Centro de Investigación en Ali1nentación v Desarrollo, A.C.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PROPÓLEOS SONORENSES Y DE SUS PRINCIPALES CONSTITUYENTES

POR:

MOISÉS NAVARRO NAVARRO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGiA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRiA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA JUNIO DE 2007

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis titulada "Actividad antibacteriana de propóleos sonorenses y de sus principales constituyentes" realizada por el Q.B. Moisés Navarro Navarro, la han encontrado satisfactoria y la aprueban para que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dr. Javier Hernández Martínez
Director de Tesis

Dr. Carlos A. Velázquez Contreras

Dr. Humberto Astiazarán García
Secretario

Dra. Armida Sánchez Escalante

Dr. Ramón E. Robles Zepeda

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Al Creador de Todo lo que Existe y que ha sido **ayuda fiel** durante toda mi vida

Señor, Señor, Tú antes, Tú después,
Tú en la inmensa hondura del vacío y en la hondura interior.
Tú en la aurora que canta y en la noche que piensa;
Tú en la flor de los cardos y en los cardos sin flor.

Tú en el cenit a un tiempo y en el nadir;
Tú en todas las transfiguraciones y en todo el padecer;
Tú en la capilla fúnebre, Tú en la noche de bodas;
¡Tú en el beso primero, Tú en el beso postrero!

Tú en los ojos azules y en los ojos oscuros;
Tú en la frivolidad quinceañera y también
en las grandes ternezas de los años maduros;
Tú en la más negra sima, Tú en el más alto edén.

Si la ciencia engreída no te ve, yo te veo;
si sus labios te niegan, yo te proclamaré.
Por cada hombre que duda, mi alma grita: "Yo creo"
¡y con cada fe muerta, se agiganta mi fe!

Amado Nervo

A mi amor eterno... Angélica y a nuestros pimpollitos, Moisés Emanuel, Miriam Angélica y Daniel Alejandro....por su apoyo para lograr una nueva meta y su comprensión durante mis ausencias, ustedes son y serán el motivo de mi esfuerzo. LOS AMO.

A mis hermanos Ana Lilia y David, mis cuñados Leonel y Annie y mis sobrinos Leonel, Zahid y Dayana. Una familia chica, pero de muchísima calidad. Quienes siempre me alentaron para seguir adelante. Dios sabe cuánto los quiero.

A mi Suegra Lupita....sus continuas oraciones por mí y por mi familia, han atravesado el cielo y hemos sido grandemente bendecidos y protegidos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por su gran apoyo para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por sus puertas siempre abiertas para la labor científica y académica.

A los Dres. Javier Hernández y Carlos Velázquez, más que maestros, mis amigos.

A los Dres. Integrantes de mi comité de tesis, **Ramón Robles, Humberto Astiazarán y Armida Sánchez.** Muchas gracias por extenderme siempre la mano.

A cada uno de los maestros titulares de las materias cursadas. De manera especial a la Dra. Ana María Calderón, por su apoyo y consejos.

A Karla Martínez, por su gran apoyo en el HPLC para la cuantificación de compuestos.

A las chicas superpoderosas Karla, Leticia y Alma, por su ayuda y asistencia durante mi estancia en el Laboratorio de Biopolímeros. Y porque siempre que quebraba algún frasco, ustedes iban corriendo.....a contárselo al jefe. Gracias Chicas.

Al Dr. Samuel Galaviz Moreno. Por tu apoyo incondicional. Sin tu gran ayuda no habría concluido en tiempo y forma. Existen muy pocos funcionarios como tú... no cambies.

Al Laboratorio de Microbiología del CIAD, especialmente al **M.C. Alfonso García Galaz** y a la **Dra. Martha Díaz Cinco**, por poner a mi disposición cepas bacterianas para la realización de mi trabajo de investigación.

A Verónica, Héctor, Laura e Isabel, su labor administrativa es muy importante, gracias.

A la **Dra. María del Carmen Candia Plata** y a la **Q.B. Claudia Molina**, por su gran disposición, cooperación y facilidades otorgadas durante mi estancia en el Laboratorio de Inmunohematología.

A las M.C. Magdalena González, María Isabel Tapia y Reyna Isabel Sánchez, por su gran apoyo durante estos dos años.

A mis compañeros de trinchera: Lucila, Lucía, Gaby, Anita, Pedro, Claudia, Jael, Carlos, Paola, Rafael, Idania, Martín y Carolina. Juntos aguantamos de todo, y nos dimos tiempo para disfrutar excelentes momentos de amistad y alegría. Así se forjan los amigos. Gracias por su amistad, cuenten con la mía.

A mis AMIGOS profesores de la Academia de Análisis Clínicos, Griselda, Rogelio, Adriana, Olivia, Lucía, Lucila, Carlos, Carmen, Eduardo, Sandra, Rosa Estela, Aída y Edilia, por insistir y lograr su objetivo.

A mis compañeros de generación: TereLu, Luis Enrique, Aurora, Jesús, Oliviert, Alfonso, Orlando, Nohemí, Mariana, Consuelo, Daniel, Cecy, Sandra, Karem, Erika, Margarito, Denisse, Iván, Luis Enrique, Leslie, Johana, Laura, Saribel.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
Propóleos	5
Origen Botánico y Geográfico	7
Composición Química	8
Flavonoides	9
Composición de propóleos de regiones templadas	10
Composición de propóleos de Brasil	12
Composición de propóleos de regiones áridas	12
Composición química de propóleos de Sonora	12
Actividad Antibacteriana de los Extractos de Propóleos	16
Propóleos de Climas Templados	16
Propóleos de Regiones Tropicales	18
Propóleos de Regiones Áridas	19
Actividad Antibacteriana de Compuestos Presentes en Propóleos	20
Mecanismos de Acción Antibacteriana	21

	Página
OBJETIVO GENERAL	23
Objetivos Particulares	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Muestras de Propóleos	24
Obtención de los Extractos Metanólicos de Propóleos (EMP)	24
Actividad Antibacteriana	25
Solución Concentrada de EMP y Compuestos Puros	25
Solución de Trabajo de EMP y Compuestos Puros	25
Determinación de la Actividad Antibacteriana	26
Concentración Mínima Inhibitoria 90% (MIC_{90})	26
Inóculo Bacteriano	27
Compuestos puros	27
Cepas Bacterianas	27
Cuantificación de Compuestos Identificados en los EMP	28
Análisis Estadístico	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Actividad Antibacteriana de los EMP	30
Cuantificación de los Compuestos Mayoritarios Identificados en los EMP	38
Actividad Antibacteriana de Compuestos Identificados en los EMP	38
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	50

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de algunos flavonoides. **(A)** Benzo-γ-pirona. **(B)** Flavonoles, ejemplos; kaempferol, R-H, R'-OH, R''-OH, quercetina, R-OH, R'-OH. **(C)** Isoflavonoles. **(D)** Flavonas, ejemplos: Crisina R-H, R'-H, luteolina R-OH, R''-OH. **(E)** Isoflavonas.	10
2	Estructura química de compuestos encontrados en propóleos de regiones de clima templado. (A) Pinocembrina, (B) 3-O-Acetato de Pinobanksina, (C) Pinobanksina, (D) Éster fenetílico del ácido cafeico.	11
3	Estructura química de compuestos aislados de los propóleos de color verde. **(A)** Ácido 4-hidroxi-3,5-diprenil cinámico (Artepilina C). **(B)** Kaemferide. **(C)** Benzofurano.	13
4	Estructura química de los principales compuestos aislados de los propóleos del Desierto de Sonora. **(A)** Xanthomicrol, **(B)** 3'-demetoxisudaquitin.	13
5	Estructura química de los compuestos purificados y caracterizados de los propóleos de Ures, Sonora. **(A)** pinocembrina, **(B)** 3-O-acetato de pinobanksina, **(C)** Crisina.	14
6	Contenido de fenoles totales en propóleos sonorenses. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando una mezcla de pinocembrina/galangina como estándar para la curva de calibración. PU, propóleos de Ures; PC, propóleos de Caborca; PPA, propóleos de Pueblo de Álamos.	15
7	Actividad antibacteriana de propóleos de Sonora, PU, CP y PPA frente a cultivos bacterianos tratados con diferentes dosis de propóleos durante 48 h. (■) 400 μg/mL, (▲) 200 μg/mL, (▼) 100 μg/mL, (♦) 50 μg/mL, (●) 0.0 μg/mL, (□) gentamicina. El cultivo control contenía dimetil sulfóxido (0.2%-0.8%). El antibiótico gentamicina (12 μg/mL) se utilizó como control de inhibición del desarrollo. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media ± desviación estándar de análisis triplicados	31

Figura		Página
8	Desarrollo de las cepas *S. aureus* 25923 y 29213 tratadas con diferentes dosis de propóleos durante 48 h. (■) 400 μg/mL, (▲) 200 μg/mL, (▼) 100 μg/mL, (♦) 50 μg/mL, (●) 0.0 μg/mL, (□) gentamicina (12 μg/mL). El cultivo control incluyó dimetil sulfóxido (0.6%). Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media ± desviación estándar de análisis triplicados.	32
9	Densidad óptica del desarrollo de cepas clínicas de *S. aureus* que fueron tratadas con distintas concentraciones de propóleos, después de 24 h de incubación. (■) PC, (▲) PU, (▼) PPA.	35
10	Curvas de desarrollo de *S. aureus* 6538P frente a compuestos presentes en las muestras de propóleos. Los cultivos fueron tratados con diferentes dosis (0.0-0.8 mM) de CAPE, pinocembrina, 3-O-Acetato de Pinobanksina y naringenina durante 48 h. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (▼) 0.2 mM, (♦) 0.1 mM, (Δ) 0.05 mM, (◊) 0.025 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).	40
11	Curvas de desarrollo de *S. aureus* 6538P frente a diferentes dosis de compuestos presentes en las muestras de propóleos. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL)	41
12	Curvas de desarrollo de *E. coli* 25922 frente a diferentes dosis de compuestos presentes en las muestras de propóleos. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL)	42
13	Curvas de desarrollo de las cepas clínicas de *S. aureus*. Los cultivos fueron tratados con diferentes dosis (0.0-0.4 mM) de CAPE durante 48 h. (■) 0.4 mM, (▲) 0.2 mM, (▼) 0.1 mM, (♦) 0.05 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).	43
14	Efecto antibacteriano del CAPE sobre el desarrollo de cepas de colección. Los microorganismos se hicieron desarrollar en presencia de distintas concentraciones de CAPE durante 48 h. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (▼) 0.2 mM, (♦) 0.1 mM, (Δ) 0.05 mM, (◊) 0.025 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).	44

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales compuestos detectados e identificados por HPLC-MS en propóleos sonorenses.	14
2	Contenido de favonoides y fenólicos totales en propóleos sonorenses.	15
3	Sitios de recolección de las muestras de propóleos y especies de plantas predominantes.	25
4	Características de las cepas clínicas de *S. aureus*.	28
5	Concentración mínima inhibitoria 90% (MIC_{90}) (μg/mL) de los EMP frente a cepas de colección.	32
6	Concentración Mínima inhibitoria 90% (MIC_{90}) de propóleos de Sonora frente a cepas de origen clínico.	34
7	Informes de concentración mínima inhibitoria (MIC) de propóleos de distintas regiones y los obtenidos en el presente trabajo.	37
8	Cuantificación de compuestos identificados en propóleos Sonorenses, utilizando HPLC-RP (mg/g de propóleos).	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americanos
BHI	Infusión de Cerebro y Corazón
CAPE	Éster Fenetílico del Ácido Cafeico
CIAD	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
CMH	Caldo Mueller-Hinton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
EMP	Extracto Metanólico de Propóleos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
HPLC-RP	Cromatografía Líquida de Alta Presión con Fase Reversa
PC	Propóleos de Caborca
PPA	Propóleos de Pueblo de Álamos
PU	Propóleos de Ures

RESUMEN

Los propóleos están formados por resinas y aceites recolectados por las abejas a partir de secreciones y exudados de plantas y árboles. La diversidad botánica de los propóleos conduce a una compleja composición química y actividad biológica. Los extractos de propóleos presentan actividad antibacteriana y se ha establecida que los compuestas fenólicos son los principales responsables de dicha actividad. Los extractos metanólicos de propóleos (EMP) de las regiones de Caborca (PC), Ures (PU) y Pueblo de Álamos (PPA), Sonora, así como sus principales constituyentes, fueron evaluados en su actividad antibacteriana mediante el método de microdilución en caldo. Para la cuantificación de los principales constituyentes de los EMP se realizaron curvas de calibración a partir de cromatogramas obtenidos por HPLC. Los propóleos y los compuestos puros se ensayaron frente a Staphylococcus aureus ATCC 6538P, 25923 y 29213, Enterococcus faecalis 29212, Listeria monocytogenes 7644, Escherichia coli 25922, Pseudomonas aeruginosa 27853 y aislados clínicos de S. aureus resistentes a los antibióticos. Los EMP mostraron actividad sólo frente a Gram positivos (PU>PC>PPA) a una concentración mínima inhibitoria (MIC) entre 100-400 µg/mL. El éster fenetílico del ácido cafeico, un constituyente de PU, presentó la mayor actividad antibacteriana principalmente contra S. aureus 6538P (MIC 0.1 mM). Los flavonoides pinocembrina (MIC 0.4 mM), 3-O-acetato de pinobanksina (MIC 0.8 mM) y naringenina (MIC 0.8mM) también inhibieron el desarrollo de S. aureus 6538P. Ninguno de los compuestos presentó actividad antibacteriana contra las bacterias Gram negativas. PU y PC mostraron fuerte actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas. CAPE presentó la mayor actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos en bacterias causantes de enfermedades infecciosas, aumenta la morbimortalidad y los costos de atención a la salud. Las infecciones respiratorias agudas y las diarreicas, el sarampión, el paludismo y la tuberculosis son la causa de más del 85% de mortalidad por infecciones en el mundo (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2). La resistencia de los agentes infecciosos a los medicamentos de primera línea en el mundo, va de 0 a casi 100% (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2). La resistencia incrementa el sufrimiento humano y la mortalidad, sobre todo en lugares donde no se dispone de medicamentos de 2ª y 3ª línea (Cars y Nordberg, 2004). Se ha observado que la mortalidad de la infección causada por *Staphylococcus aureus* multirresistente a los antibióticos, se incrementa hasta tres veces en comparación a la causada por una cepa sensible (Cars y Nordberg, 2004). Además, cuando el tratamiento resulta infructuoso, se incrementan los costos, ya que se prolonga la enfermedad y la frecuencia de las hospitalizaciones (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2). La resistencia a los antibióticos es un serio problema de salud pública a nivel mundial que requiere soluciones urgentes.

Diversos agentes bacterianos están causando fallas terapéuticas debido a su resistencia a los antibióticos. *Salmonella* sp. resistente a cloranfenicol, tetraciclina, sulfametoxazol, ampicilina y ciprofloxacina, es causante de brotes comunitarios en países europeos y Estados Unidos (Kapil, 2005). *Shigella* sp. resistente a los antibióticos de las familias de las quinolonas y fluoroquinolonas, es endémica en

diversas regiones del mundo. El tratamiento del cólera se ha complicado debido a cepas resistentes a quinolonas, furazolidona y tetraciclinas. La neumonía causada por *Streptococcus pneumoniae* en países como España, no responde al tratamiento con penicilina. Existe una fuerte evidencia que la resistencia en esta bacteria conlleva una terapia prolongada, pérdida de productividad e incluso la muerte (Finch, 2004). Microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son patógenos intrahospitalarios cuya principal característica es su multirresistencia a los antibióticos (Kapil, 2005). El problema de la resistencia a múltiples antibióticos es un tema común entre los distintos patógenos bacterianos.

El descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos es importantes si se quiere contener el problema de la resistencia. Para garantizar un tratamiento efectivo para las enfermedades infecciosas, se necesitan urgentemente nuevos antibióticos (Becker y col., 2006). La Organización Mundial de la Salud, en su plan estratégico para contener la resistencia, recomienda estimular el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibacterianos (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2). La Organización Panamericana de la Salud, en su plan de acción para combatir la resistencia, considera como un punto prioritario el desarrollo de nuevos fármacos y antibióticos (OPS, 2001).

Las sustancias antimicrobianas se obtienen por síntesis química y a partir de fuentes naturales. Sin embargo, son pocos los antibióticos, como las sulfas y las quinolonas que se han obtenido por síntesis química (Walsh y Wright, 2005). En cambio, la naturaleza ha sido la principal fuente para la obtención de una gran cantidad de antimicrobianos. El descubrimiento y desarrollo de antimicrobianos sintetizados por

hongos y bacterias a mediados del siglo pasado, detuvo la búsqueda de fuentes botánicas. Sin embargo, la resistencia de los patógenos hacia los antimicrobianos conocidos, ha obligado a buscar en las plantas, compuestos útiles para la terapia antibiótica (Domingo y López-Brea, 2003). ,

El uso de extractos de plantas como alternativas para promover la salud, comenzó a resurgir con gran fuerza desde fines del Siglo XX. Las plantas sintetizan más de 100,000 metabolitos secundarios, muchos de los cuales tienen actividad antimicrobiana (Domingo y López-Brea, 2003). La planta secreta algunos de estos metabolitos en la superficie de las hojas y en los brotes, para protegerse de la luz ultravioleta, de hongos e insectos. Las abejas (*Apis mellifera*) recolectan las secreciones de las plantas para formar lo que se conoce como propóleos. Estos representan otra alternativa en la búsqueda de sustancias antimicrobianas.

El control del desarrollo microbiano es un proceso indispensable y necesario para múltiples aplicaciones. La industria farmacéutica se encuentra en la búsqueda de compuestos antimicrobianos para prevenir y tratar infecciones en humanos, animales y vegetales. Los antimicrobianos son utilizados en la higiene personal en jabones, detergentes y desodorantes. Los hospitales los utilizan para desinfectar mesas, instrumentos, ropa y como antisépticos en la piel de los pacientes. Diversas técnicas experimentales demandan condiciones asépticas para excluir microorganismos contaminantes. La conservación de alimentos, la inocuidad alimentaria y la potabilización del agua, requieren compuestos nuevos que impidan la germinación de esporas y el desarrollo microbiano. Los compuestos con actividad antimicrobiana de los

propóleos, pueden encontrar múltiples aplicaciones en procesos o técnicas que impiden o controlen el desarrollo bacteriano.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de diferentes propóleos sonorenses y sus principales constituyentes.

