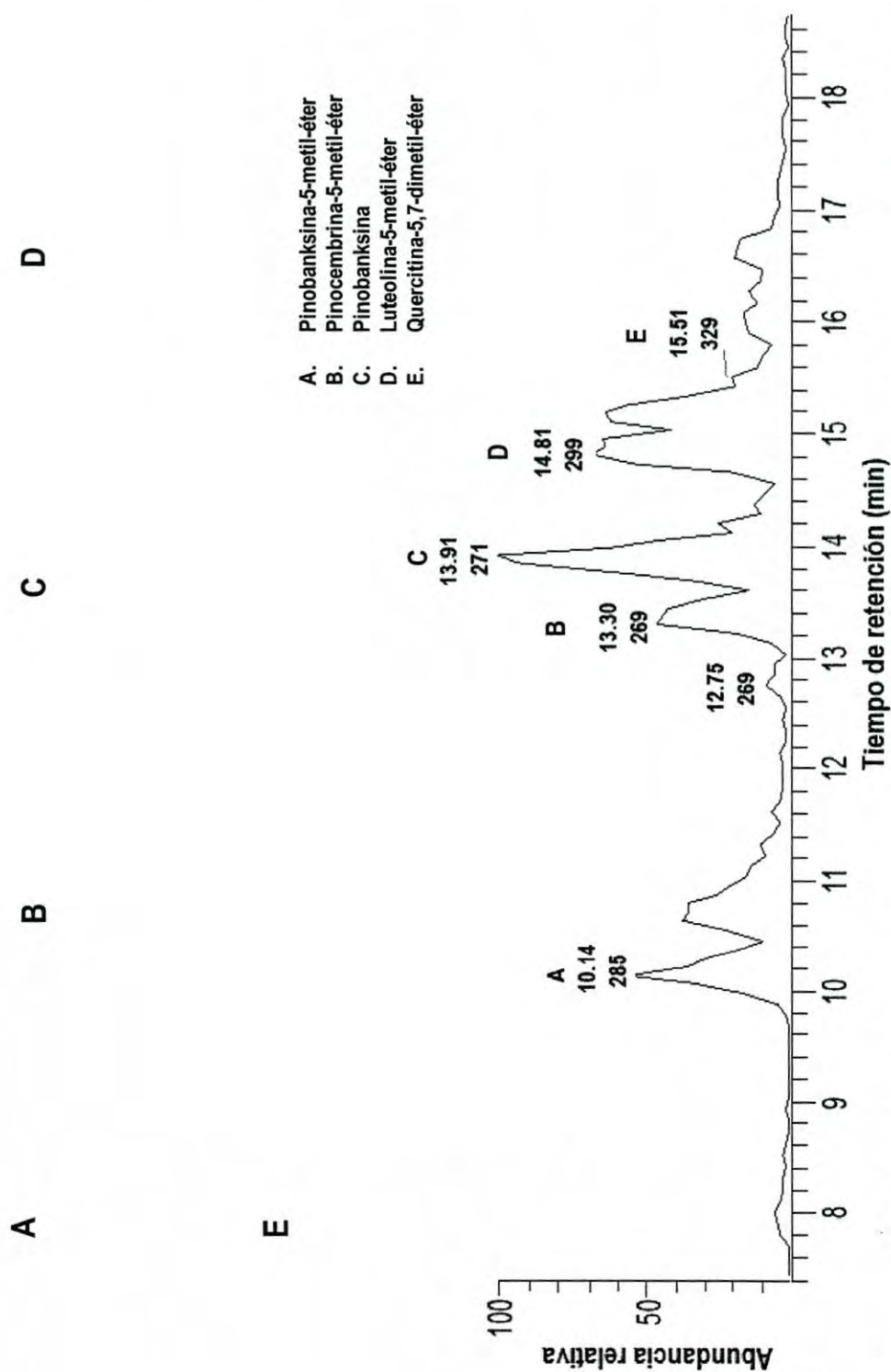


Apéndice LIV. Patrón de fragmentación propuesto para crisina por HPLC-MS-Q-TOF.



Número de C	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC
3	6.76	105.6	133.2, 165.6, 184.8
6	6.50	95.0	100.4, 105.6, 163.8,
8	6.25	100.4	95.0, 105.6, 163.8
4'	7.59	130.9	127.4, 130.9
3' 5'	7.59	130.9	127.4, 130.9
2' 6'	8.02	127.4	127.4, 133.2, 165.9

Apéndice LV. Estructura de crisina



Anexo LVI. Perfil químico de propóleos de Ures, Sonora, donde se ilustran individualmente los constituyentes químicos. Cromatograma obtenido con el método acortado en gradiente, tiempo de corrida final de 44 min.