ANTECEDENTES

Propóleos

Las abejas (*Apis mellifera*) recolectan resinas de distintas plantas cercanas a la colmena y las mezclan con cera para formar lo que se conoce como propóleos (Sahinler y Kaftanoglu, 2005). Las resinas recolectadas son activamente secretadas y exudadas por las plantas (Bankova y col., 2000). Las propiedades mecánicas de los propóleos son utilizados por las abejas para reparar la colmena, acumulándolos en grietas y huecos. También impiden la entrada de hormigas o escarabajos y la putrefacción de insectos y animales pequeños, de manera que promueven un ambiente aséptico dentro de la colmena (Sahinler y Kaftanoglu, 2005). De allí el origen de la palabra "propolis" que en griego significa defensor de la ciudad (Burdock, 1998).

El ser humano ha utilizado los propóleos en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos desde hace cientos y quizá miles de años (Santos y col., 2002). En el Antiguo Testamento, los propóleos se mencionan como un bálsamo curativo (Cushnie y Andrew, 2005). Hipócrates (460-377 A.C.) los prescribió para el tratamiento de las úlceras en la piel y Aristóteles para el tratamiento de abscesos y heridas. En la Edad Media, se utilizaban en ungüentos como antisépticos, cicatrizantes de heridas y en solución para la desinfección bucal. En el Continente Americano, los Incas lo ingerían para disminuir la fiebre (Castaldo y Cappasso, 2002). Actualmente, algunas culturas de los estados europeos Balkánicos continúan

aplicándolos para el tratamiento de heridas, quemaduras, faringitis y úlcera estomacal (Bankova, 2005).

Estudios recientes han demostrado que los propóleos poseen actividad como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, antiinflamatorios, antitumorales, hepatoprotectores y antioxidantes (Bankova, 2005; Farré y col., 2004). Estas propiedades han generado gran interés en la industria farmacéutica.

Los propóleos son cada vez más populares en el comercio en Estados Unidos, la Unión Europea y Japón. Están presentes en los biocosméticos y son utilizados como un medicamento alternativo, como alimento funcional y complemento dietético, que mejora la salud y previene enfermedades (Bankova, 2000; Weinstein y col., 2005; Ohnishi y Teruyoshi, 2004). Las ventas de propóleos en Estados Unidos en 1996 se estimaron en 40,000 lb (Burdock, 1998). Japón es el lider importador de propóleos, con preferencia por el brasileño. Actualmente los apicultores de Brasil tienen en los propóleos su principal producto y desarrollan métodos para optimizar su producción (Salatino y col., 2005). México produjo 3.3 toneladas de propóleos en el año 2002 (Ortega-Rivas y Ochoa-Bautista, 2004). El estudio de la actividad biológica de los propóleos de nuestra región, podría impulsar su comercio y significar una fuente de ingresos para los apicultores.

Origen Botánico y Geográfico

La recolección de resinas y exudados por parte de las abejas es difícil de observar, ya que generalmente se realiza en las partes altas de los árboles (Bankova y col., 2000). La miel y el polen son referidos por su origen botánico, lo mismo sucede con los propóleos. La observación del comportamiento de las abejas, el análisis de polen, estructuras de plantas, flavonoides y otros compuestos presentes en los propóleos, permite relacionarlos con su origen botánico (Kumazawa y col., 2003)

Las plantas elegidas por las abejas para la recolección de resinas son distintas en cada región geográfica. Se ha informado que los propóleos producidos en zonas de clima templado, provienen principalmente de especies de álamos (*Populus* spp.) y abedules (*Betula verrucosa*). En regiones mediterráneas, las fuentes botánicas son los álamos y *Cistus spp* (Farré y col., 2004). También se han estudiado propóleos de regiones tropicales; en Venezuela y Cuba, las abejas recolectan resinas de las flores de *Clusia minor* y *Clusia rosea*, respectivamente. Las principales fuentes botánicas de los propóleos del centro y sureste de Brasil son las especies de los géneros *Baccharis, Vernonia, Diclenia, Hyptis, Marcia, Schinus* y *Weinmania* (Salatino y col., 2005).

En relación a los propóleos de zonas áridas y semiáridas, existen pocos estudios relacionados con su origen botánico. Los propóleos de regiones áridas de Chile, tienen su origen en plantas de las familias de *Asteraceae, Anacardiaceae, Rosaceae, Rhamnaceae, Monimiaceae* y *Lauraceae* (Valcic y col., 1998). En el Desierto de

Sonora, una zona con gran biodiversidad de plantas, solo se ha estudiado una pequeña región del mismo. Las principales fuentes para la recolección de resinas son las especies de *Ambrosia deltoidea* (chicurrilla, huizapol) y *Encelia farinosa* (hierba ceniza, incienso) (Wollenweber y Buchmann, 1997). El conocimiento de la fuente botánica en cada región geográfica es importante, si se quieren producir propóleos quimicamente homogéneos.

Composición Química

Los componentes químicos en los propóleos dependen de la flora local cercana al sitio donde se encuentra la colmena (Bosio y col., 2003). Las abejas recolectan resinas en un perímetro de 3-4 Km alrededor de la colmena (Menezes, 2005). Debido a las distintas características fitogeográficas, existe una gran diversidad en la constitución química de los propóleos (Bankova, 2005).

En los propóleos se han identificado más de 180 compuestos distintos (Castaldo y Capasso 2002). En general, se componen de resinas y aceites volátiles (50%), cera (30%), aceites aromáticos (10%), polen (5%) y otras sustancias (5%). La cera, el polen y detritos orgánicos son removidos cuando se preparan extractos alcohólicos (Burdock, 1998). En los propóleos se han identificado flavonoides, ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes, aldehídos y terpenos (Sahinler y Kaftanoglu, 2005; Silici y Kutluca, 2005; Uzel y col., 2005). Los propóleos de distintas regiones presentan alta concentración de flavonoides. También pequeñas cantidades de vitamina B, azúcares, hierro, zinc, oro,

plata y potasio (Farré y col., 2004). Los extractos etanólico-acuosos contienen gran cantidad de ácido cafeico y de los flavonoides galangina, quercetina y crisina. Los extractos etanólicos presentan alta concentración de crisina y ácido cafeico (Lotfy, 2006). Esta composición tan heterogénea es la responsable de su múltiple actividad biológica.

Flavonoides. Los flavonoides son de los compuestos más abundantes en los propóleos de distintas regiones. Con muy pocas excepciones, sólo las plantas son capaces de sintetizar flavonoides (Cuyckens y Claeys, 2004). Los podemos encontrar en frutas, hojas, semillas, tallos, flores, además de té, vino tinto, propóleos y miel (Cushnie y Andrew, 2005). Su función en las flores es generar colores para atraer a los polinizadores y en las hojas impiden el desarrollo de hongos patógenos y bloquean la radiación ultravioleta. Actúan como hormonas que regulan el crecimiento de la planta y participan en el control de la respiración, la fotosíntesis, morfogénesis y determinación del sexo (Cushnie y Andrew, 2005). También actúan como agentes quelantes de metales tóxicos para la planta. Los botánicos utilizan el patrón de ocurrencia de los flavonoides en las plantas para estudios taxonómicos (Havsteen, 2002). En salud humana, los flavonoides son utilizados en la prevención de cáncer, demencia, aterosclerosis y enfermedad cardíaca-coronaria (Winkel-Shirley, 2001; Cuyckens y Claeys, 2004).

Los flavonoides son un grupo muy grande de compuestos polifenólicos derivados de la benzo-γ-pirona (Figura 1). En la naturaleza se encuentran como agliconas,

glicósidos y derivados metilados (Narayana y col, 2001). Se han descrito más de 4000 distintos flavonoides (Hong-Xi y Lee, 1999). Por sus diferencias químicas pueden clasificarse en: flavonoles, isoflavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanos, isoflavanos, flavonoles e isoflavonoles (Figura 1) (Havsteen, 2002).

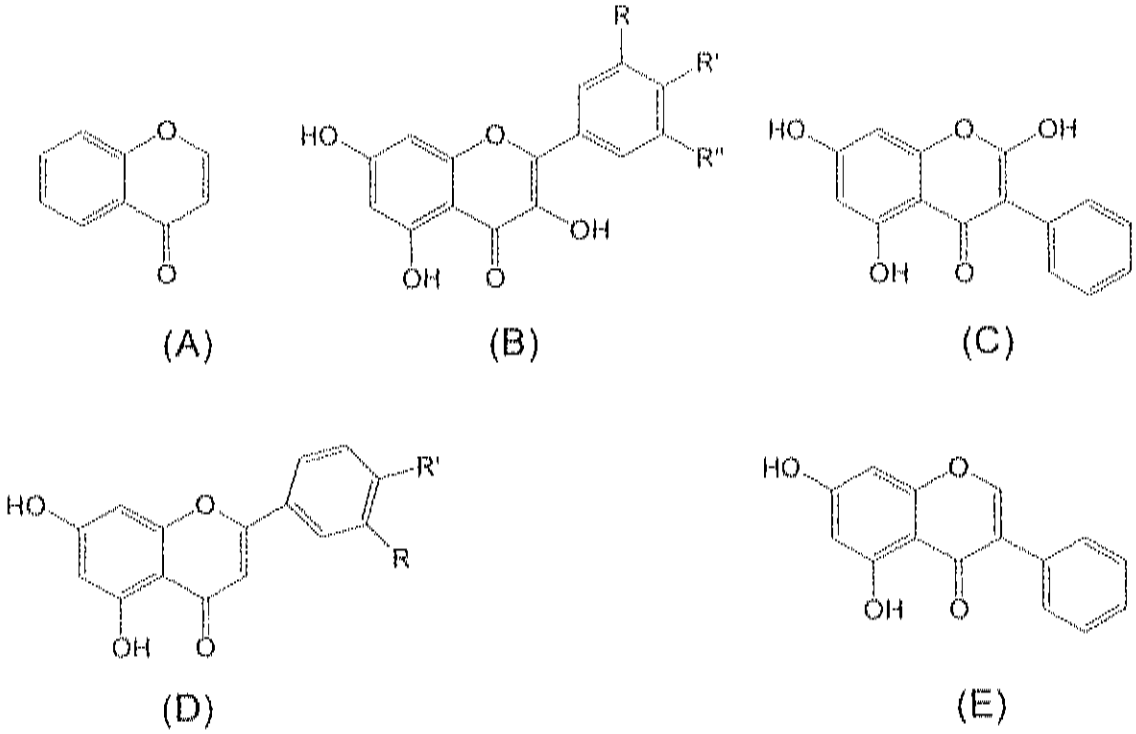


Figura 1. Estructura química de algunos flavonoides. **(A)** Benzo-γ-pirona. **(B)** Flavonoles, ejemplos; kaempferol, R-H, R'-OH, R''-OH, quercetina, R-OH, R'-OH. **(C)** Isoflavonoles. **(D)** Flavonas, ejemplos: Crisina R-H, R'-H, luteolina R-OH, R''-OH. **(E)** Isoflavonas.

Composición de propóleos de regiones templadas. Las resinas recolectadas de *Populus* spp., contienen principalmente una mezcla de flavonoides, ácidos hidroxinámicos y sus ésteres (Figura 2). En los propóleos europeos, los compuestos

fenólicos representan más de la mitad de los compuestos identificados (Farré y col., 2004); aunque existe variación entre países, los propóleos italianos y suizos muestran composiciones inusuales. En ellos se han detectado alta concentración de glicéridos fenólicos y ácidos diterpénicos y relativa escasez de compuestos fenólicos, con ausencia de compuestos típicos como pinobanksina y cafeatos (Farré y col., 2004). Los propóleos turcos contienen principalmente pinocembrina, pinobanksina, 3-O-acetato de pinobanksina, crisina, galangina, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, benzil-coumarato y ferulato, éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) y cinamilcinamato (Popova y col., 2005).

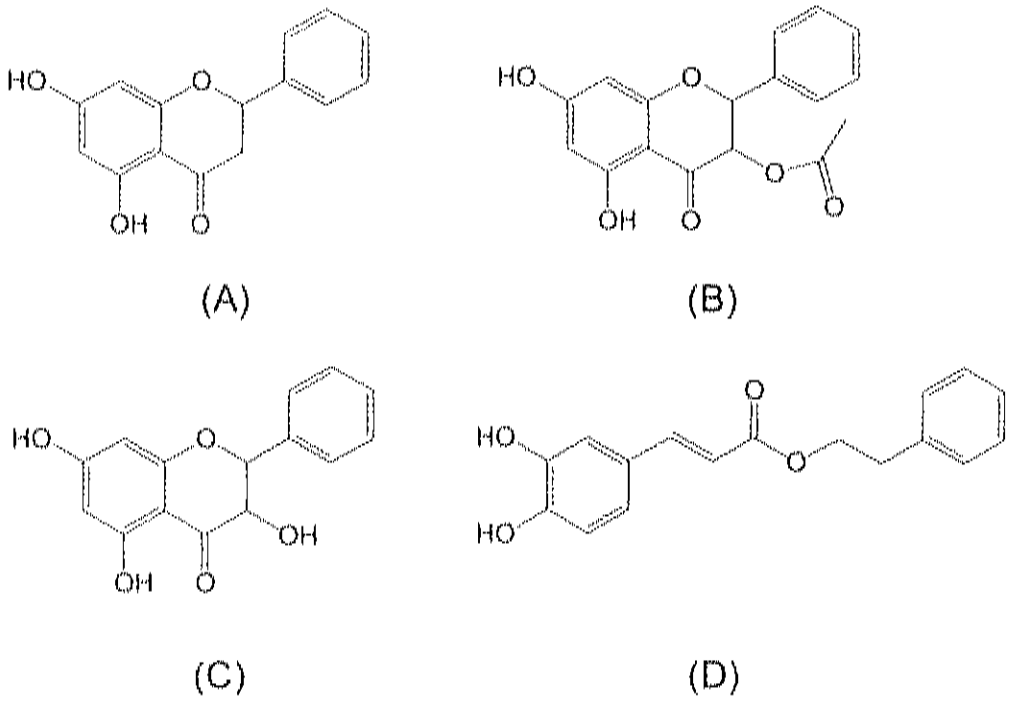


Figura 2. Estructura química de compuestos encontrados en propóleos de regiones de clima templado. (A) Pinocembrina, (B) 3-O-Acetato de Pinobanksina, (C) Pinobanksina, (D) Éster fenetílico del ácido cafeico.

Composición de propóleos de Brasil. Puesto que los flavonoides predominan en los propóleos europeos, se creyó que los de Brasil tendrían composición similar, ya que presentan efectos farmacológicos semejantes. Sin embargo, los análisis químicos de propóleos de Brasil presentan un patrón muy distinto del europeo. Los propóleos de color verde de la región suroeste contienen principalmente fenilpropanoides prenilados como los derivados prenilados del ácido cinámico. También contiene benzofuranos, mono y sesquiterpenos y flavonoides, aunque estos últimos en menor cantidad (Figura 3) (Salatino y col., 2005).

Composición de propóleos de regiones áridas. La composición química de propóleos de regiones áridas y semiáridas también es distinta a la de propóleos de regiones templadas y tropicales. Los propóleos egipcios contienen ácidos fenólicos y sus ésteres (73.8%), chalconas (8.2%), flavonoides (6.5%), ácidos alifáticos (2.4%) y derivados del tetrahidrofurano (0.7%) (Lotfy, 2006). El único reporte en relación a los propóleos del Desierto de Sonora informa como principales constituyentes los flavonoides 3'-dimetoxisudaquitín y xanthomicrol (Figura 4). Como constituyentes menores hispidulina, luteolina, nepetina, kaempferol, quercetina y ramnetina (Wollenweber y Buchmann, 1997).

Composición química de propóleos de Sonora. De propóleos de Ures, Sonora, se aislaron e identificaron los flavonoides pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina y crisina, los que provienen de especies de álamos (*Populus* spp.) (Figura 5) (Lugo-Sepúlveda, 2003). Las tablas 1 y 2 y figura 6, muestran los compuestos identificados en

los extractos metanólicos de propóleos sonorenses, así como su contenido de fenólicos totales y flavonoides (sometido a publicación).

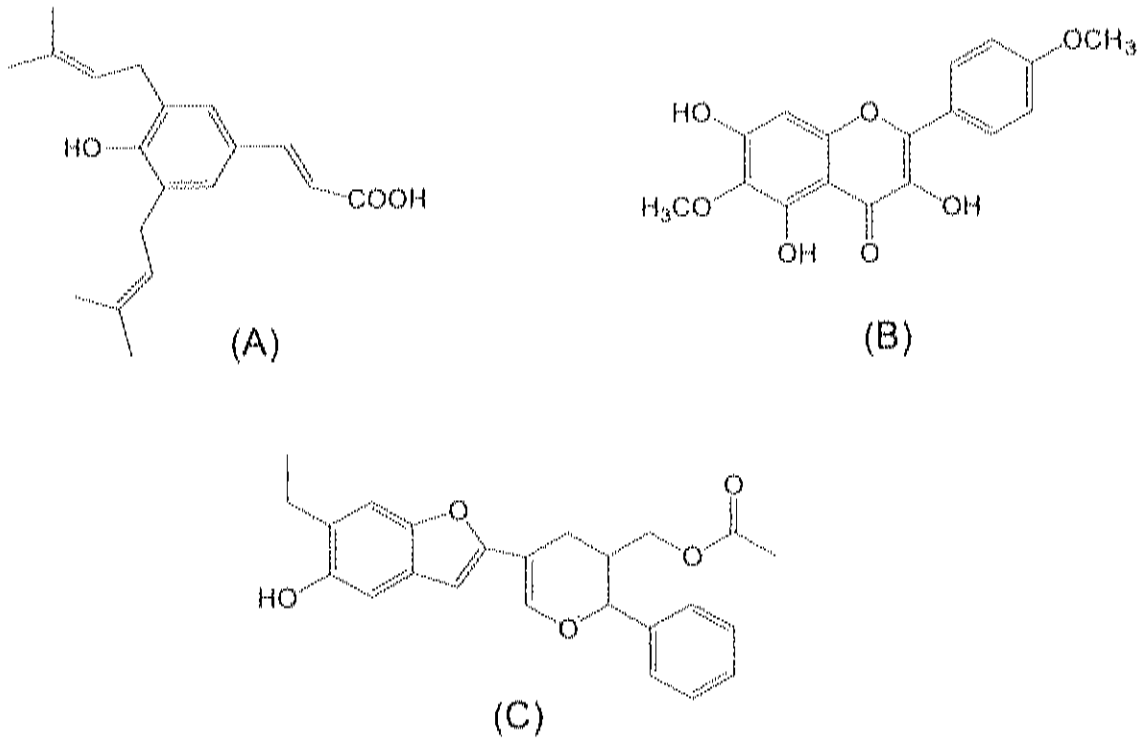


Figura 3. Estructura química de compuestos aislados de los propóleos de color verde. **(A)** Ácido 4-hidroxi-3,5-diprenil cinámico (Artepilina C). **(B)** Kaemferide. **(C)** Benzofurano.

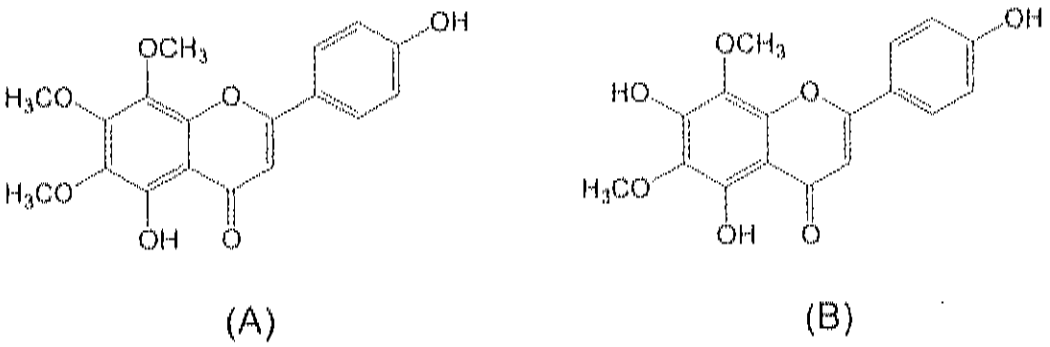
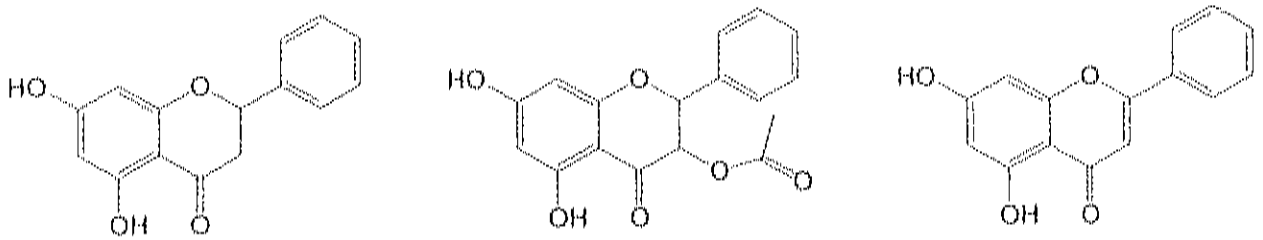


Figura 4. Estructura química de los principales compuestos aislados de los propóleos del Desierto de Sonora. **(A)** Xanthomicrol, **(B)** 3'-demetoxisudaquitín.



(A) (B) (C)

Figura 5. Estructura química de los compuestos purificados y caracterizados de los propóleos de Ures, Sonora. **(A)** pinocembrina, **(B)** 3-O-acetato de pinobanksina, **(C)** Crisina.

Tabla 1. Principales compuestos detectados e identificados por HPLC-MS en propóleos sonorenses.

TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	COMPUESTO	PU	PC	PPA
22.1	Rutina	-	-	+
29.8	Pinobanksina	+	+	+
30.9	Naringenina	-	-	+
33.1	Hesperetina	-	-	+
42.2	3'-Demetoxisudaquitin	-	+	-
46.7	Pinocembrina	+	+	+
48.6	3-Acetato de pinobanksina	+	+	+
52.3	Éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE)	+	-	-
53.0	Xanthomicrol	-	+	+
54.0	Crisina	+	+	+
55.0	Galangina	+	+	+
57.1	Acacetina	+	-	+

PC, Propóleos de Caborca
PU, Propóleos de Ures
PPA, Propóleos de Pueblo de Álamos
+, presente pero no cuantificado
-, no detectado

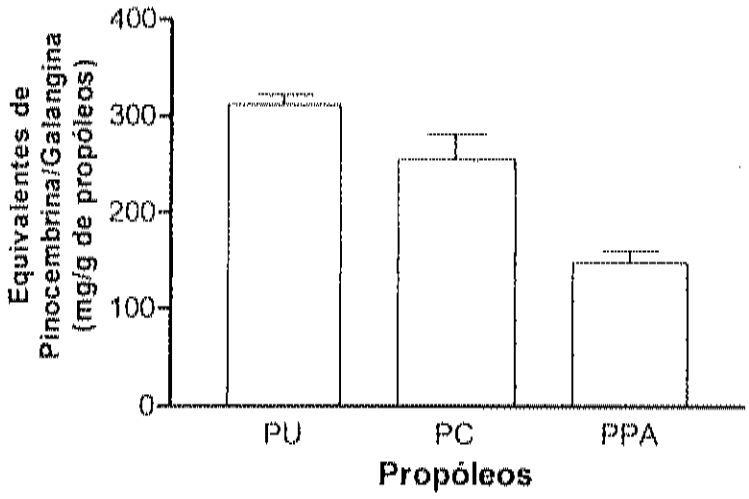


Figura 6. Contenido de fenoles totales en propóleos sonorenses. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando una mezcla de pinocembrina/galangina como estándar para la curva de calibración. PU, propóleos de Ures; PC, propóleos de Caborca; PPA, propóleos de Pueblo de Álamos. (Sometido a publicación)

Tabla 2. Contenido de favonoides y fenólicos totales en propóleos sonorenses.

	mg/g Propóleos		
Compuesto	**PU**	**PC**	**PPA**
Flavanonas y Dihidroflavonoles [a]	285.5 ± 7.4	201.1 ± 30.7	150.6 ±18.4
Flavonas y Flavonoles [b]	123.5 ± 11.2	131.2 ± 5.7	57.8 ± 3.6
Fenólicos Totales [c]	311.1 ± 10.8	255.3 ± 26.4	148.5 ± 12.1

PU, propóleos de Ures; PC, propóleos de Caborca; PPA, propóleos de Pueblo de Álamos.
[a] mg/g equivalentes de pinocembrina.
[b] mg/g equivalentes de rutina.
[c] mg/g equivalentes de pinocembrina/galangina
(Sometido a publicación)

Actividad Antibacteriana de los Extractos de Propóleos

La actividad antibacteriana de los propóleos y sus extractos ha sido bastante estudiada, observándose que son más activos contra bacterias Gram positivas que contra Gram negativas (Lotfy, 2006). En la mayoría de los casos, los compuestos fenólicos como flavonoides han sido relacionados como los principales responsables de la actividad antibacteriana (Lotfy, 2006).

Los propóleos de diversas regiones presentan actividad antibacteriana. Los propóleos de Bulgaria, Mongolia, Albania, Egipto, Brasil, e Islas Canarias presentan actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Kujumjiev y col., 1999). La actividad antibacteriana es muy similar a pesar de las diferencias en su composición química.

Propóleos de Climas Templados

Los extractos de propóleos de climas templados son los más estudiados respecto a su actividad antibacteriana. Los propóleos europeos deben su actividad antibacteriana a la presencia de algunos flavonoides como galangina, pinocembrina, pinobanksina, acetato de pinobanksina, así como a algunos ácidos y ésteres derivados del ácido cafeico (Figura 2) (Bankova, 2005). Los propóleos alemanes ricos en bencilferulato, galangina y el éster feniletílico del ácido cafeico son más activos frente a *S. aureus* y *E. coli* que el francés, rico en fenil cafeato y pinocembrina (Farré y col., 2004). Los

propóleos italianos con alto contenido en pinocembrina y galangina son activos frente a *S. pyogenes* (Bosio y col., 2003) y los de Bulgaria inhiben el desarrollo de *H. pylori* (Boyanova y col., 2003). Los propóleos turcos con alto contenido de los flavonoides pinocembrina, quercetina, naringenina, galangina y crisina son activos frente a *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Uzel y col., 2005). La actividad antibacteriana de amplio espectro de los propóleos europeos se debe principalmente a su alta concentración de flavonoides.

Los propóleos de Croacia presentan actividad bacteriostática y bactericida frente a Gram positivos y Gram negativos (Pepeljnjak y Kosalek, 2004). Los propóleos fueron activos frente a cepas de *S. aureus*, *Enterococcus* sp. y *P. aeruginosa* multirresistentes a los antibióticos, aisladas de muestras clínicas hospitalarias.

Recientemente se estudió la actividad antibacteriana de 6 propóleos de Turquía (Popova y col., 2005). Los seis propóleos mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Tres fueron más activos debido a una mayor concentración de compuestos fenólicos provenientes de *Populus nigra*. Los otros contienen en menor cantidad compuestos característicos de *Populus nigra* y de otra fuente desconocida, que aportó cinamil-cinamato y alcoholes triterpénicos.

Los propóleos de Argentina son activos principalmente contra bacterias Gram positivas (Nieva-Moreno y col., 1999). Propóleos de cuatro regiones templadas de Argentina presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. faecalis*, pero no

contra enterobacterias ni *P. aeruginosa*. No se buscaron los compuestos químicos responsables de la actividad.

Propóleos de Regiones Tropicales

Boyanova y col. (2003) informaron que los propóleos brasileños inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y negativas. Los ingredientes activos que se encontraron en estos propóleos son fenoles prenilados, diterpenos y *p*-cumarinas preniladas (Bankova, 2005). También se ensayaron los aceites esenciales presentes en los propóleos brasileños, los que mostraron ser débilmente activos frente a *Staphylococcus aureus* pero inactivos frente a *Escherichia coli* (Bankova y col., 1999). Los propóleos cubanos presentan actividad antibacteriana debido a su contenido de benzofenonas preniladas (Bankova, 2005).

Los propóleos brasileños también son activos frente a bacterias anaerobias causantes de gingivitis (Santos y col., 2002). El informe indica que los propóleos impiden el desarrollo de especies de *Actinobacillus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Eubacterium* y *Peptoestreptococcus*. Las fracciones de estos propóleos, obtenidas por cromatografía, presentan actividad antibacteriana. Unas fueron más potentes que otras debido a la distinta concentración de los compuestos activos. Sin embargo, el análisis de compuestos por cromatografía líquida de alta presión no permitió establecer una clara relación entre compuestos y actividad.

Los propóleos mexicanos de la región de Campeche también presentan actividad antibacteriana de amplio espectro (Tolosa y Cañizares, 2002). Los propóleos son activos frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antibacteriana se caracteriza por ser bacteriostática y bactericida. Las pruebas analíticas mostraron que los constituyentes de los propóleos son lactonas, flavonoides, fenoles y triterpenos, pero no se determinó su relación con la actividad antibacteriana.

Propóleos de Regiones Áridas

Los propóleos de regiones áridas o semiáridas han sido poco estudiados. Hegazi y col. (2002) analizaron dos muestras de propóleos de distintas regiones de Egipto los que fueron capaces de inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Una de las muestras presentó mayor actividad contra *Staphylococcus aureus*. Los propóleos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados señalaron que los propóleos con mayor actividad frente a *S. aureus* contienen gran cantidad del compuesto 2,6-bis-(pentaniloxi)-4-pentanilfenetanol que se encuentra ausente en los propóleos con menor actividad. La actividad anti-estafilocóccica se relacionó con la presencia de 2,6-bis-(pentaniloxi)-4-pentanilfenetanol, pero dicho compuesto no se probó directamente contra el microorganismo.

Actividad Antibacteriana de Compuestos Presentes en Propóleos.

Durante siglos, se han utilizado preparaciones que contienen flavonoides para el tratamiento de diversas enfermedades. Los extractos de la planta *Tagetes minuta*, que contienen quercetagetina-7-arabinosil-galactósido, se han utilizado para tratar infecciones. *Scutellaria baicalensis*, es una hierba utilizada en la medicina china para el tratamiento de abscesos periodontales e infecciones en la boca y la flavona baicaleina es la responsable de sus efectos antimicrobianos (Cushnie y Andrew, 2005).

Hong-Xi y Lee (2001), por el método de discodifusión, probaron la actividad antibacteriana de 28 flavonoides frente a Gram positivos y Gram negativos. Ningún flavonoide fue activo contra *Enterococcus* sp. Los flavonoides luteolina, quercetina, datiscetina y kaempferol mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus*. El flavonoide miricetina fue activo frente a *S. aureus*, *Burkholderia cepacia* y *Klebsiella pneumoniae*.

Se han purificado e identificado flavonoides con actividad antibacteriana a partir de preparaciones comerciales. Son ejemplos, la apigenina, galangina, pinocembrina, naringina, naringenina, quercetina y kaempferol. *In vivo*, la quercetina y la quercetrina protegieron a cobayos contra la infección por *Shigella*, mientras que los controles murieron. La diprenilgenisteina y soforaisoflavona inyectadas intraperitonalmente, protegieron a ratones de la infección por *S. typhimurium* (Cushnie y Lamb, 2005).

Pepeljnjak y Kosalek (2004), encontraron que el flavonoide galangina fue el principal responsable de la actividad antibacteriana de propóleos de Croacia frente a cepas hospitalarias multirresistentes a los antibióticos. La concentración mínima inhibitoria de galangina varió de 160-440 μg/mL.

Koo y col. (2002) estudiaron la actividad antibacteriana de 30 compuestos que se han detectado en los propóleos, frente a cepas de *Streptococcus mutans*. De todos los compuestos, el tt-farnesol, un sesquiterpeno, fue el más efectivo agente antibacteriano. Observaron que todas las flavanonas inhibieron el desarrollo de los microorganismos, siendo pinocembrina la de mayor actividad, seguida del flavonol 3-O-acetato de pinobanksina.

Mecanismos de Acción Antibacteriana

Existen pocos estudios para evaluar el mecanismo bioquímico de acción de compuestos presentes en los propóleos. Li-Chang y col. (2005) observaron que los propóleos de Taiwán son más activos frente a células de *Staphylococcus aureus* que se encuentran desarrollando en la fase exponencial tardía, además, un bajo pH y la temperatura de 37°C potencian su actividad. En cuanto a compuestos presentes en diversos propóleos se ha reportado que el flavonoide galangina induce una fuerte pérdida de potasio en células de *Staphylococcus aureus*, lo que sugiere un daño directo o indirecto a la membrana citoplasmática (Cushnie y Lamb, 2005). Mori y col. (1987), informaron que los flavonoides robinetina, miricetina y (-)-epigalocatequina, inhibieron la

síntesis de ADN en *Proteus vulgaris*. Otros flavonoides como quercetina, apigenina inhibieron la girasa de ADN en *Escherichia coli*. La quercetina se une a la subunidad GyrB de la girasa de ADN de *Escherichia coli* e inhibe su actividad de ATPasa (Cushnie y Lamb, 2005).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de propóleos sonorenses, así como de sus principales constituyentes.

Objetivos Particulares

1. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de propóleos (EMP).

2. Cuantificar los compuestos mayoritarios presentes en los EMP.

3. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos presentes en los EMP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de Propóleos

De junio de 2001 a febrero de 2003 se recolectaron muestras de propóleos de colmenas ubicadas en Caborca, Ures y Pueblo de Álamos, Sonora (Tabla 3). Las muestras se conservaron a -20°C y en oscuridad.

Obtención de los Extractos Metanólicos de Propóleos (EMP)

Se realizó como lo reportan Salomao y col., (2004). A cien gramos de propóleos crudos se les añadieron 300 mL de metanol grado reactivo y se dejaron reposar por 24 h a 40°C. La solución se filtró con gasa y el metanol se evaporó a presión reducida en un rotovapor. El extracto metanólico de propóleos (EMP) se secó en un horno al vacío a 40°C y posteriormente se almacenó en la oscuridad a -20°C.

Tabla 3. Sitios de recolección de las muestras de propóleos y especies de plantas predominantes.

LUGAR DE RECOLECCIÓN	COORDENADAS	PLANTAS PREDOMINANTES
Caborca	N30°46'W112°05'	*Olneya tesota, Prosopis velutina, Cercidium microphyllum, Carnegiea gigantea, Larrea tridentata, Ambrosia deltoidea, Bursera laxiflora, Encelia farinosa, Fouquieria splendes, Simmondsia chinensis*
Ures	N29°27'W110°22'	*Olneya tesota, Prosopis velutina, Populus fremontii, Cercidium microphyllum, Bursera laxiflora, Celtis palida, Guaicum coulteri, Jatropha cardiophylla, Lysiloma divaricata.*
Pueblo de Álamos	N29°15'W109°59'	*Olneya tesota, Prosopis velutina, Cercidium microphyllum, Bursera laxiflora, Celtis palida, Coursetia glandulosa, Haematoxylon brasiletto, Jatropha cardiophylla, Fouquieria macdougalli.*

(Turner y col., 1995)

Actividad Antibacteriana

Solución Concentrada de EMP y Compuestos Puros.

50 mg de EMP o compuesto puro se llevaron a un volumen final de 1 mL con dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 50,000 µg/mL.

Solución de Trabajo de EMP y Compuestos Puros.

A partir de las soluciones concentradas se realizaron diluciones en caldo de Mueller-Hinton (CMH), o caldo BHI para obtener soluciones de trabajo para los

propóleos de 400, 200, 100, 50 y 0 µg/mL y para los compuestos puros 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 mM.

Determinación de la Actividad Antibacteriana.

Se determinó utilizando el método de microdilución en caldo de Jorgensen y col., 1999. Se tomaron por triplicado 200 µL de cada una de las concentraciones de los propóleos o del compuesto puro y se depositaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano. A un conjunto de estos pozos se les adicionó el inóculo bacteriano y se prepararon otro conjunto sin bacterias. Además se prepararon tres pozos con 200 µL de caldo de cultivo conteniendo al antibiótico gentamicina (12 µg/mL), tres pozos con 200 µL de caldo de cultivo con la máxima concentración de solvente al que las bacterias estuvieron expuestas en los pozos de prueba, y tres más con caldo de cultivo como control de esterilidad. Los pozos de prueba y los controles se inocularon con 15 µL de una suspensión bacteriana previamente estandarizada. Después de la inoculación, la placa se incubó a 36°C y se leyó la densidad óptica a 630 nm (DO_{630}) de los pozos a las 0, 6,12, 24 y 48 h. Con las lecturas se realizaron curvas de desarrollo bacteriano, graficando tiempo vs DO_{630}.

Concentración Minima Inhibitoria 90% (MIC_{90}).

Se define como la concentración más baja de propóleos o compuesto que inhibe al menos el 90% (DO) del desarrollo bacteriano después de 24 h a 36°C, para lo cual

aplicamos la siguiente fórmula: (DO_{630} bacterias sin tratamiento - DO_{630} concentración de prueba) / DO_{630} bacterias sin tratamiento x 100 ≥ 90 % (Baizman y col., 2000).

Inóculo Bacteriano.