D

C

B

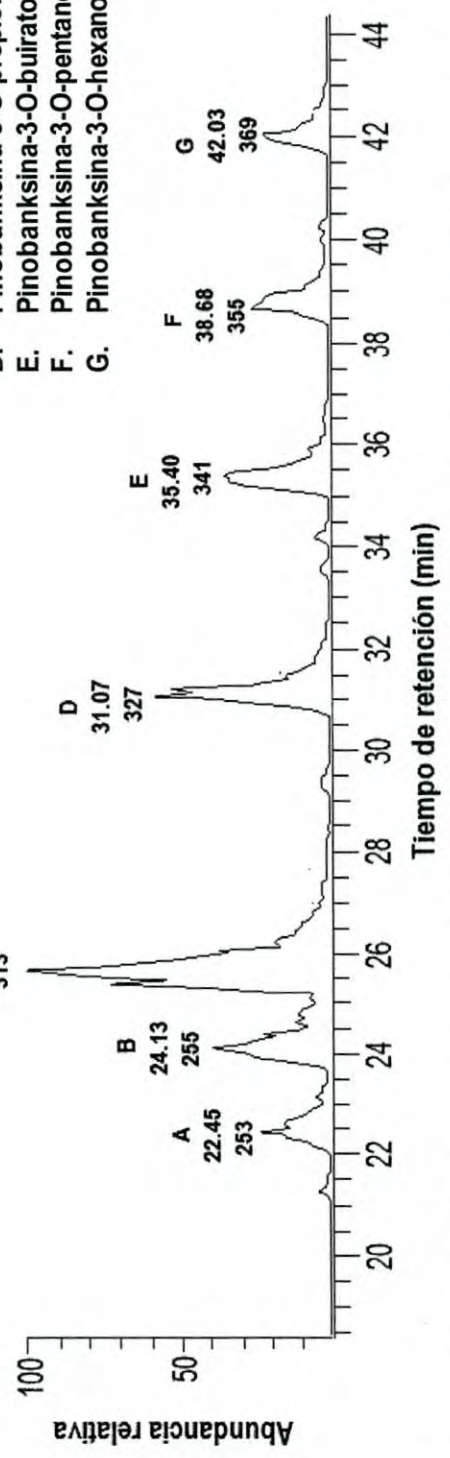
A

G

F

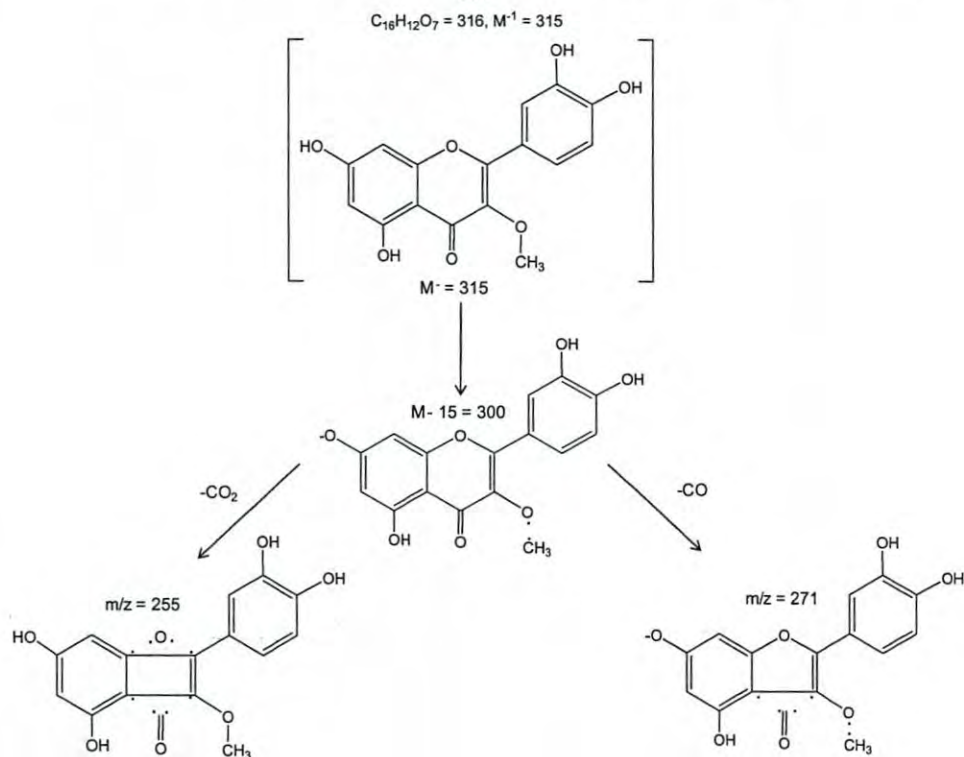
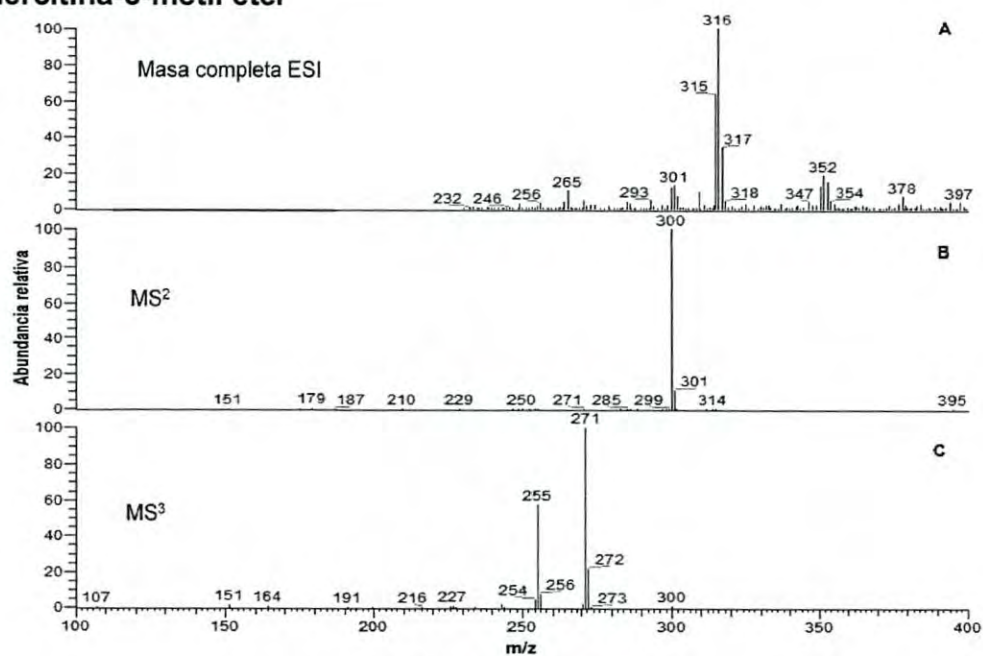
E

- A. Crisina
- B. Pinoembrina
- C. Pinobanksina-3-O-acetato
- D. Pinobanksina-3-O-propionato
- E. Pinobanksina-3-O-buirato
- F. Pinobanksina-3-O-pentanoato
- G. Pinobanksina-3-O-hexanoato



Anexo LVII. Perfil químico de propóleos de Ures, Sonora, donde se ilustran individualmente los constituyentes químicos. Cromatograma obtenido con el método acortado en gradiente, tiempo de corrida final de 44 min