Se preparó en solución salina estéril, a partir de un desarrollo de 12 horas en agar Mueller-Hinton o agar BHI, hasta lograr una densidad óptica de 0.095 ± 0.002, igual a la lectura de DO del estándar 0.5 del nefelómetro de MacFarland a 630 nm. El inóculo equivale a 10^6 UFC/mL (Jorgensen y col., 1999). Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BioRad-Benchmark.

Compuestos Puros

Rutina, naringenina, hesperetina, crisina, galangina y acacetina fueron adquiridos de INDOFINE Chemical Co., Inc. USA. El Xanthomicrol fue donado por el IMSS-Unidad de Investigación en Herbolaria y Productos Naturales, Ciudad de México. Pinocembrina y 3-O-acetato de pinobanksina, fueron provistos por el Laboratorio de Biopolímeros del CIAD A.C. El CAPE fue sintetizado por el Laboratorio de Biopolímeros del CIAD A.C., por el método de Grunberger (1988).

Cepas Bacterianas.

Se ensayaron las cepas de colección: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, 29213 y 25923, *Enterococcus faecalis* 29212, *Listeria monocytogenes* 7644,

Escherichia coli 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Además se probaron 10 aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, donadas por el laboratorio clínico del Hospital Infantil del Estado de Sonora (Tabla 4).

Tabla 4. Características de las cepas clínicas de *S. aureus*.

CEPA	Aislada de	Resistencia a
S. aureus 1	Absceso	Am[‡]
S. aureus 2	Faringe	Am[‡]
S. aureus 3	Herida	Am[‡]
S. aureus 4	Faringe	Am[‡], E*, L**, S[†], Am/C[††]
S. aureus 5	Faringe	Am[‡]
S. aureus 6	Faringe	Am[‡], L**
S. aureus 7	Faringe	Am[‡]
S. aureus 8	Faringe	L**
S. aureus 9	Sangre	Am[‡], E*,L**, Am/C[††]
S. aureus 10	Sangre	Am[‡]

[‡] Ampicilina * Eritromicina ** Lincomicina [†] Estreptomicina
[††] Amoxicilina/clavulanato

Cuantificación de Compuestos Identificados en los EMP.

Para la cuantificación de los principales constituyentes de los EMP se realizaron curvas de calibración a partir de cromatogramas obtenidos por HPLC, utilizando estándares auténticos, excepto para el caso de pinobanksina, la que fue cuantificada como equivalentes de 3-O-acetato de pinobanksina. Los EMP y los estándares se disolvieron en metanol (5 mg/mL) y se filtraron antes de inyectar 20 μL en el sistema de

HPLC. Los resultados se expresaron como las medias y desviaciones estándar de análisis triplicados para cada muestra. El análisis se realizó en un equipo de HPLC Varian ProStar 320 (Serie Polaris), equipado con una bomba binaria Varian ProStar 210 y un detector Varian ProStar UV-Vis. Los compuestos se detectaron por su absorción a 340 nm. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando como fase móvil un gradiente de ácido fórmico 5% (A)/metanol (B). El gradiente se programó con 30% de B por 0-15 min, 40% de B por 15-20 min, 45% de B por (20-30 min), 60 % de B por 30-50 min, 80% de B por 50-65 min y 100% de B por 65-75 min. Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4mm, 5 mm).

Análisis Estadístico

Se realizó estadística descriptiva. Las medias y las desviaciones estándar de las lecturas de DO en las curvas de desarrollo se graficaron utilizando el paquete Graph Pad Prism V 3.02.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevos medicamentos a partir de productos naturales ha probado ser una estrategia exitosa. Setenta y ocho por ciento de los nuevos antibióticos y 61 % de los nuevos medicamentos anticancerígenos, aprobados de 1983 a 1994, por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos y otras instituciones, son productos naturales o derivados de productos naturales (Koo y col, 2002). En ese

contexto, los propóleos, un producto natural con gran quimiodiversidad y relativamente poco estudiado, representa un recurso de gran valor para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Este es el primer estudio conducido para evaluar la actividad antibacteriana de propóleos originados en el noroeste de México. La muestra de propóleos de Caborca proviene de una región árida, mientras que las de Ures y Pueblo de Álamos provienen de regiones semiáridas, aunque la región de Ures se encuentra cercana al cauce del Río Sonora. Se ha establecido que la actividad biológica de los propóleos es un reflejo de las características cualitativas y cuantitativas de sus constituyentes, las que difieren de región en región (Li-Chang y col, 2003).

Actividad Antibacteriana de los EMP

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de tres muestras de propóleos del estado de Sonora frente a bacterias Gram positivas, *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* y Gram negativas, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El propóleos de Ures (PU) inhibió el desarrollo de cepas de *S. aureus*, con un efecto dosis respuesta (Figuras 7 y 8) (Tabla 5). PU, también inhibió el desarrollo de *L. monocytogenes* con una MIC_{90} de 400 μg/mL y mostró efecto bacteriostático durante 6 h frente a *E. faecalis*

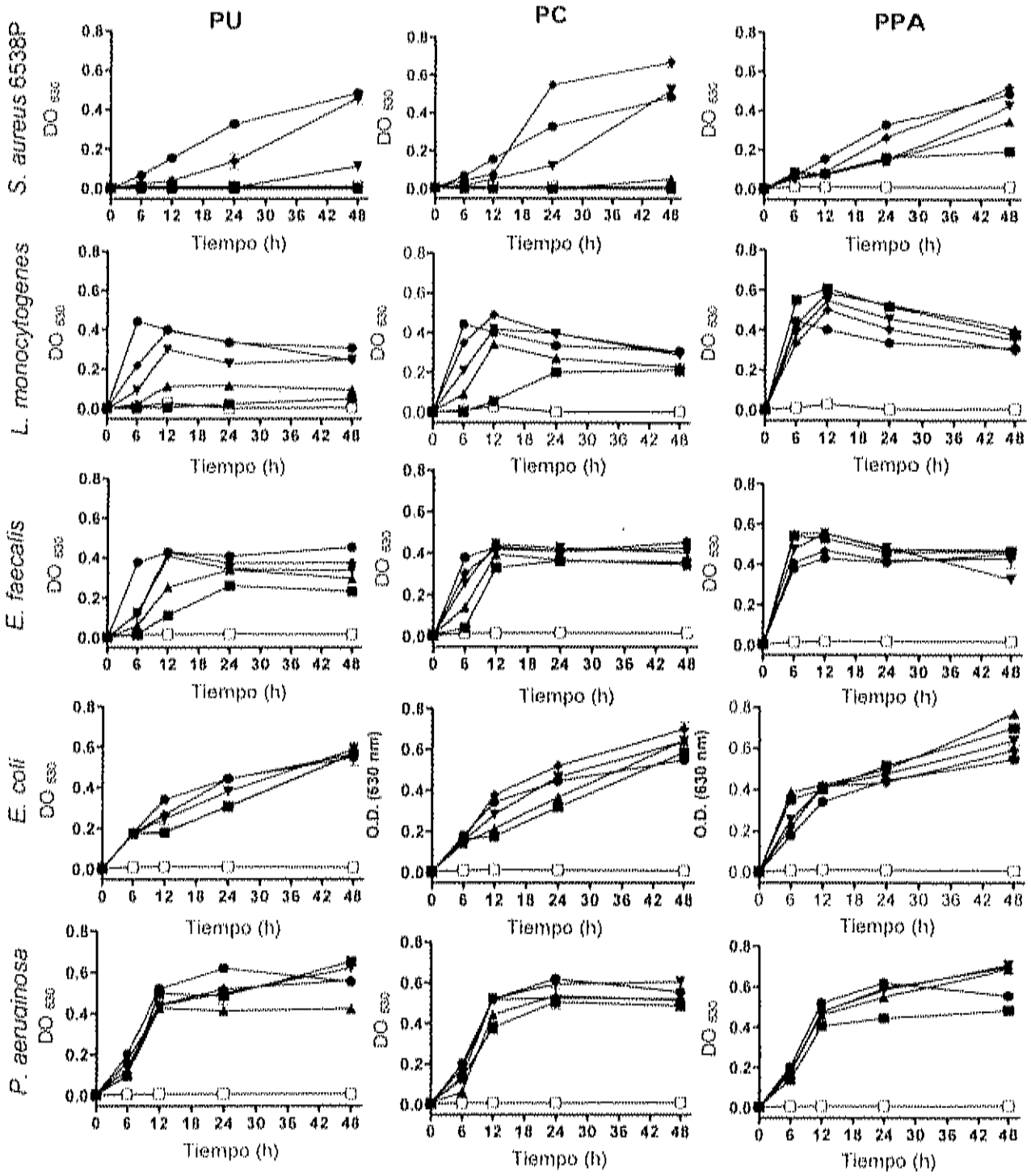


Figura 7. Actividad antibacteriana de propóleos de Sonora, PU, CP y PPA frente a cultivos bacterianos tratados con diferentes dosis de propóleos durante 48 h. (■) 400 µg/mL, (▲) 200 µg/mL, (▼) 100 µg/mL, (♦) 50 µg/mL, (●) 0.0 µg/mL, (□) gentamicina. El cultivo control contenía dimetil sulfóxido (0.2%-0.8%). El antibiótico gentamicina (12 µg/mL) se utilizó como control de inhibición del desarrollo. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media ± desviación estándar de análisis triplicados.

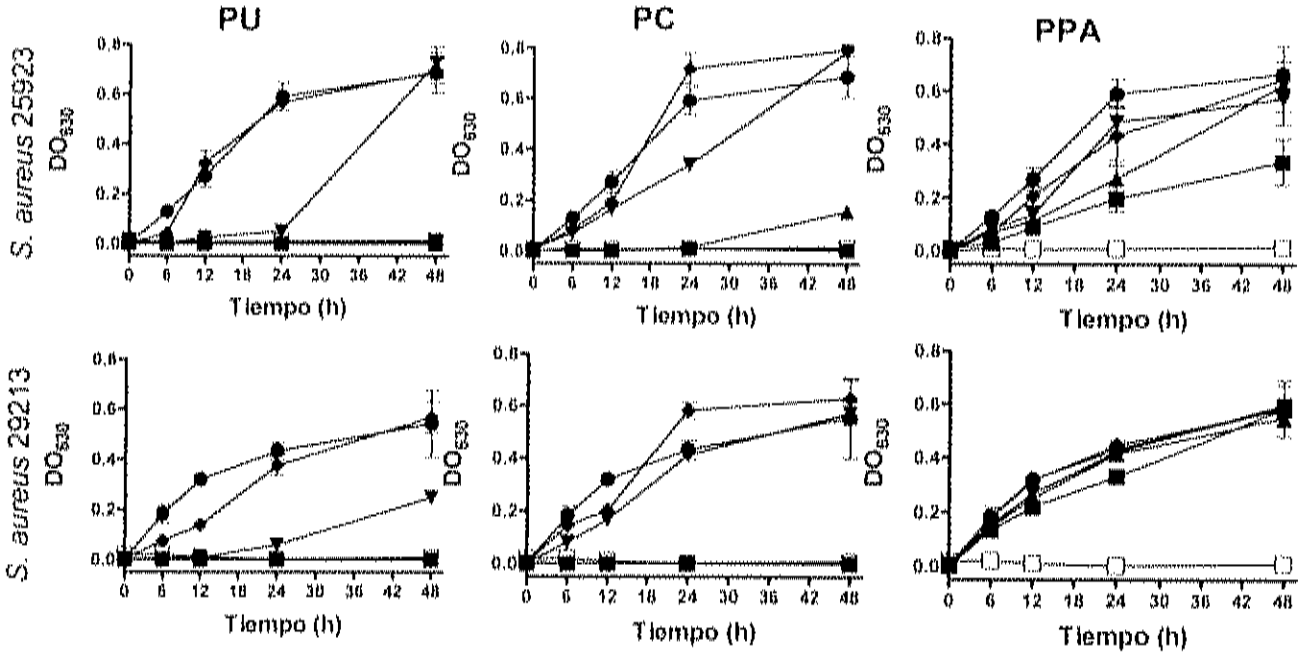


Figura 8. Desarrollo de las cepas *S. aureus* 25923 y 29213 tratadas con diferentes dosis de propóleos durante 48 h. (■) 400 μg/mL, (▲) 200 μg/mL, (▼) 100 μg/mL, (♦) 50 μg/mL, (●) 0.0 μg/mL, (□) gentamicina (12 μg/mL). El cultivo control incluyó dimetil sulfóxido (0.6%). Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media ± desviación estándar de análisis triplicados.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria 90% (MIC_{90}) (μg/mL) de los EMP frente a cepas de colección.

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

El propóleos de Caborca también inhibió el desarrollo de *S. aureus* durante 48 h con una MIC_{90} de 200 μg/mL. *L. monocytogenes* resultó inhibida en su desarrollo por PC durante 12 h (400 μg/mL) y *E. faecalis* durante 6 h (400 μg/mL). A las 24 y 48 h de incubación, PPA fue incapaz de inhibir más del 90% del desarrollo bacteriano de cualquiera de las cepas probadas y a las concentraciones ensayadas. En cada uno de los ensayos, la más alta concentración de DMSO presente en el medio de cultivo, no afectó el desarrollo bacteriano. Los propóleos de Ures y de Caborca también inhibieron el desarrollo de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas (MIC_{90} de 200 y 400 μg/mL, respectivamente), las cuales presentan resistencia al menos un antibiótico (Tabla 6, Figura 9).

Las muestras de propóleos de Ures y Caborca presentaron una fuerte actividad antibacteriana, principalmente contra las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*. Una gran cantidad de reportes indican que los extractos de propóleos presentan mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (Kujumgiev y col. 1999; Pepeljnjak y Kosalec 2004; Uzel y col. 2005). Se ha sugerido que el lipopolisacárido, presente únicamente en bacterias Gram negativas, puede ser una barrera que impida la actividad de los compuestos antibacterianos presentes en los propóleos (Cushnie y Lamb, 2005).

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria 90% (MIC_{90}) de propóleos de Sonora frente a cepas de origen clínico.

CEPA	MIC (µg/mL)		
S. aureus	PROPÓLEOS		
	URES	CABORCA	P. ÁLAMOS
1	200	400	> 400
2	200	400	> 400
3	200	400	> 400
4	200	400	> 400
5	200	400	> 400
6	200	400	> 400
7	200	400	> 400
8	200	400	> 400
9	200	400	> 400
10	200	400	> 400

La actividad antimicrobiana de los propóleos, ha sido atribuida a la presencia de diversos fitoquímicos, que incluyen compuestos polifenólicos de tipo flavonoides, como pinocembrina y galangina (Banskota 2001; Pepeljnjak y Kosalec 2004). La presencia de estos flavonoides fue detectada en las tres muestras de propóleos evaluadas en el presente estudio (Tabla 1). La concentración descendente de fenólicos totales, flavanonas y dihidroflavonoles de PU, en relación a PC y PPA, coincide con el nivel de actividad antibacteriana mostrada por estas tres muestras (Tabla 2, Figura 7).

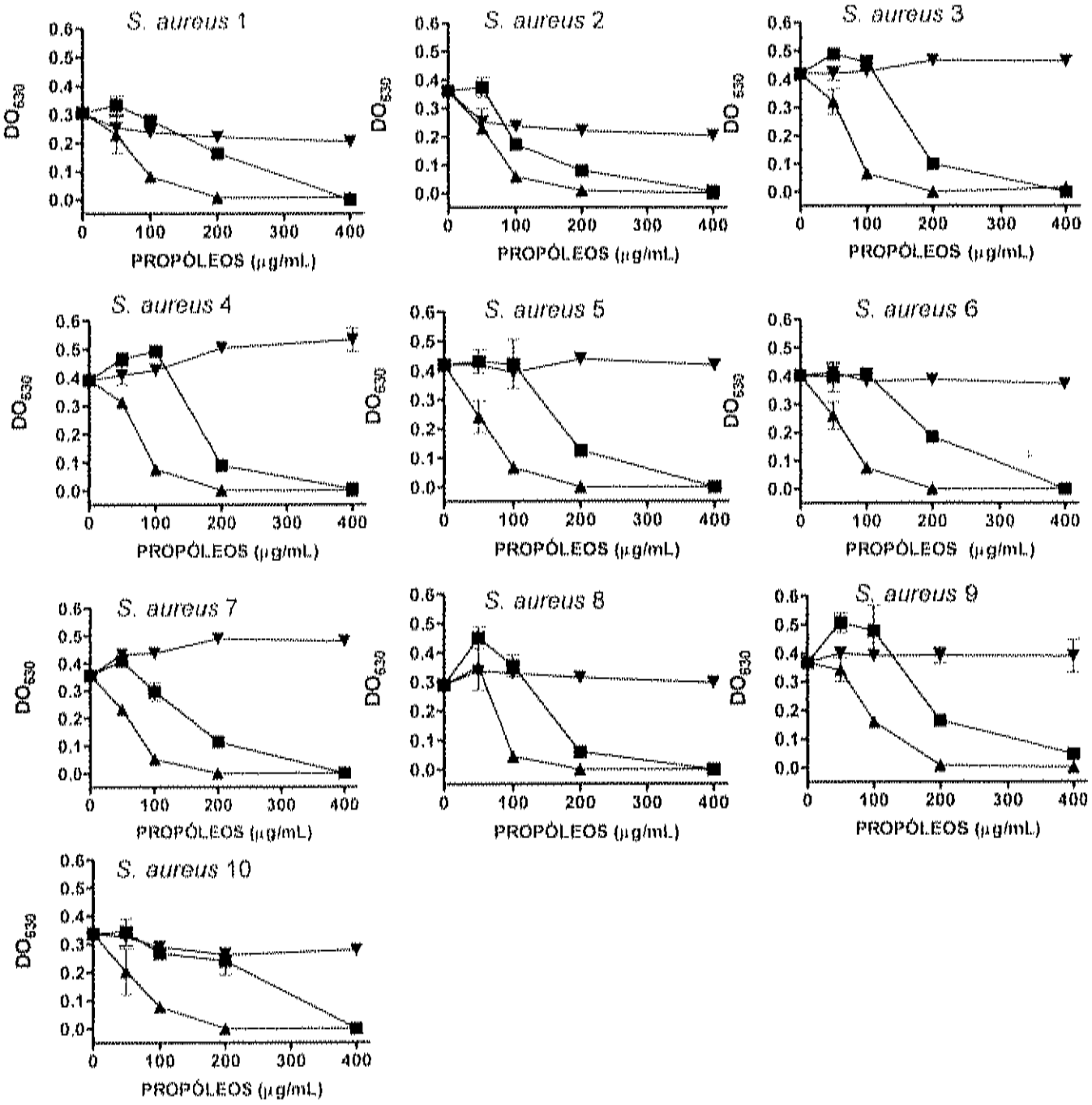


Figura 9. Densidad óptica del desarrollo de cepas clínicas de *S. aureus* que fueron tratadas con distintas concentraciones de propóleos, después de 24 h de incubación. (■) PC, (▲) PU, (▼) PPA.