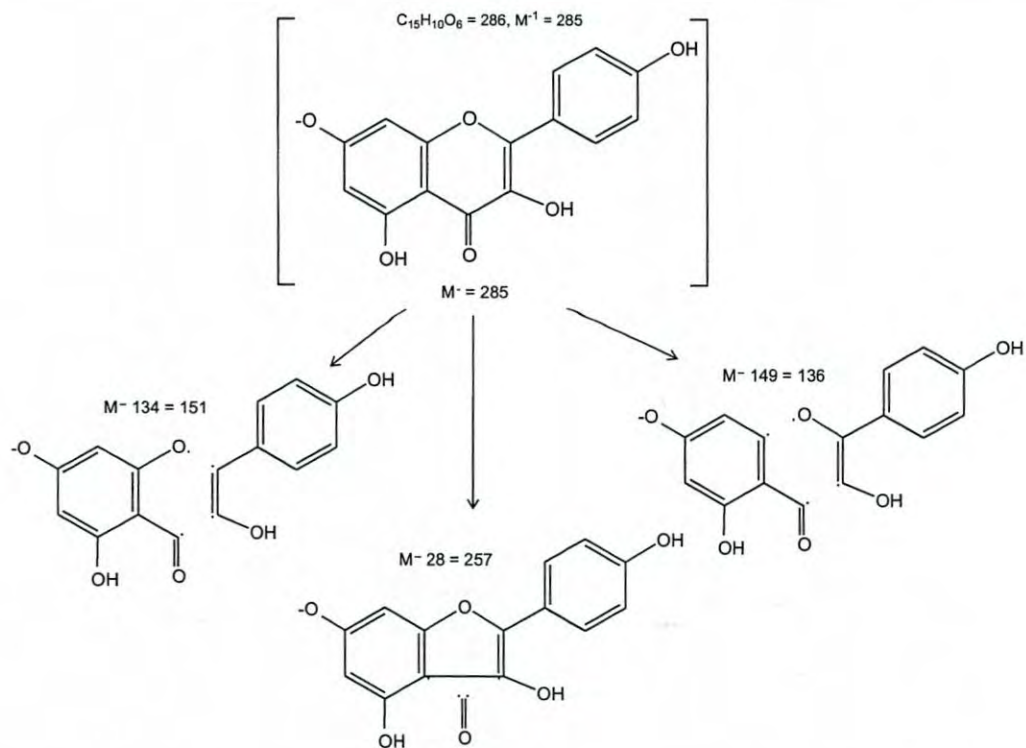
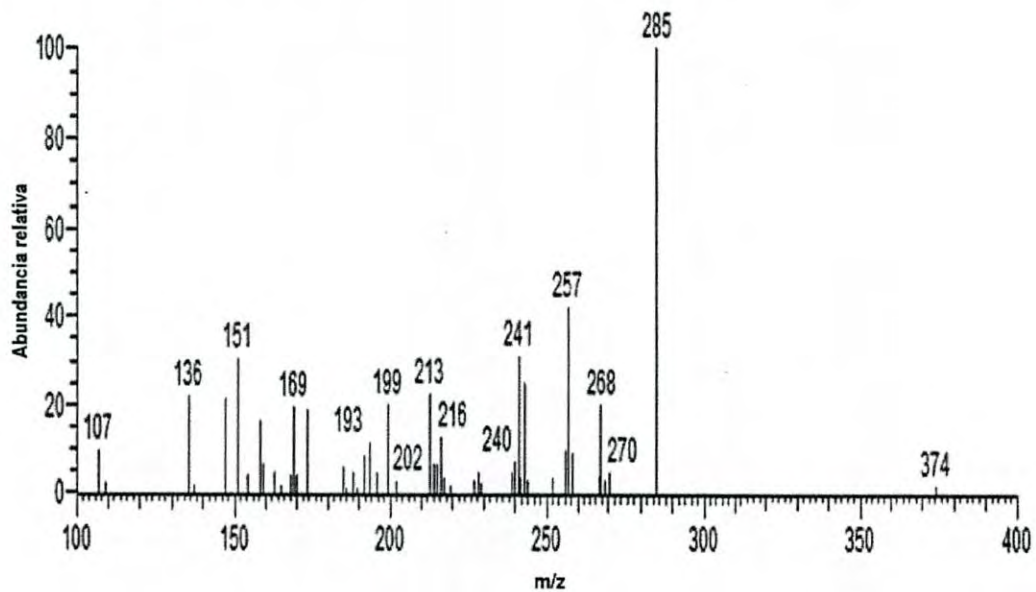
Quercitina-3-metil éter



Apéndice LVIII. Caracterización química de quercitina-3-metil éter por HPLC-MS-Q-TOF.

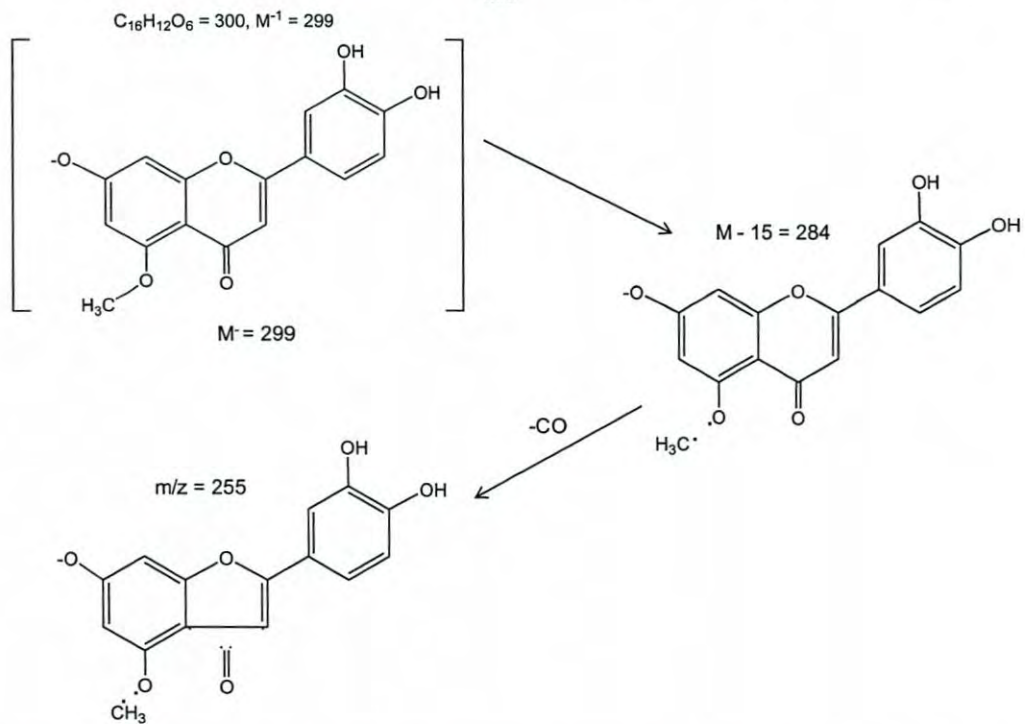
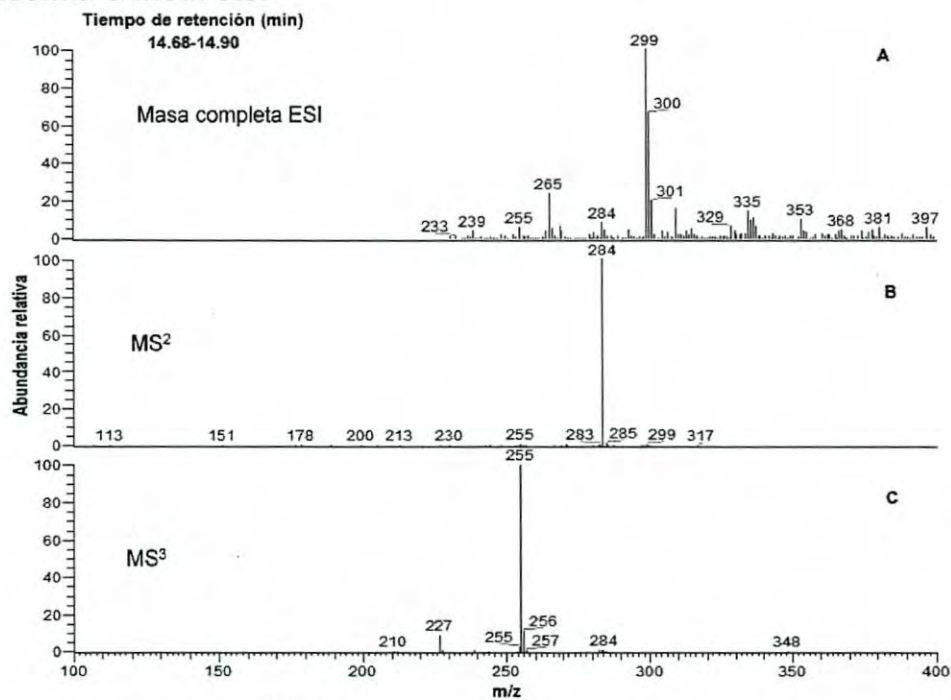
Kaempferol

Tiempo de retención (min)
12.23



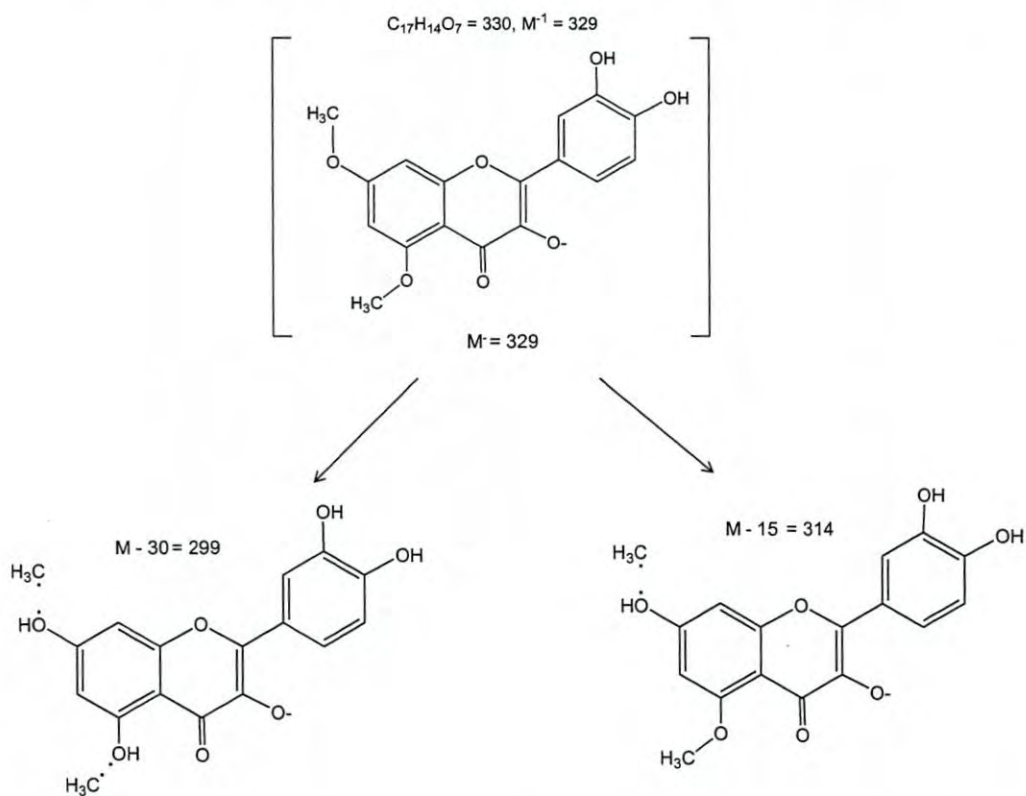
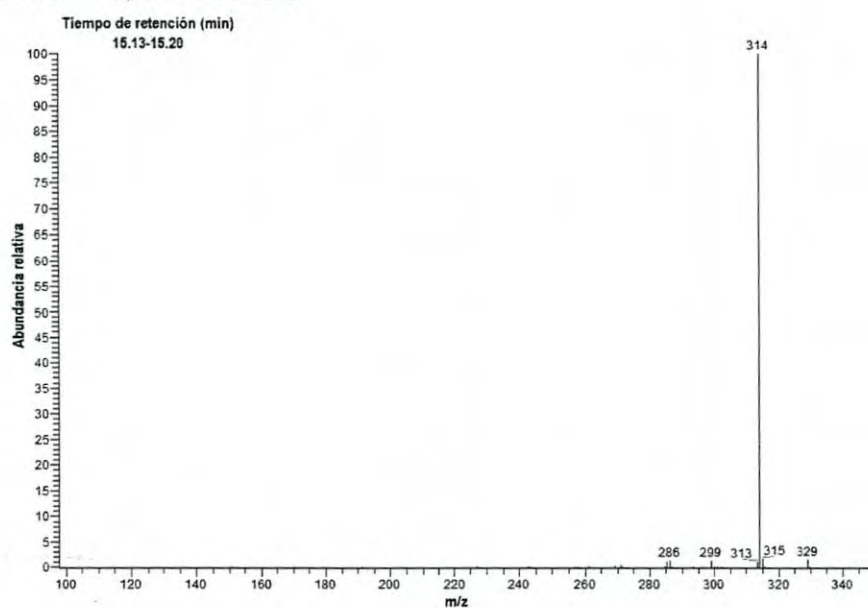
Apéndice LIX. Caracterización química de kaempferol por HPLC-MS-Q-TOF.

Luteolina-5-metil éter



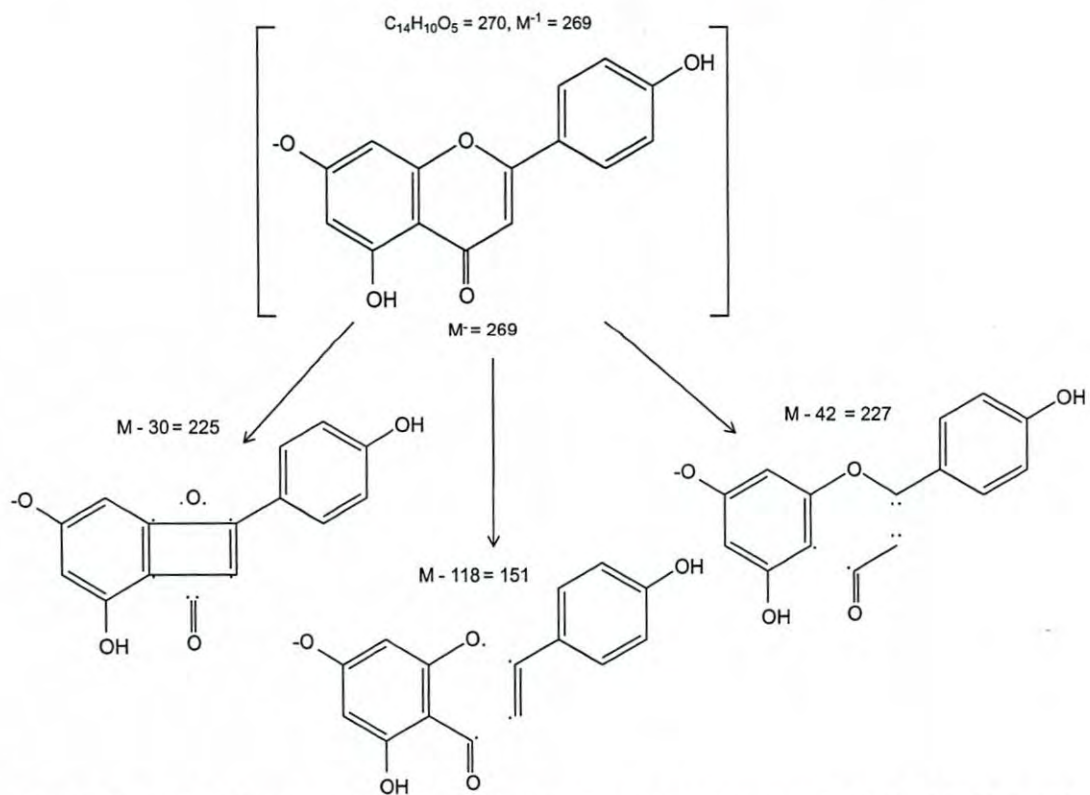
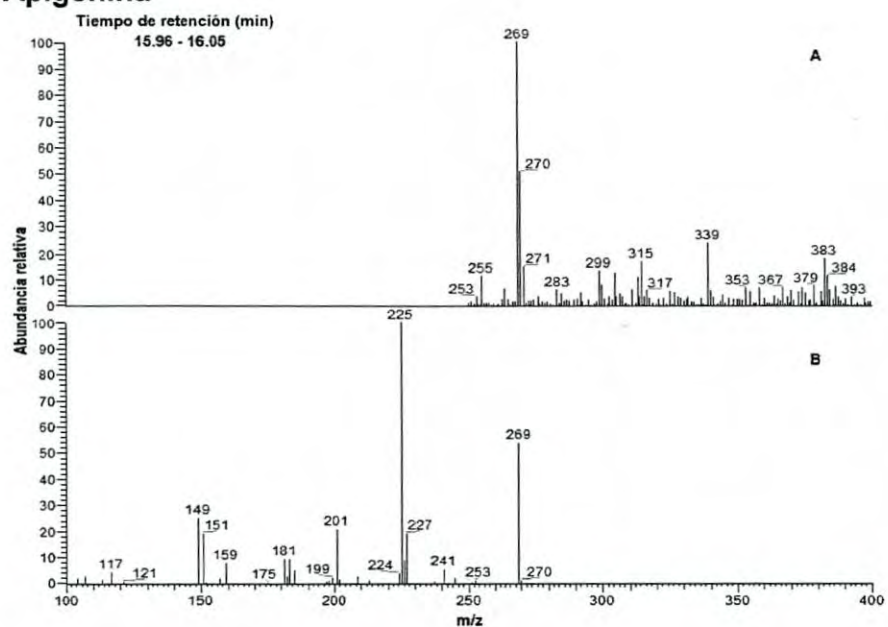
Apéndice LX. Caracterización química de luteolina-5-metil éter por HPLC-MS-Q-TOF.