Varios investigadores han sugerido que la actividad antimicrobiana de los propóleos es multifactorial y depende del sinergismo entre algunos flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos presentes en ellos (Li-Chang y col, 2003). El mecanismo de acción de la actividad antimicrobiana no se ha establecido, pero algunos estudios sugieren como probables causas la inactivación del potencial de membrana, inhibición de la RNA polimerasa, desorganización del citoplasma y de la pared celular e inhibición de la síntesis de proteínas (Pepeljnjak y Kosalec, 2004).

Las diferencias observadas en la actividad antibacteriana de los propóleos de distintas regiones, puede ser debida a diferencias cualitativas y cuantitativas en su composición química, además de diferencias metodológicas para evaluar la actividad (Cushnie y Andrew, 2005). Se han reportado MIC_{90} de 650-5,680 μg/mL de propóleos de Croacia sobre cepas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas, sensibles y resistentes al antibiótico meticilina (Tabla 7) (Pepeljnjak y Kosalec, 2004).

Tabla 7. Informes de concentración mínima inhibitoria (MIC) de propóleos de distintas regiones y los obtenidos en el presente trabajo.

	ESPECIE BACTERIANA MIC (µg/mL)					
ORIGEN DE LOS PROPÓLEOS	***S. aureus***	***E. faecalis***	***Listeria monocytogenes***	***E. coli***	***P. aeruginosa***	**REFERENCIA**
Egipto	2,200-2,600	-	-	1,460-1,600	-	Hegazi y col., 2002
Croacia	650-5,680	2,330-9,090	-	-	7,600-14,100	Pepeljnjak y Kosalec, 2004
Bulgaria	102-409	-	-	-	-	Salomao y col., 2004
Brasil	1,638-6,553					
Turquía	8-16	2-32	-	16-128	32-256	Uzel y col., 2005
Turquía	117-468	-	-	1,875-7,500	3,750-7,500	Silici y Kutluca, 2005
Taiwán	<3.75-15.0	-	-	-	-	Li-Chang y col., 2005
Taiwán	-	-	7.5	-	-	Hsin-Yi y col., 2006
Sonora, México	100-400	>400	400 - >400	>400	>400	Aceptado para publicación

- No evaluado

Cuantificación de los Compuestos Mayoritarios Identificados en los EMP

La tabla 8 muestra el análisis cuantitativo de los compuestos identificados en los EMP. El constituyente más abundante fue pinocembrina, seguido de 3-O-acetato de pinobanksina y crisina. La alta concentración de estos compuestos en PU sugiere que se origina principalmente de *Populus fremontii* (Bankova y col., 2000). Además, el CAPE ha sido detectado principalmente en propóleos de regiones templadas (Fesen y col., 1994). El flavonoide naringenina, segundo en concentración después de pinocembrina y exclusivo en PPA, sugiere que éste último se origina de flora nativa de la región.

Actividad Antibacteriana de Compuestos Identificados en los EMP

En un estudio previo, se detectó la presencia de 12 compuestos en las muestras de propóleos utilizando HPLC-MS (Tabla 1) (Sometido a publicación). Con el fin de conocer cuáles de los compuestos participan en la actividad antibacteriana de las muestras de propóleos, se evaluó la actividad de cada uno de ellos, excepto pinobanksina y 3'-demetoxisudaquitin. El éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE), pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina y naringenina mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* 6538P, a concentraciones de 0.8 mM o menos (Figura 10). Ninguno de los otros compuestos lograron inhibir más del 90% del desarrollo de *S.*

aureus 6538P, ni de *E. coli*, a ninguna de las concentraciones probadas (Figuras 11 y 12).

Tabla 8. Cuantificación de compuestos identificados en propóleos Sonorenses, utilizando HPLC-RP (mg/g de propóleos).

Compuesto	Propóleos		
	PU	PC	PPA
Rutina	0.0	0.0	4.1 ± 0.01
Pinobanksina	11.3 ±0 .06	7.8 ± 0 .06	9.6, ± 0 ,14
Naringenina	0.0	0.0	21.9 ± 0.13
Hesperetina	0.0	0.0	3.7 ± 0.03
3'-demetoxisudaquitin	0.0	N.D.	0.0
Pinocembrina	218.4 ± 1.48	60.6 ± 1.21	62.7 ± 1.25
3-O-acetato de pinobanksina	115.1 ± 1.45	26.7 ± 1.96	5.5 ± 0.19
Ester fenetílico del ácido cafeico (CAPE)	11.4 ± 0.46	0.0	0.0
Xanthomicrol	0.0	9.4 ± 0.44	3.4 ± 0.19
Crisina	58.9 ± 0.63	11.4 ± 0.75	6.3 ± 0.08
Galangina	8.0 ± 0.67	9.2 ± 0.60	2.9 ± 0.07
Acacetina	9.2 ± 0.69	0.0	5.8 ± 0.07

[a]Los resultados representan la media y la desviación estándar de ensayos por triplicado.
N.D. No determinado.
PU, Propóleos de Ures
PC, Propóleos de Caborca
PPA, Propóleos de Pueblo de Álamos

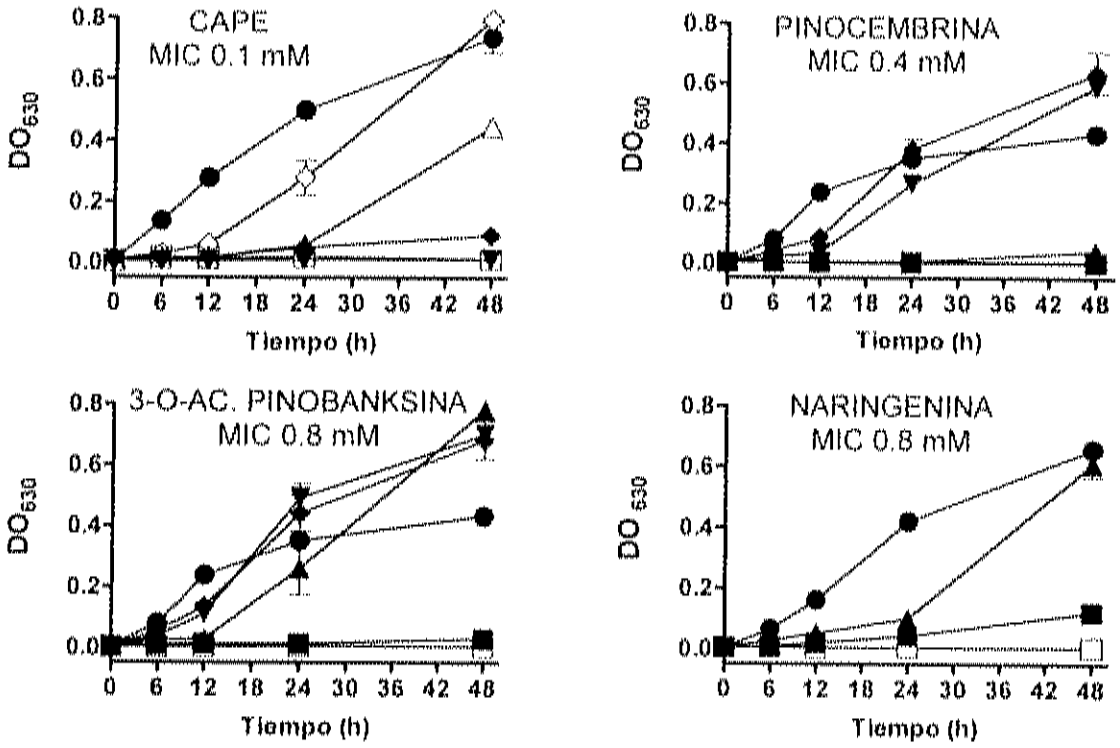


Figura 10. Curvas de desarrollo de *S. aureus* 6538P frente a compuestos presentes en las muestras de propóleos. Los cultivos fueron tratados con diferentes dosis (0.0-0.8 mM) de CAPE, pinocembrina, 3-O-Acetato de Pinobanksina y naringenina durante 48 h. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (▼) 0.2 mM, (♦) 0.1 mM, (Δ) 0.05 mM, (◊) 0.025 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).

El flavonoide hesperetina, a la concentración de 0.8 mM, mostró actividad contra *S. aureus* 6538P muy cercana a una $MIC_{90\%}$ (Figura 11). También se evaluó la actividad antibacteriana del CAPE frente a las cepas de *S. aureus* de origen clínico. El CAPE mostró una fuerte actividad frente a cada una de las cepas con una $MIC_{90\%}$ de 0.1 mM (Figura 13).

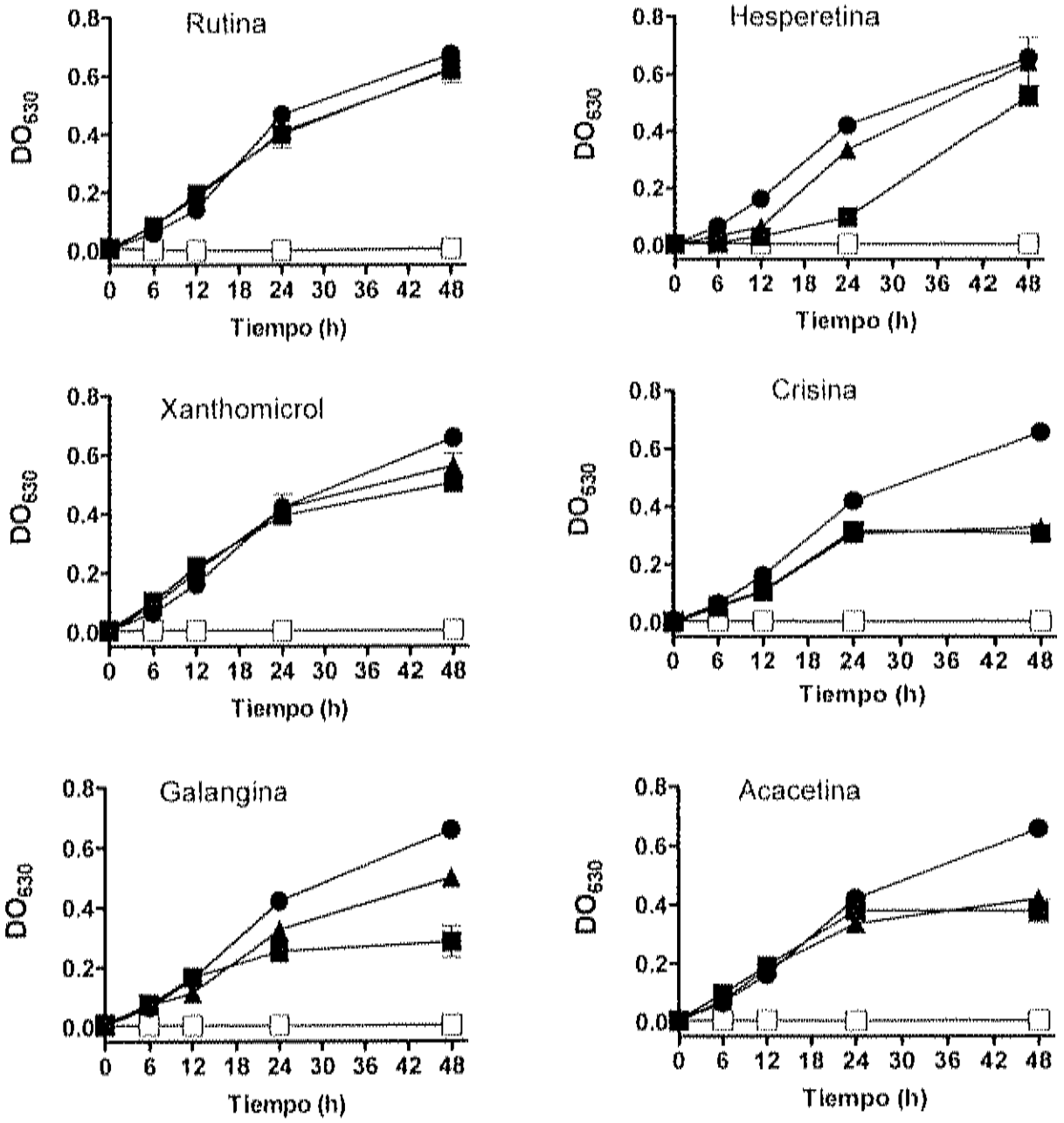


Figura 11. Curvas de desarrollo de *S. aureus* 6538P frente a diferentes dosis de compuestos presentes en las muestras de propóleos. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).

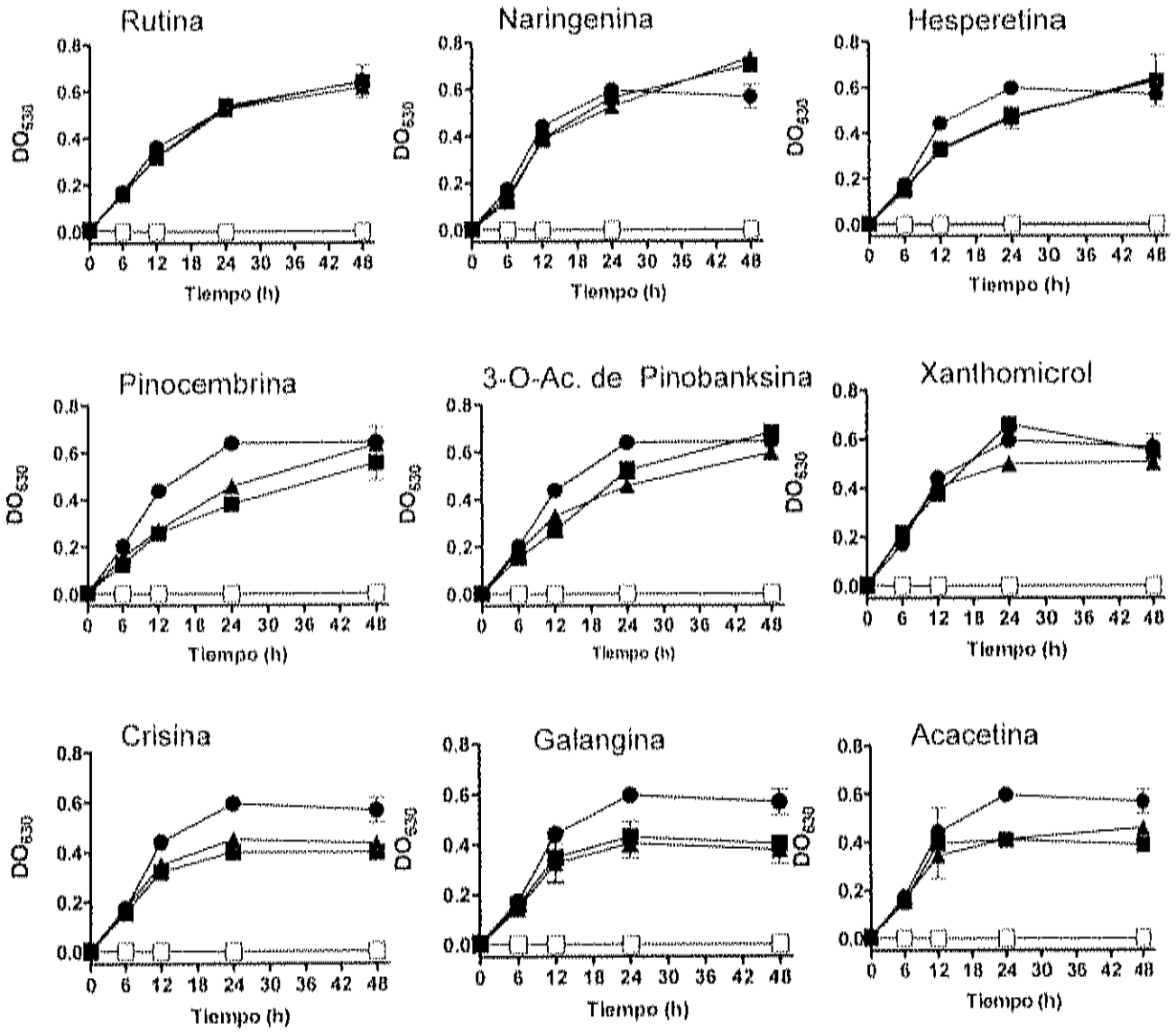


Figura 12. Curvas de desarrollo de *E. coli* 25922 frente a diferentes dosis de compuestos presentes en las muestras de propóleos. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).

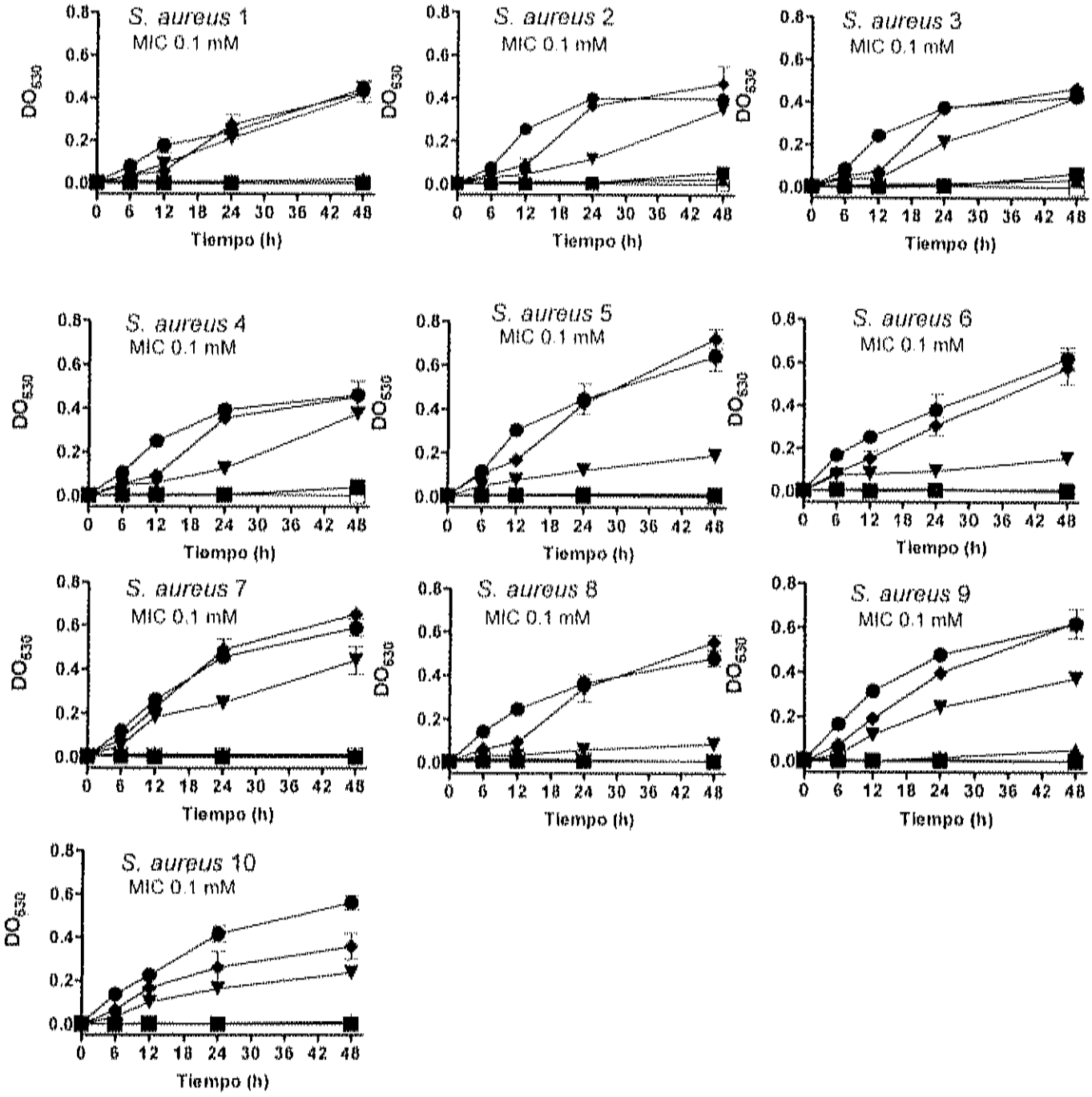


Figura 13. Curvas de desarrollo de las cepas clínicas de *S. aureus*. Los cultivos fueron tratados con diferentes dosis (0.0-0.4 mM) de CAPE durante 48 h. (■) 0.4 mM, (▲) 0.2 mM, (▼) 0.1 mM, (♦) 0.05 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).

Puesto que el CAPE presentó la mayor actividad antibacteriana contra *S. aureus*, se evaluó su actividad frente al resto de las cepas de catálogo (Figura 14). El CAPE logró inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* y *E. faecalis* a una concentración de 0.4 mM. En cuanto a los bacilos Gram negativos, el CAPE (0.8 mM) inhibió el desarrollo de *E. coli* solo por 6 h, mientras que *P. aeruginosa* no resultó afectada en su desarrollo por ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 14).

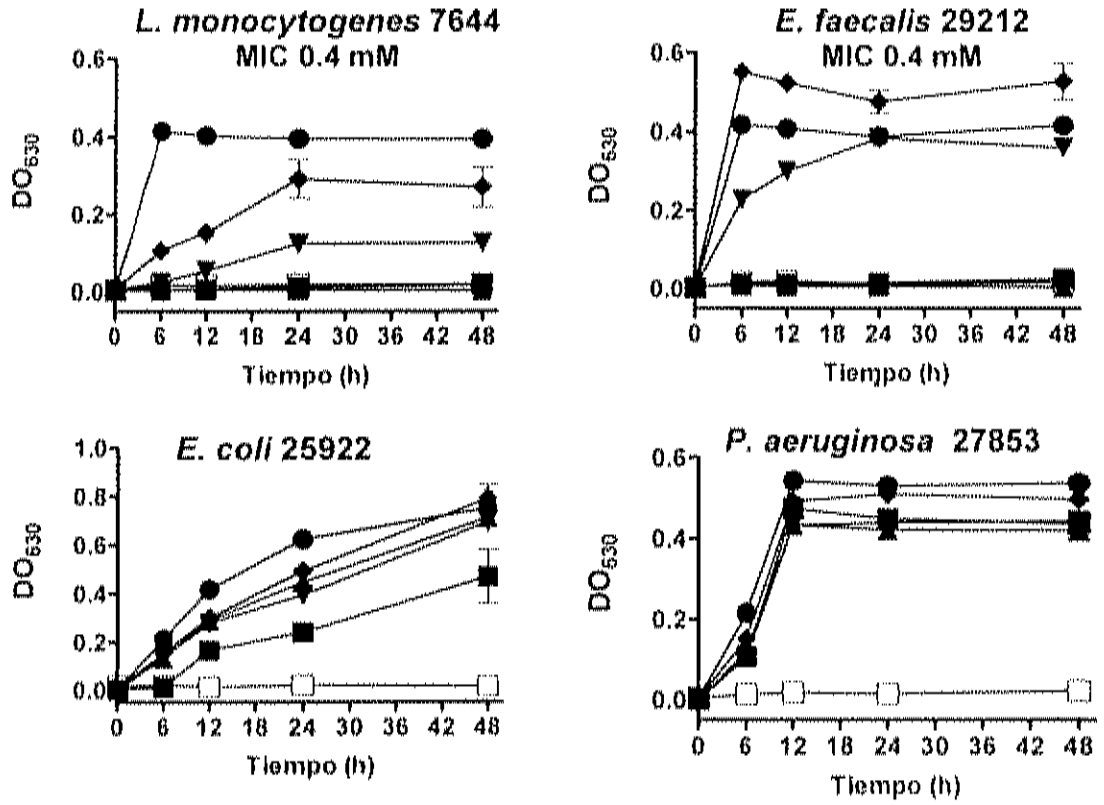


Figura 14. Efecto antibacteriano del CAPE sobre el desarrollo de cepas de colección. Los microorganismos se hicieron desarrollar en presencia de distintas concentraciones de CAPE durante 48 h. (■) 0.8 mM, (▲) 0.4 mM, (▼) 0.2 mM, (♦) 0.1 mM, (Δ) 0.05 mM, (◊) 0.025 mM, (●) 0.0 mM, (□) gentamicina (12 μg/mL).

El CAPE es un compuesto purificado de los propóleos y descrito por primera vez por Grunberger y col. (1988). Es conocido por presentar muy diversa actividad biológica. Su actividad antioxidante y antiinflamatoria, fue descrita por Sud'ina y col., (1993). El CAPE inhibe la enzima 5-lipooxigenasa, bloqueado la vía metabólica para la síntesis del ácido araquidónico y consecuentemente, disminuye la inflamación. El CAPE también inhibe la enzima ciclooxigenasa-2, tanto in Vitro como en un modelo murino, impidiendo la síntesis de prostaglandinas, bloqueando el proceso inflamatorio iniciado por esta vía (Michaluart y col, 1999; Okutan y col, 2005). Se ha informado su actividad antiviral; el CAPE es capaz de inhibir la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Fesen y col, 1994; Chuan-Chen y col, 2005). También presenta actividad antitumor e inhibe la angiogénesis, la metástasis (Hui-Fen y col, 2003; Wang y col, 2005; Xiang y col, 2006) y es regulador de la respuesta inmune (Natarajan y col, 1996); pero no se encontraron reportes en relación a su actividad antibacteriana.

El CAPE sólo fue detectado en la muestra de propóleos de Ures, la que presentó la menor MIC frente a *S. aureus*, y la única muestra que inhibió el desarrollo de *L. monocytogenes* (MIC 400 μg/mL). A diferencia de los extractos metanólicos de propóleos, el CAPE logró inhibir el desarrollo de *E. faecalis* con una MIC de 0.4 mM.

Diversos reportes señalan a pinocembrina como uno de los compuestos responsables de la actividad antibacteriana de los EMP (Uzel y col, 2005). Koo y col. (2002), informaron una MIC_{90} de 0.25 mM para pinocembrina y de 0.5 mM para 3-O-acetato de pinobanksina frente a cepas de *Streptococcus* Viridans, muy cercanas a lo

observado en este trabajo frente a cepas de *S. aureus*. Koo y col. (2002) no reportan actividad antibacteriana de los flavonoles galangina y rutina, ni de las flavonas acacetina y crisina. Pepeljnjak y Kosalec (2004), reportan actividad antibacteriana de galangina frente a cepas de *S. aureus* (MIC 160-440 μg/mL), *Enterococcus* sp. (MIC 240 μg/mL) y *P. aeruginosa* (MIC 170 μg/mL), aunque ellos evaluaron una $MIC_{80\%}$. Los flavonoides pinocembrina y 3-O-acetato de pinobanksina fueron detectados en las tres muestras de propóleos, a diferencia de naringenina, la cual se encontró únicamente en el propóleos de Pueblo de Álamos (Tabla 1).

En comparación con los otros propóleos, el propóleos de Ures presentó una muy alta concentración de pinocembrina y 3-O-acetato de pinobanksina, lo que en conjunto con la presencia de CAPE, podría explicar su actividad antibacteriana (Tabla 8). En cuanto a la actividad antibacteriana de los propóleos de Caborca, puede deberse a la alta concentración del flavonoide 3-O-acetato de pinobanksina (Tabla 8). PPA presentó igual concentración de pinocembrina en relación a PC, pero 5 veces menos de 3-O-acetato de pinobanksina.

Bankova (2005), sostiene que no es posible suscribir la actividad antibacteriana de los propóleos solamente a un compuesto; propone que una mayor concentración de grupos de compuestos activos con igual o semejante estructura química, se correlaciona con un aumento en la actividad biológica. Su tesis se fundamenta en estudios que demuestran que al aumentar la concentración de fenólicos totales, aumenta la actividad biológica de los propóleos. Por lo que sugiere cuantificar grupos

de compuestos semejantes, más que la cuantificación de componentes individuales. En el presente estudio, los propóleos de Ures y Caborca, son los que presentaron la más alta concentración de fenólicos totales (Figura 6, Tabla 2).

CONCLUSIONES

A las concentraciones ensayadas, sólo PU y PC mostraron actividad antibacteriana principalmente contra *S. aureus*. PU logró inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* con una MIC de 400 μg/mL.

A las concentraciones probadas, ningún EMP inhibió el desarrollo (MIC 90%) de *E. coli y P. aeruginosa*.

Los constituyentes identificados que se encontraron en mayor cantidad en los propóleos fueron los flavonoides pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina y crisina.

CAPE, pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina y naringenina inhibieron el desarrollo de S. *aureus* 6538P. De los compuestos detectados en las muestras de propóleos, el CAPE logró inhibir el desarrollo bacteriano a una menor concentración.

CAPE inhibió el desarrollo de *L. monocytogenes y E. faecalis* (MIC_{90} 0.4 mM), pero fue incapaz de inhibir el desarrollo de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

A las concentraciones probadas, ninguno de los siguientes compuestos presentó actividad antibacteriana frente a *S. aureus* 6538P y *E. coli* 25922: rutina, crisina,

hesperetina, xanthomicrol, galangina y acacetina. Pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina y naringenina no inhibieron el desarrollo de *E. coli* 25922 a ninguna de las concentraciones ensayadas.

BIBLIOGRAFÍA

Baizman ER, Branstrom AA, Longley CB, Allanson N, Sofia MJ, Gange D, and Goldman RC. Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. Microbiology-(UK) **2000**; 146: 3129-3140.

Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. eCAM **2005**; 2:29-32.

Bankova V, Christov R, Popov S, Marchicci MC, Tsvetkova I, Kujumgiev A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. Fitoterapia **1999**; 70:190-193.

Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie **2000**; 31:3-15.

Banskota AH, Tezuka Y, and Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytother Res **2001**; 15:561-571.

Becker D, Selbach M, Rollenhagen C, Ballmaier M, Meyer TF, Mann M, Bumann D. Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. Nature **2006**; 440:303-307.

Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. *In Vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. Letters Applied Microbiol **2003**; 31:174-177.

Boyanova L, Derejian S, Koumanova R, Katsarov N, Gergova G, Mitov I, Nikolov R, Krastev Z. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth *in vitro* by Bulgarian propolis: preliminary report. J Med Microbiology **2003**; 52:417-419.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chem Toxicol **1998**; 36:347-363.

Cars O, Nordberg P. Antibiotic resistance, the faceless threat. Meeting at the Dag Hammarskjöld Foundation. Uppsala, Sweden, 5-7 May **2004**. Background Document.

Castaldo S, Cappasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia **2002**; 73(Suppl. 1):S1-S6.

Chuan-Chen H, Shih-Shen L, Ming-Yung Ch, Fang-Lung Ch, Chao-Chin H, Chung-Shih Ch, Guan-Yu L, Chi-Chiang Y. Effects of CAPE-like compounds on HIV replication in vitro and modulation of cytokines in vivo. J Antimicrobial Chemother **2005**; 56:372-379.

Cushnie TP, Lamb AJ. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. J Ethnopharmacology **2005**; 101:243-248.

Cushnie TPT, Andrew JL. Antimicrobial activity of flavonoids. Inter J Antimicrobial Agents **2005**; 26:343-356.

Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. J Mass Spectrometry **2004**; 39:1-5.

Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp de Quimioterapia **2003**; 16:385-393.

Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El própolis y la salud. Ars Pharmaceutica **2004**; 45:21-43.

Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (Cape) and related-compounds. Biochem Pharmacol **1994**; 48:595-608.

Finch RG. Introduction: standards of antibacterial performance. Clin Microbiol Infection **2004**; 10(Suppl. 2):1-5.

Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, and Nakanishi K. Preferential cyto-toxicity on tumor-cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. Experientia **1988**; 44:230-232.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics **2002**; 96:67-202.

Hegazi AG, Faten K, El Hady A. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. Z Naturforschung **2002**; 57c:395-402.

Hong-Xi X, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. Phytother Res **2001**; 15:39-43.

Hsin-Yi Y, Cheng-Ming Ch, Yue-Wen Ch, Cheng-Chun Ch. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. J Science Food Agriculture **2006**; 86:937-943.

Hui-Fen L, Yu-Ywan Ch, Jun-Jen L, Ming-Ling H, Hui-Ju S, Hung-Jen L, Chwen-Jen S, Ming-Shi S, Yu-Jen Ch. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. J Agricultural Food Chem **2003**; 57:7907-7912.

Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. **1999**. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. pp 1526-1543. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Jo baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (Ed). American Society for Microbiology, Washington DC, USA.

Kapil A. The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate. Indian Journal of Medical Research **2005**; 121:83-91.

Koo H. Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on Glucosyltransferase activity. Antimicrobial Agents Chemother **2002**; 46: 1302-1309.

Kujumjiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J Ethnopharmacology **1999**; 64:235-240.

Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. Chem Pharm Bull **2003**; 51:740-742.

Li-Chang L, Yue-Wen Ch, Cheng-Chun Ch. Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. J Food Drug Analysis **2003**; 11:277-282.

Li-Chang L, Yue-Wen Ch, Cheng-Chun Ch. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. Inter J Food Microbiology **2005**; 102: 213-220.

Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pacific J Cancer Prevention **2006**; 7:22-31.

Lugo-Sepúlveda RE. **2003**. Constituyentes de los propóleos sonorenses y su actividad antiproliferativa contra lineas celulares transformadas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

Menezes H. Própolis: uma revisao dos recentes estudos de suas propiedades farmacológicas. Arq Inst Biol **2005**; 72:405-411.

Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation, Cancer Res **1999**; 59:2347-2352.

Mori A, Nishino Ch, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. Phytochemistry **1987**; 26:2231-2234.

Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian J Pharmacology **2001**; 33:2-16.

Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci USA **1996**; 93:9090-9095.

Nieva-Moreno MI, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. J Ethnopharmacology **1999**; 68:97-102.

Ohnishi N, Teruyoshi Y. Interactions between medicines and functional foods of dietary supplements. Keio J Med **2004**; 53:137-150.

Okutan H, Ozcelik N, Yilmaz HR, Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. Clin Biochem **2005**; 38:191-196.

OPS. Plan de acción de salud pública para combatir la resistencia a los antimicrobianos. Rev Panam Salud Pública **2001**; 9:123-127.

Ortega-Rivas C, Ochoa-Bautista R. La producción de miel en México modernidad y tradición. Claridades Agropecuarias **2004**; 128:3-13.

Pepeljnjak S, Kosalec I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett **2004**; 240:111-116.

Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine **2005**; 12:221-8.

Sahinler N, Kaftanoglu O. Natural product propolis chemical composition. Natural Product Research **2005**; 19:183-188.

Salatino A, Weinstein-Texeira E, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. eCAM **2005**; 2:33-38.

Salomao K, Dantas AP, Borboa CM, Campos LC, Machado DG, Aquino-Neto FR, de Castro SL. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. Letters Applied Microbiol **2004**; 38:87-92.

Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA, Braga FC. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. J Ethnopharmacology **2002**; 80:1-7.

Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. J Ethnopharmacology **2005**; 99:69-73.

Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. FEBS Lett **1993**; 329:21-24.

Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica **2002**; 43:187-204.

Turner RM, Bowers JE, Burguess TL, Turner RM, Hastin JR. **1995**. Sonoran desert plants: an ecological atlas. Ed. University of Arizona Press Tucson, 1-528.

Uzel A, Sorkun K, Öncag Ö, Cogulu D, Gencay Ó, Sali B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiol Res **2005**; 189-195.

Valcic S, Montenegro G, Timmermann B. Lignans from Chilean propolis. J Natural Prod **1998**; 61: 771-775.

Walsh CT, Wright G. Introduction: antibiotic resistance. Chem Reviews **2005**; 105:391-393.

Wang D, De-Bing X, Yu-Jen H, Zeng-Peng L, Xiao-Hua W, Jiang-Hong M, Hua-Liang X, Qing-Hong, Z. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. World J Gastroenterol **2005**; 11:4008-4012.

WHO/CDS/CSR/DRS/**2001**.2 Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. www.who/intdrugresistance/en/SpGlobal2.pdf (Accesado en marzo de 2004).

Weinstein ET, Negri G, Meira R, Message E, Salatino A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. eCAM **2005**; 2:85-92.

Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiology **2001**; 126: 485-493.

Wollenweber E, Buchmann SL. Feral honey bees in the Sonoran desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). Z Naturforschung **1997**; 52c: 530-535.

Xiang DB, Wang D, He YJ, Xie J, Zhong ZY, Li ZP. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. Anti-Cancer Drugs **2006**; 17: 753-762.

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis

C. Velazquez[1], M. Navarro[1,2], A. Acosta[3], A. Angulo[1], Z. Dominguez[4], R. Robles[5], R. Robles[1], E. Lugo[6], F.M. Goycoolea[2], E.F. Velazquez[3], H. Astiazaran[7] and J. Hernandez[2]

1 Department of Chemistry-Biology, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico
2 Laboratory of Biopolymers, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, Mexico
3 Department of Polymers and Materials, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico
4 Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico
5 Department of Food Science, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, Mexico
6 Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, H. Caborca, Sonora, Mexico
7 Department of Nutrition, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, Mexico

Keywords
antibacterial, caffeic acid phenethyl ester, free-radical scavenging activity, Sonoran propolis.