Quercitina-5,7-dimetil éter



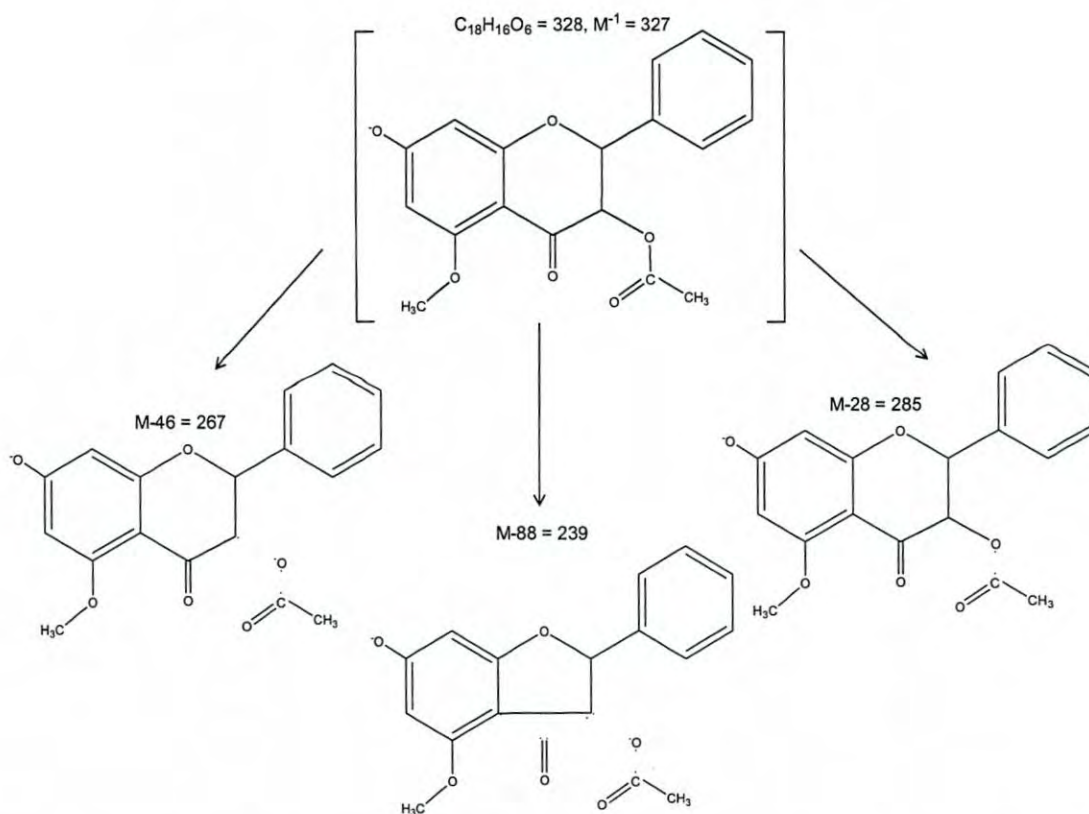
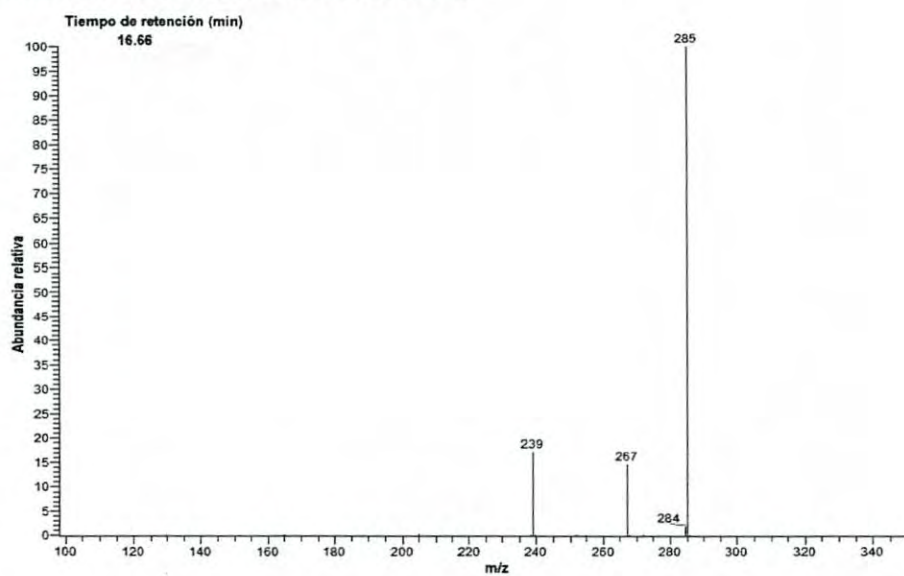
Apéndice LXI. Caracterización química de quercitina-5,7-dimetil éter por HPLC-MS-Q-TOF.

Apigenina



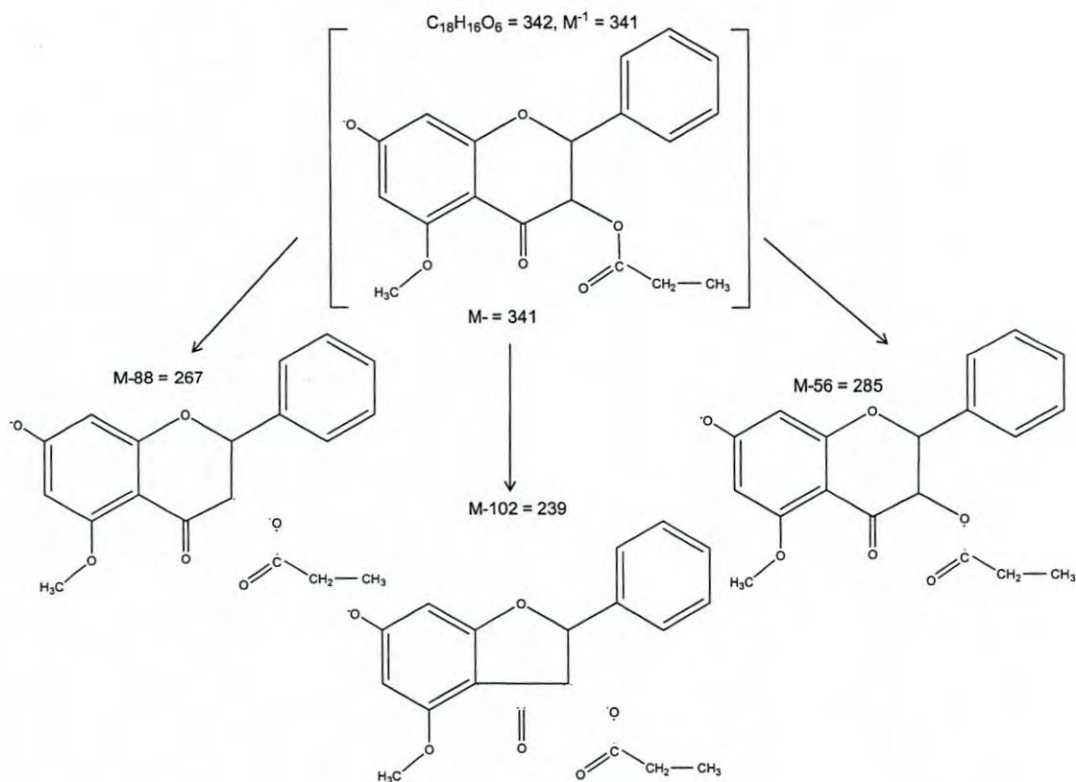
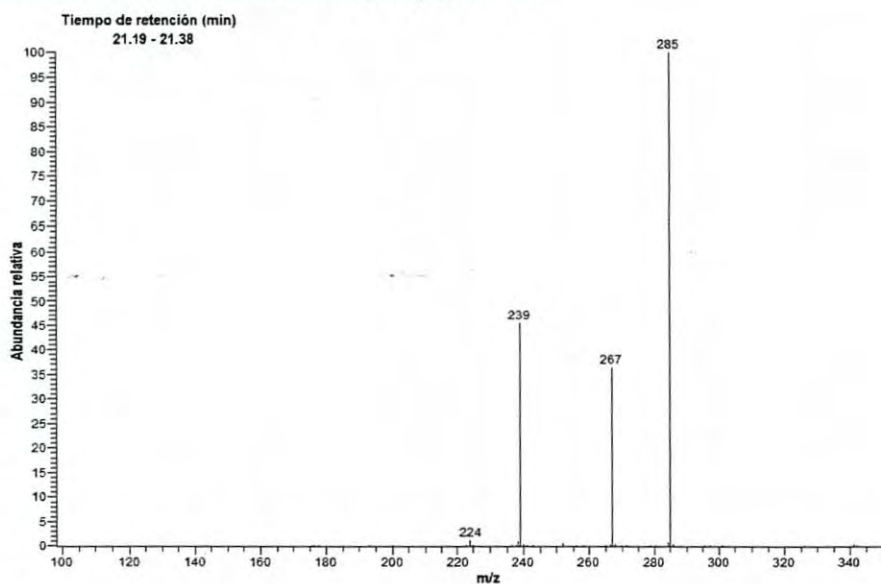
Apéndice LXII. Caracterización química de apigenina por HPLC-MS-Q-TOF.

Pinobanksina-5-metil éter-3-acetato



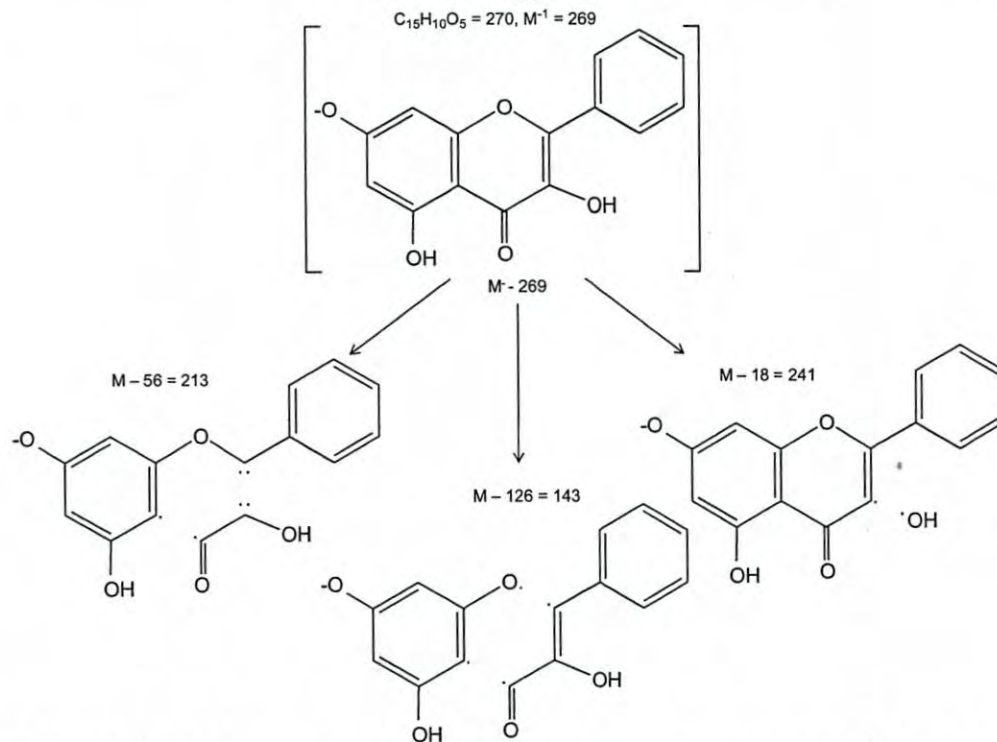
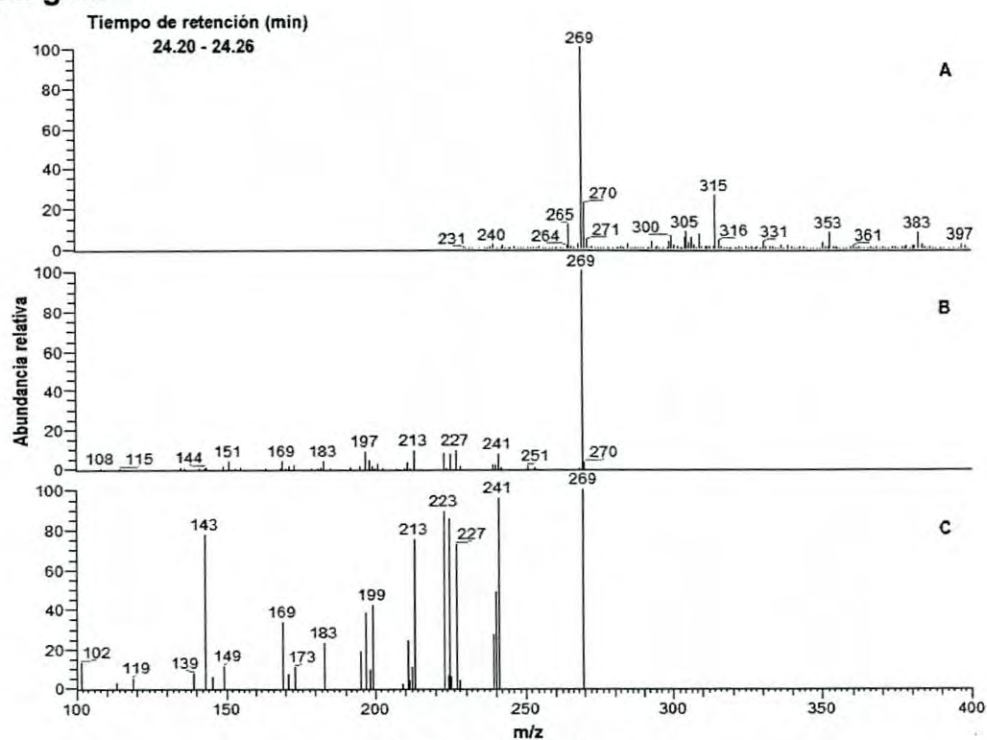
Apéndice LXIII. Caracterización química de pinobanksina-5-metil éter-3-acetato por HPLC-MS-Q-TOF.