Correspondence
Carlos Velazquez, Department of Chemistry-Biology, University of Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico
E-mail: velaz@guayacan.uson.mx

Javier Hernandez, Laboratory of Biopolymers, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., P.O.Box 1735 Hermosillo, Sonora 83000, México.
E-mail: jahernan@cascabel.ciad.mx

2007/0191: received 7 February 2007, revised 9 March 2007 and accepted 19 March 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x

Abstract

Aims: To evaluate the antibacterial and free-radical scavenging (FRS) activities of propolis collected from three different areas of Sonoran Desert in northwestern Mexico [Pueblo de Alamos (PAP), Urea (UP) and Caborca (CP)].

Methods and Results: The antibacterial and FRS activities of Sonoran propolis were determined by the broth microdilution method and the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydracyl) assay, respectively. Propolis samples had antibacterial activity against only Gram-positive bacteria. The UP sample showed the highest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* [minimal inhibitory concentration (MIC) 100 μg ml^{-1}] in a concentration-dependent manner (UP > CP > PAP). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a UP propolis constituent, had very high growth-inhibitory activity towards Gram-positive bacteria, particularly against *S. aureus* (MIC 0·1 mmol l^{-1}). To our knowledge, this is the first study showing a strong antibacterial activity of CAPE against *S. aureus*. Additionally, propolis CP exhibited high FRS activity (86% ± 0·3 at 100 μg ml^{-1}) comparable with those of the reference antioxidants vitamin C (87·4% ± 1·7 at 70 μmol l^{-1}) and BHT (66·07% ± 0·76 at 140 μmol l^{-1}). The propolis compounds CAPE and rutin showed high FRS activity (90·4% ± 0·2 and 88·5% ± 0·8 at 70 μmol l^{-1}, respectively).

Conclusions: Sonoran propolis UP and CAPE had strong antibacterial activity against *S. aureus*. In addition, propolis CP showed potent FRS activity comparable with those of vitamin C and BHT.

Significance and Impact of the study: The strong antibacterial and antioxidant properties of Sonoran propolis and some of its constituents support further studies on the clinical applications of this natural bee product against *S. aureus* and several oxidative damage-related diseases.

Introduction

Propolis (bee glue) is a natural resinous hive product gathered by honeybees from buds, leaf and exudates of certain trees and plants. Propolis has been used as a folk medicine in many regions of the world (Ghisalberti 1979; Burdock 1998; Bankova *et al.* 2000; Castaldo and Capasso 2002; Bankova 2005). It has been shown to possess a variety of biological activities such as antibacterial (Popova *et al.* 2005; Uzel *et al.* 2005), antioxidant (Choi *et al.* 2006; Ahn *et al.* 2007), antiviral (Amoros *et al.* 1994; Kujumgiev *et al.* 1999), fungicidal (Quiroga *et al.* 2006;

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

J A M 3 4 0 9 B
Journal Name Manuscript No.
Dispatch: 18.4.07 Journal: JAM CE: Sheeja
Author Received: No. of pages: 10 PE: Raymond

Sihci and Koc 2006), anti-inflammatory (Khayyal *et al.* 1993) and anticancer effects (Akao *et al.* 2003; Scifo *et al.* 2004). The chemical composition of propolis and its biological properties depend on the vegetation in the area from which they were collected. Because of the geographical differences, propolis samples from Europe, South America and Asia vary in chemical composition and activities (Hegazi *et al.* 2000; Bankova *et al.* 2002; Usia *et al.* 2002; Saloman *et al.* 2004; Isla *et al.* 2005; da Silva *et al.* 2006). Recently, propolis has also been extensively used in the food industry as an additive for health foods, beverages and nutritional supplements to improve health and prevent diseases (Banskota *et al.* 2001). Thus, there is renewed interest in the composition and biological properties of this natural product. Extensive research has already been carried out on propolis from Europe, Asia and South America (within or between countries from temperate and tropical areas), however, a limited number of investigations have been conducted to study the biological activities of propolis from arid and semiarid regions of the American continent (Wollenweber and Buchmann 1997; Valcic *et al.* 1998; Munoz *et al.* 2001a, 2001b; Russo *et al.* 2004). Therefore, we were interested to evaluate the inhibitory activities of propolis collected from arid areas of the Sonoran Desert against bacterial pathogens. Additionally, because the biological activity of Sonoran propolis may be because of the presence of diverse phytochemical compounds, mainly flavonoids, which have been reported to have multiple biological effects including antioxidant and antibacterial activities (Koo *et al.* 2002; Akao *et al.* 2003; Cushnie and Lamb 2005; da Silva *et al.* 2006), we also analysed the free-radical activity of Sonoran propolis.

In the present study, we have evaluated the antibacterial and free-radical scavenging (FRS) activities of propolis collected from three different arid areas of Sonora, Mexico [Pueblo de Alamos (PAP), Ures (UP) and Caborca (CP)]. We showed that UP propolis and CAPE (a UP propolis constituent) had potent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. In addition, CP propolis displayed a strong FRS activity comparable with those of the antioxidants vitamin C and BHT.

Materials and methods

Reagents

The following authentic standards of flavonoids: rutin, naringenin, hesperetin, pinocembrin, pinobanksin 3-acetate, chrysin, galangin, and acacetin were purchased from INDOFINE Chemical Co., Inc. USA. Xanthomicrol (kindly provided by Dra. Mariana Meckes, IMSS-Unidad de Investigación en Herbolaria y Productos Naturales, Mexico City, Mexico) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) was synthesized by chemical reaction of caffeic acid and phenethyl alcohol according to the procedure of Grunberger *et al.* (1988).

Propolis

Propolis was collected from three different areas of Sonora, Mexico: Pueblo de Alamos (PAP), Ures (UP) and Caborca (CP). Propolis was collected from November 2003 to March 2004 by the professional beekeepers. The hives were located in El Coyote (29°27′04″N; 110°22′00″W, province of Ures), Los Mesquites (29°07′129″N; 110°07′760″W, province of Pueblo de Alamos) and Caborca (30°46′844″N; 112°05′441″), altitude 413, 652 and 292 m above sea level, respectively. Propolis samples used in this study are representative samples of Sonoran propolis, because they were collected from at least 15 apiaries (at least 12 hives/apiary) of each collection area. We selected those areas because they are representative of the arid and semiarid regions of Sonora and have important apiculture activities.

Preparation of methanol extracts of propolis

Propolis (100 g) was cut into small pieces and extracted three times with absolute methanol (3 × 0·4 l) at room temperature for 24 h. After filtration through a filter paper, the filtrates were combined and the solvent evaporated in vacuum. The dried extract was dissolved in absolute methanol and filtered through a nylon membrane (type NYL, 0·2 μm, Whatman, England) and used in the antibacterial and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydracyl) assays.

Bacterial strains

Bacterial strains used in this study were: *S. aureus* (ATCC 6538P), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Bacterial cultures were maintained in Mueller Hinton broth (*S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*) or BHI broth (*L. monocytogenes* and *E. faecalis*). Before testing, all bacterial strains were maintained frozen at −70°C in 10% glycerol broth. Ten antibiotic-resistant *S. aureus* strains were isolated from abscess, throat and blood specimens submitted to the Sonora Children's Hospital Laboratory from May to September 2003 (Table 1). Identification of *S. aureus* was carried out on the basis of colony morphology, Gram staining and biochemical test (Kloos and Bannerman 1999). Biochemical characteristics of the isolates were determined by using catalase, tube coagulase,

© 2007 The Author
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

Table 1 Characteristics of the clinical isolates of *Staphylococcus aureus* tested in this study

Clinical isolates	Source	Resistance to
S. aureus 1	Abscess	Am*
S. aureus 2	Throat	Am*
S. aureus 3	Wound	Am*
S. aureus 4	Throat	Am*, E†, L‡, S§, Am/C¶
S. aureus 5	Throat	Am*
S. aureus 6	Throat	Am*, L‡
S. aureus 7	Throat	Am*
S. aureus 8	Throat	L‡
S. aureus 9	Blood	Am*, E†,L‡, Am/C¶
S. aureus 10	Blood	Am*

*Ampicillin
†Erythromycin.
‡Lincomycin
§Streptomycin.
¶Amoxicillin/clavulanate.

potassium tellurite reduction, production of DNase, lipase, and acid from D-mannitol. Susceptibility testing was performed using disc-diffusion methods according to the Clinical Laboratory Standards Institute (previously National Committee for Clinical Laboratory Standards) guidelines (NCCLS 1997). Mueller Hinton plates were inoculated with a cell suspension equivalent to 0·5 McFarland turbidity (10^8 CFU ml^{-1}), and antibiotic disks (BBL Microbiology Systems) were placed on the plates. After 24 h incubation, the diameters of the resulting zones of inhibition were measured. The quality control strain *S. aureus* (ATCC 25923) was included in each run.

Antibacterial assay

In vitro antibacterial studies were carried out by the broth microdilution method as described previously (Jorgensen *et al.* 1999), with some modifications. Briefly, 15 μl ($1·5 \times 10^6$ CFU) of a suspension of a logarithmic phase bacterial culture [10^8 CFU ml^{-1}, the turbidity of this bacterial suspension matching the turbidity of a 0·5 McFarland standard (Jorgensen *et al.* 1999)] was inoculated into each well of a flat 96-well microplate (Costar, Corning, NY, USA), containing 200 μl of different concentrations of propolis extracts in BHI or Mueller Hinton broth. The methanolic extracts of propolis were first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted in sterile broth. Each antibacterial test also included wells containing the culture media plus DMSO (0·2–0·8%), in order to obtain a control of the solvent antibacterial effect. Gentamicin (12 μg ml^{-1}) was used as positive control of bacterial growth inhibition. Bacterial cultures were incubated at 36°C for 48 h. Plates were read at 630 nm in an ELISA microplate reader (Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at different incubation periods (6, 12, 24 and 48 h). The optical density ($OD_{630\ nm}$) was corrected by subtraction of the $OD_{630\ nm}$ because of the propolis alone in sterile broth. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest propolis concentration that inhibited at least 90% of the bacterial growth after incubation at 36°C for 24 h. The MIC was determined using the following criteria: ($OD_{630\ nm}$ untreated bacteria − $OD_{630\ nm}$ test concentration)/($OD_{630\ nm}$ untreated bacteria) × 100 ≥ 90% (Baizman *et al.* 2000).

Free-radical scavenging activity (DPPH assay)

FRS activity was measured as described previously with slight modifications (Usia *et al.* 2002). Briefly, propolis samples dissolved in absolute ethanol (0·6 ml) were mixed with an equal volume of DPPH (Sigma, St Louis, MO, USA) solution (300 μmol l^{-1}) followed by vigorously vortexing for 10 s. After 30 min of incubation at room temperature in the dark, absorbance of the propolis/DPPH solution was read at 517 nm in a spectrophotometer (Spectronic AquaMate, Thermo Spectronic, England). The scavenging activity was determined by comparing the absorbance with that of the blank containing only DPPH and ethanol. Results were expressed as a percentage decrease with respect to control values. Propolis samples were evaluated at different concentrations (12·5–100 μg ml^{-1}), and vitamin C and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as antioxidant standards. Propolis constituents, vitamin C and BHT were tested at 8–140 μmol l^{-1}.

Flavone and flavonol content

Total flavone and flavonol content was measured by the spectrophotometric assay based on aluminium chloride complex formation (Popova *et al.* 2004). The aluminium chloride colorimetric method was modified from the procedure reported by Popova *et al.* (2004). Briefly, 40 μl of propolis sample was diluted with methanol (400 μl). Twenty microlitres of 5% $AlCl_3$ (w/v) were added and the contents mixed thoroughly and the volume was made up to 1 ml with methanol. The mixture was left for 30 min and the absorbance was read at 425 nm in a spectrophotometer (Spectronic AquaMate, Thermo Spectronic). Flavone and flavonol contents were estimated using a calibration curve of rutin (Popova *et al.* 2004).

Flavanone and dihydroflavonol content

The content of flavanones and dihydroflavonols was determined using the spectrophotometric method of Das

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

Deutsche Arzneibuch 9 with slight modifications (Popova *et al.* 2004). Forty microlitres of propolis sample were mixed with 80 μl of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) solution [50 mg DNP in 100 μl 96% sulfuric acid (v/v), diluted to 5 ml with methanol] and heated at 50°C for 50 min. After cooling to room temperature, the mixture was diluted to 400 μl with 10% KOH in methanol (w/v). Twenty microlitres of the resulting solution were diluted to 1 ml with methanol. Absorbance was measured at 486 nm in a spectrophotometer (Spectronic AquaMate, Thermo Spectronic). Blank: 1 ml methanol instead of test solution was used in analogous procedure. Flavanone and dihydroflavonol content was estimated using a calibration curve of pinocembrin.

Total phenolic substances

The total phenolic content of propolis extracts was determined using the Folin-Ciocalteu reagent as described by Popova (Popova *et al.* 2004) with some modifications. Briefly, 40 μl of propolis sample were diluted with distilled water (300 μl). Eighty microlitres of Folin-Ciocalteu reagent and 120 μl of a 20% sodium carbonate solution (w/v) were added. The volume was brought up to 1 ml with distilled water. The sample was left for 2 h and the absorbance was measured at 760 nm in a spectrophotometer (Spectronic AquaMate, Thermo Spectronic). Total phenolic content was estimated using a mixture of pinocembrin and galangin (2 : 1 w/w) standard.

Statistical analysis

Data were analysed using analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer and Duncan's multiple comparison tests [Number Cruncher Statistical Software (NCSS 2000)].

Results

Antibacterial activity of Sonoran propolis

Propolis samples were collected from three provinces of Sonora state, in northwestern Mexico: (i) Ures (UP), (ii) Pueblo de Alamos (PAP) and (iii) Caborca (CP). These regions have a typical Sonoran Desert-type climate with less than 10 inches of rain a year, on an average. The Sonoran Desert is the warmest and biologically most diverse of the North American deserts. To determine the antibacterial activity of Sonoran propolis, we evaluated the effect of propolis samples on the growth of Gram-positive (*S. aureus*, *E. faecalis* and *L. monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*). UP propolis had strong antibacterial activity against *S. aureus* (MIC, 100 μg ml^{-1}) in a concentration-dependent manner (Fig. 1). CP propolis showed a moderate inhibitory activity against *S. aureus* (MIC 200 μg ml^{-1}). In contrast, the PAP sample did not exhibit a significant effect on the growth of *S. aureus* at any concentration tested (50–400 μg ml^{-1}). The UP sample also had a significant inhibitory activity against *L. monocytogenes* (Fig. 1). None of the propolis extracts had antibacterial activity against the Gram-negative bacteria at any concentration tested. These observations are in agreement with previous reports, which show that propolis extracts have antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, but lower activity against Gram-negative bacteria (Kujumgiev *et al.* 1999; Pepeljnjak and Kosalec 2004; Uzel *et al.* 2005). The highest concentration of DMSO used (0·8% v/v) in the antibacterial assays did not interfere with the bacterial growth.

Antibacterial activity of Sonoran propolis on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*

In order to determine whether Sonoran propolis have antibacterial activity on clinical bacterial isolates, ten *S. aureus* strains were isolated from different clinical specimens (Table 1) and tested in antibacterial assays. Again, UP propolis showed the highest inhibitory activity (MIC 200 μg ml^{-1}) against all bacterial isolates tested (UP > CP > PAP) (Fig. 2 shows two representative examples). The CP sample exhibited an efficient antibacterial action on clinical isolates at the highest concentration evaluated (400 μg ml^{-1}). PAP did not show any effect on the growth of the *S. aureus* strains at any of the tested concentrations.

In a previous study by our group, the major chemical constituents of Sonoran propolis (UP, CP and PAP) were identified by HPLC-MS as rutin, pinobanksin, naringenin, hesperetin, pinocembrin, pinobanksin 3-acetate, CAPE, xanthomicrol, chrysin, galangin, acacetin, and 3′-demethoxysudachitin (submitted for publication). We evaluated the antimicrobial activity of the main chemical components of Sonoran propolis against *E. coli* (ATCC 25922) and *S. aureus* (ATCC 6538P). The propolis constituents CAPE, pinocembrin, pinobanksin 3-acetate, and naringenin showed significant inhibitory activity on the growth of *S. aureus* (Fig. 3). CAPE exhibited the highest inhibitory effect on the bacterial growth [CAPE (MIC 0·1 mmol l^{-1}), pinocembrin (MIC 0·4 mmol l^{-1}), pinobanksin 3-acetate (MIC 0·8 mmol l^{-1}), and naringenin (MIC 0·8 mmol l^{-1})]. None of the propolis constituents had any significant effect on the growth of *E. coli* at any of the tested concentrations (0·05–0·8 mmol l^{-1}). Pinobanksin and 3′-demethoxysudachitin were not tested in the antibacterial assay. Additionally, we tested the antibacterial activity of CAPE against *E. faecalis*, *L. monocytogenes*

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

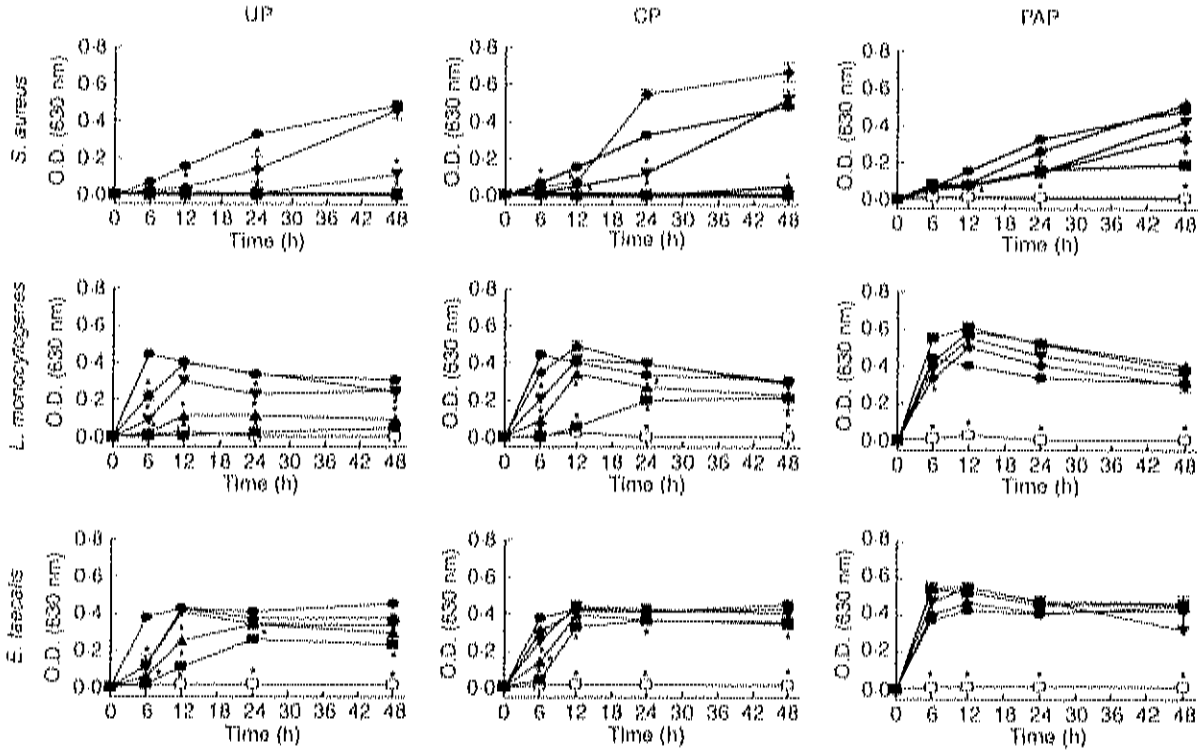


Figure 1 Antibacterial activity of Sonoran propolis UP, CP and PAP against bacterial cell cultures were treated with different doses of propolis samples PAP, UP and CP during 48 h. Antibacterial effect of propolis was determined by the broth microdilution method as described in materials and methods. ■, 400 μg ml^{-1}; ▲, 200 μg ml^{-1}; ▼, 100 μg ml^{-1}; ◆, 50 μg ml^{-1}, ●, 0·0 μg ml^{-1}, □, gentamicin. Control bacterial cultures were incubated with DMSO (0·2–0·8%). Gentamicin (12 μg ml^{-1}) was used as positive control of bacterial growth inhibition. The results shown are representative of at least three independent experiments. All values represent mean of triplicate determinations ± SD. Significant differences ($P < 0·05$) from control cell cultures are marked with asterisk.

and *P. aeruginosa*. CAPE inhibited the growth of *L. monocytogenes* and *E. faecalis* strains (MIC 0·4 mmol l^{-1}). On the contrary, *P. aeruginosa* growth was not affected by CAPE (Fig. 4).