Pinobanksina-5-metil éter-3-propanoato



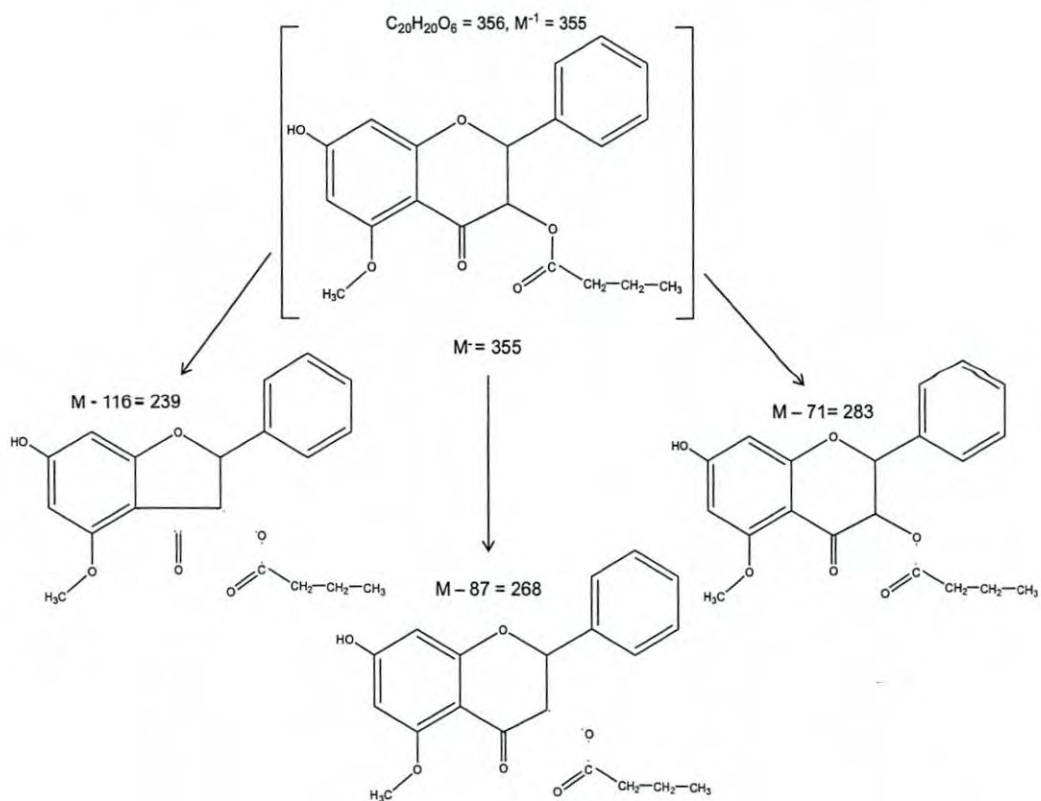
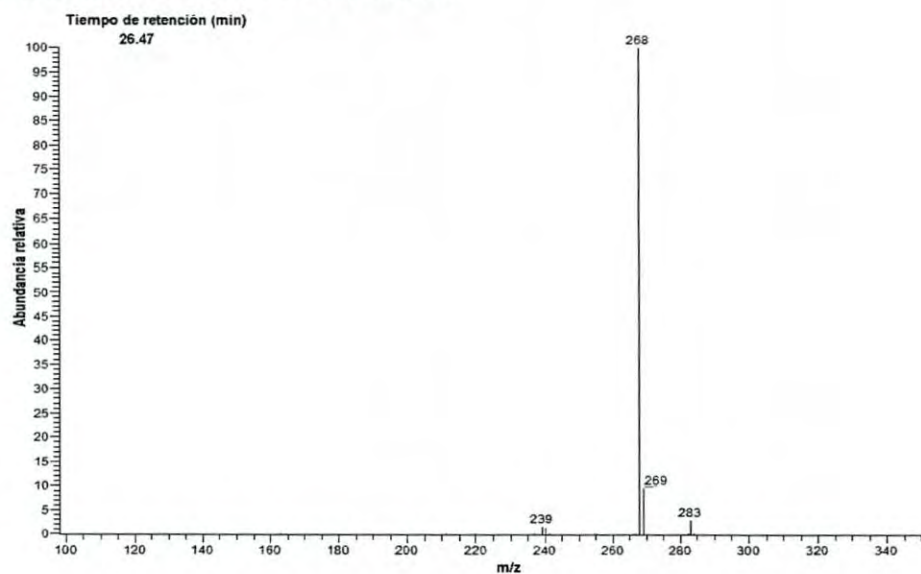
Apéndice LXIV. Caracterización química de pinobanksina-5-metil éter-3-propanoato por HPLC-MS-Q-TOF.

Galangina



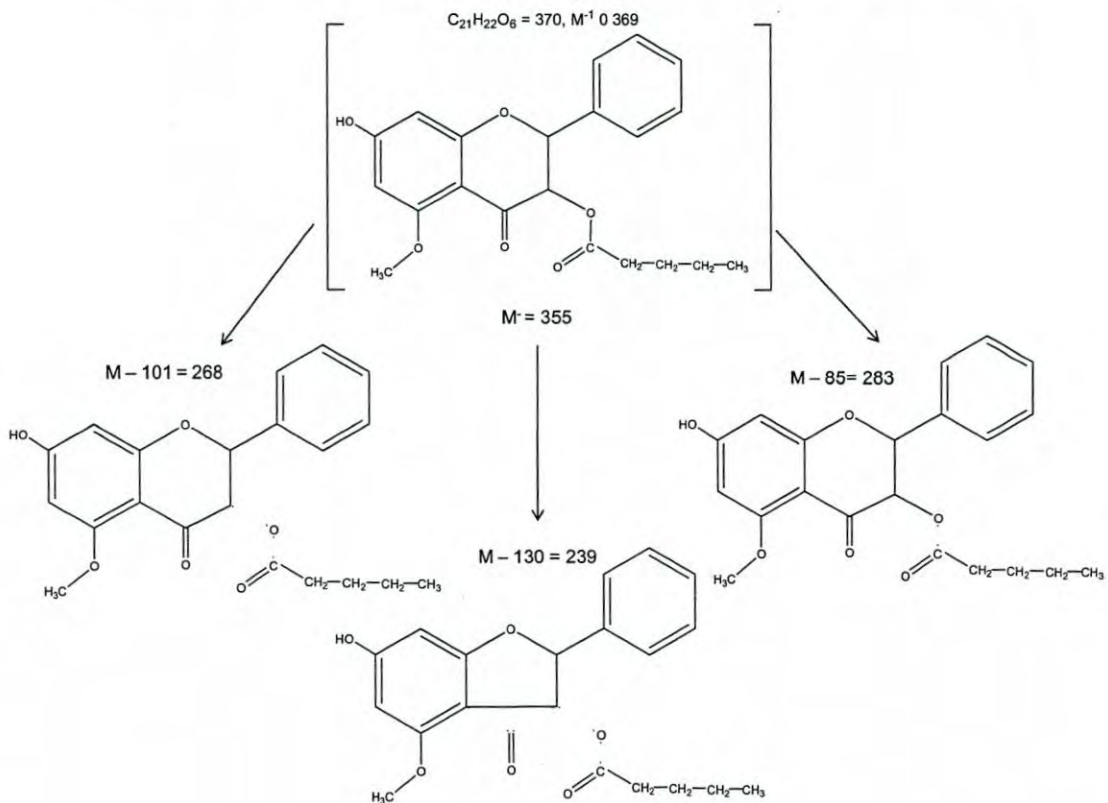
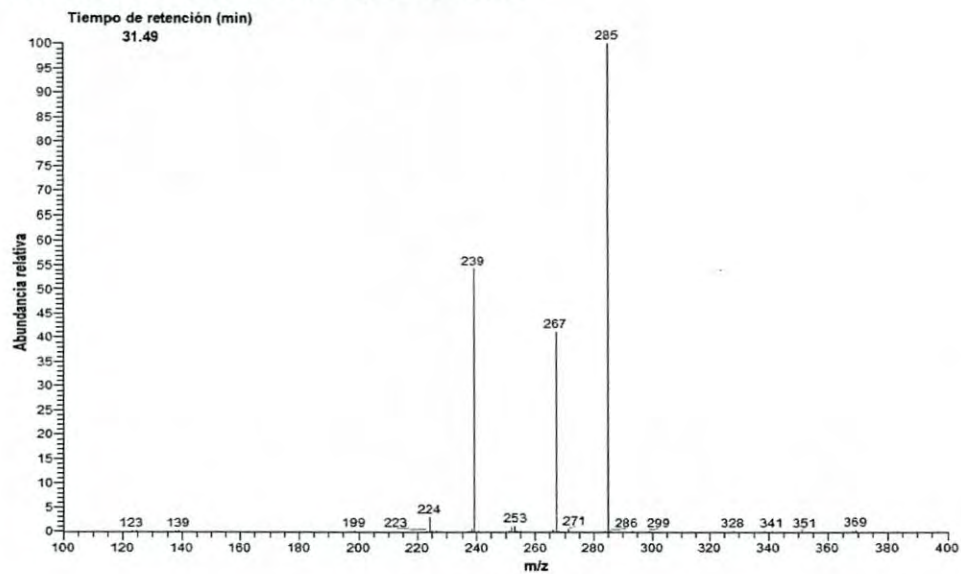
Apéndice LXV. Caracterización química de galangina por HPLC-MS-Q-TOF.

Pinobanksina-5-metil éter-3-butirato



Apéndice LXVI. Caracterización química de pinobanksina-5-metil éter-3-butirato por HPLC-MS-Q-TOF.

Pinobanksina-5-metil éter-3-pentanoato



Apéndice LXVII. Caracterización química de pinobanksina-5-metil éter-3-pentanoato por HPLC-MS-Q-TOF.

Tabla LXVIII. Actividad antiproliferativa para la resina de especie *Populus fremontii* de la estación de Invierno reportada en IC₅₀.

Disolvente empleado para extracción	IC ₅₀ (µg/mL)		Inducción de cambios morfológicos (formas largas)
	M12A ^k .C3F6	L-929	
Metanol	29.6 ± 5.6	47.6 ± 3.9	No
Diclorometano	50.2 ± 2.4	55.2 ± 8.3	No
Acetato de etilo	57.0 ± 0.5	62.7 ± 9.2	No

Tabla LXIX. Actividad antiproliferativa para la resina de la especie *Ambrosia ambrosioides* de la estación de invierno reportada en IC₅₀.

Disolvente empleado para extracción	IC ₅₀ (µg/mL)		Inducción de cambios morfológicos (formas largas)
	M12A ^k .C3F6	L-929	
Metanol	0.2 ± 0.1	31.5 ± 1.6	+++
Diclorometano	6.3 ± 0.1	55.5 ± 7.7	+++
Acetato de etilo	0.5 ± 0.1	44.4 ± 8.9	+++

Tabla LXX. Actividad antiproliferativa para la resina de la especie *Bursera laxiflora* de la estación de invierno reportada en IC₅₀.

Disolvente empleado para extracción	IC ₅₀ (µg/mL)		Inducción de cambios morfológicos (formas largas)
	M12A ^k .C3F6	L-929	
Metanol	62.5 ± 9.5	111.7 ± 10.9	++
Diclorometano	55.4 ± 7.1	107.2 ± 0.1	++
Acetato de etilo	49.8 ± 4.2	74.1 ± 3.7	++

Tabla LXXI. Actividad antiproliferativa para la resina de la especie *Prosopis velutina* de la estación de Invierno reportada en IC₅₀.

Disolvente empleado para extracción	IC ₅₀ (µg/mL)		Inducción de cambios morfológicos (formas largas)
	M12A ^k .C3F6	L-929	
Metanol	31.85 ± 1.79	N.D.	N.D.
Diclorometano	35.8 ± 3.4	25 - 50	No
Acetato de etilo	Sin actividad	Sin actividad	No

N.D. Experimento No Determinado, cantidad insuficiente de extracto.