Free-radical scavenging activity of Sonoran propolis

To evaluate the FRS activity of Sonoran propolis, the DPPH assay was performed. Two well-known antioxidants, BHT and vitamin C, were used as controls in this assay. The FRS activity of propolis extracts is shown in Fig. 5. The CP sample had a strong FRS activity (86% ± 0·3) at a concentration of 100 μg ml^{-1}. The FRS of CP propolis was comparable with those of the reference antioxidants vitamin C (87·4% ± 1·7 at 70 μmol l^{-1}) and BHT (66·07 ± 0·76 at 140 μmol l^{-1}). On the contrary, UP and PAP propolis exhibited weak FRS activity (23·4% ± 1·5 and 22·4% ± 1·4, respectively) at the highest propolis concentration tested (100 μg ml^{-1}) (Fig. 5). The propolis compounds CAPE and rutin showed high FRS activity (90·4% ± 0·2 and 88·5% ± 0·8 at 70 μmol l^{-1}, respectively) in a concentration-dependent manner (Fig. 5). Galangin had moderate activity (30·8% at ± 1·0 at 70 μmol l^{-1}). The rest of the identified propolis constituents did not show any FRS activity at the concentration tested.

Total polyphenol and flavonoid contents of Sonoran propolis

The antimicrobial and FRS activities of Sonoran propolis may be because of the presence of diverse phytochemical including polyphenolics, mainly flavonoids (Banskota *et al.* 2001; Pepeljnjak and Kosalec 2004). We used several spectrophotometric methods for the quantification of the three main groups of bioactive substances (flavones and flavonols, flavanones and dihydroflavonols, and total phenolics) (Popova *et al.* 2004) in Sonoran propolis. Table 2 shows the total polyphenol and flavonoid contents of UP, CP and PAP samples. UP propolis showed higher total polyphenolic, flavanone and dihydroflavonol contents than those from CP and PAP propolis. CP and

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

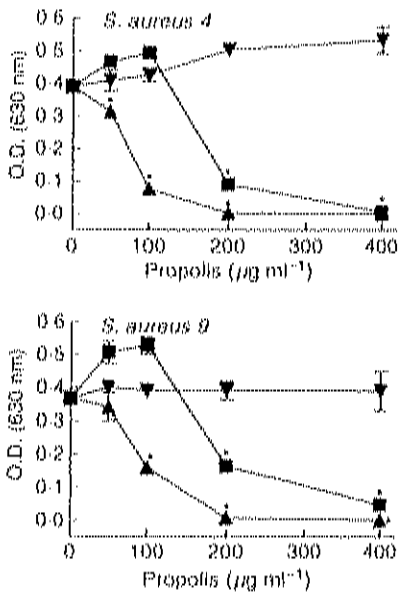


Figure 2 Antibacterial activity of Sonoran propolis on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Clinical *S. aureus* strains were isolated from different clinical specimens (Table 1). Bacterial cell cultures were treated with different doses of propolis samples PAP (▼), UP (▲) and CP (■) during 24 h. Antibacterial effect of propolis was determined by the broth microdilution method as described in materials and methods. Control bacterial cultures were incubated with DMSO (0·2–0·8%). Gentamicin (12 μg ml^{-1}) was used as positive control of bacterial growth inhibition. The results shown are representative of at least three independent experiments. All values represent mean of triplicate determinations ± SD. Significant differences ($P < 0.05$) from control cell cultures are marked with asterisk.

UP propolis had similar flavone and flavonol content (131·2 ± 5·7 mg g^{-1} of propolis and 123·5 ± 11·2 mg g^{-1} of propolis, respectively). PAP propolis had the lowest content of total phenolic and flavonoid compounds (total phenolics: 148 ± 12·1 mg g^{-1} of propolis; flavones and flavonols: 57·8 ± 3·6 mg g^{-1} of propolis; and flavanones and dihydroflavonols: 150·6 ± 18·4 mg g^{-1} of propolis).

Discussion

In the present study, we have analysed the antibacterial and DPPH FRS activities of Sonoran propolis collected from three different regions of the Sonoran desert: Caborca (CP), Ures (UP) and Pueblo de Alamos (PAP). Sonoran propolis had antibacterial activity against only Gram-positive bacteria. This observation is in agreement with previous reports that show that Gram-negative bacteria are less susceptible to the antibacterial effect of propolis extracts than Gram-positive bacteria (Kujumgiev *et al.* 1999; Pepeljnjak and Kosalec 2004; Uzel *et al.* 2005). The differences found in the antibacterial activity of the three propolis extracts evaluated could be because of qualitative and quantitative differences in the chemical composition of the propolis samples. In the present study, we evaluated the antibacterial activity of the major identified compounds of Sonoran propolis against *S. aureus*. CAPE exhibited a potent inhibitory activity (MIC 0·1 mmol l^{-1}) against *S. aureus*. CAPE is one of the most active compounds of the bee glue and it has been mostly detected in propolis from temperate regions. It has been shown that CAPE has antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antiviral, and immunomodulatory properties (Fesen *et al.* 1994; Su *et al.* 1994; Natarajan *et al.* 1996; Michaluart *et al.* 1999; Okutan *et al.* 2005; Xiang *et al.* 2006). Nevertheless, there is very limited information about the antibacterial activity of CAPE. To our knowledge, this is the first study showing that CAPE possesses a potent inhibitory activity against *S. aureus* growth. Additionally, CAPE also exhibited moderate antibacterial activity against *E. coli* (Fig. 5). CAPE was only present in the UP sample (submitted for publication), therefore CAPE could contribute significantly to the antibacterial activity shown by UP. The propolis compounds pinocembrin, pinobanksin 3-acetate, and naringenin exhibited moderate effect on the growth of *S. aureus*. These compounds are typical chemical constituents of poplar-type propolis (i.e. propolis from Europe and non-tropic regions of Asia). The flavonoids pinocembrin and pinobanksin 3-acetate are among the most abundant compounds present in Sonoran propolis (submitted for publication). Naringenin, pinocembrin and pinobanksin 3-acetate have been shown to have antimicrobial activity against different bacterial and fungal species (Koo *et al.* 2002; Ulanowska *et al.* 2006).

Additionally, we evaluated the FRS activity of Sonoran propolis. CP propolis showed potent FRS activity similar to those of the well-known antioxidants BHT and vitamin C. In contrast, UP and PAP samples exhibited low FRS activity. Propolis constituents rutin and CAPE showed higher FRS activity than antioxidant BHT. The antioxidant activity of rutin and CAPE has already been reported (Russo *et al.* 2002; Kamalakkannan and Prince 2006). It is noteworthy that rutin and CAPE were not present in the CP sample. Galangin exhibited moderate FRS activity, and it was present in the three propolis samples tested. The biological activity of Sonoran propolis could be because of synergistic action of some of its constituents (Blonska *et al.* 2004), resulting in a strong antibacterial and DPPH free-radical activities. Additionally, some of the unidentified compounds present in propolis samples could be responsible for such antibacterial and antioxidant effects. Further studies need to be conducted to identify

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

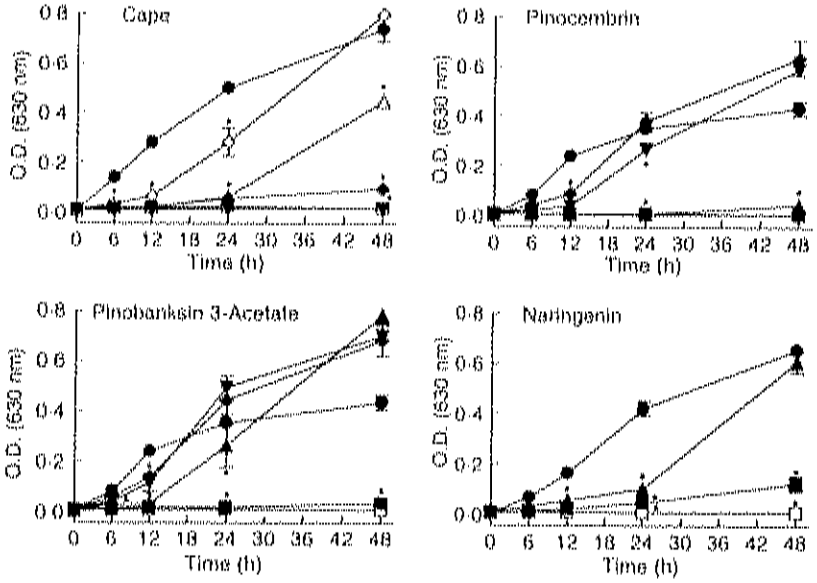


Figure 3 Antibacterial activity of chemical compounds present in Sonoran propolis against *Staphylococcus aureus*. Bacterial cell cultures were treated with different doses (0–0·8 mmol l^{-1}) of CAPE, pinocembrin, pinobanksin 3-O-acetate and naringenin during 48 h ■, 0·8 mmol l^{-1}, ▲, 0·4 mmol l^{-1}, ▼, 0·2 mmol l^{-1}; ◆, 0·1 mmol l^{-1}, △, 0·05 mmol l^{-1}, ◇, 0·025 mmol l^{-1}, ●, 0·0 mmol l^{-1}, □, gentamicin. Antibacterial effect of propolis constituent was determined by the broth microdilution method as described in materials and methods. Control bacterial cultures were incubated with DMSO (0·2–0·8%). Gentamicin (12 μg ml^{-1}) was used as positive control of bacterial growth inhibition. The results shown are representative of at least three independent experiments. All values represent mean of triplicate determinations ± SD. Significant differences ($P < 0.05$) from control cell cultures are marked with asterisk.

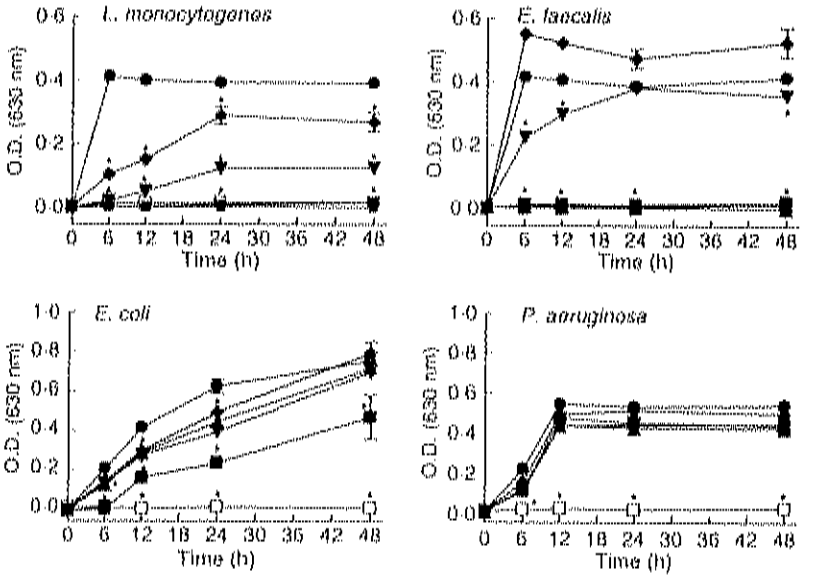


Figure 4 Antibacterial activity of CAPE against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Gram-positive (*Enterococcus faecalis and Listeria monocytogenes*) and Gram-negative (*Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*) bacterial cell cultures were treated with different doses (0–0·8 mmol l^{-1}) of CAPE during 48 h ■, 0·8 mmol l^{-1}; ▲, 0·4 mmol l^{-1}; ▼, 0·2 mmol l^{-1}, ◆, 0·1 mmol l^{-1}; ●, 0·0 mmol l^{-1}, □, gentamicin. Antibacterial effect of CAPE was determined by the broth microdilution method as described in materials and methods. Control bacterial cultures were incubated with DMSO (0·2–0·8%). Gentamicin (12 μg ml^{-1}) was used as positive control of bacterial growth inhibition. The results shown are representative of at least three independent experiments. All values represent mean of triplicate determinations ± SD. Significant differences ($P < 0.05$) from control cell cultures are marked with asterisk.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

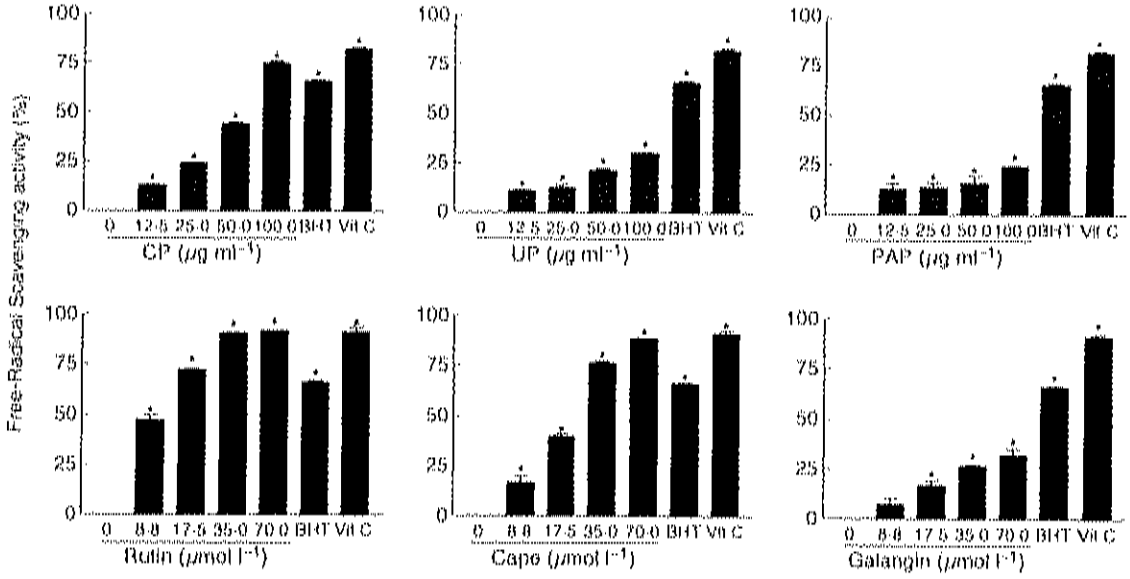


Figure 5 DPPH free-radical scavenging activity of Sonoran propolis and some of its constituents. Different concentrations of propolis extract (0–100 μg ml⁻¹) and propolis constituents: rutin, CAPE and galangin (0–70 μmol l⁻¹) were used in the DPPH free-radical scavenging activity assay. Vitamin C (70 μmol l⁻¹) and BHT (140 μmol l⁻¹) were used as antioxidant standards.

Table 2 Total flavonoid and phenolic content in Sonoran propolis

	CP	UP (mg g⁻¹)	PAP
Flavanones and dihydroflavonols*	201·1 ± 30·7	285·5 ± 7·4	150·6 ± 18·4
Flavones and flavonols†	131·2 ± 5·7	123·5 ± 11·2	57·8 ± 3·6
Total phenolics‡	255·3 ± 26·4	311·1 ± 10·8	148·5 ± 12·1

*Expressed as Pinocembrin equivalent.
†Expressed as Rutin equivalent.
‡Expressed as Pinocembrin/Galangin equivalent.

all the chemical compounds present in Sonoran propolis and their antioxidant and antibacterial activities.

The biological activity of Sonoran propolis may be because of the presence of diverse phytochemical including polyphenolics, mainly flavonoids. Phenolic compounds and flavonoids have been reported to have multiple biological effects including antioxidant and antibacterial activities (Koo *et al.* 2002; Akao *et al.* 2003; Cushnie and Lamb 2005; da Silva *et al.* 2006). The strong antibacterial (UP sample) and FRS (CP sample) activities of Sonoran propolis could be because of their high content of phenolic substances and flavonoids (Bankova *et al.* 1995; Banskota *et al.* 2001). Flavonoids, cinnamic acids and their esters have been reported to be the most abundant and the most effective antioxidant and antimicrobial compounds in propolis (Krol *et al.* 1990; Bonvehi and Coll 1994; Pascual *et al.* 1994; Martos *et al.* 1997; Isla *et al.* 2001). Additional studies need to be carried out to define and characterize the antioxidant and antibacterial activities of propolis at the chemical and biochemical level. In summary, this is the first study that describes the antibacterial and free-radical properties of propolis collected from Sonora Desert areas. The biological and chemical characterization of Sonoran propolis will provide a better understanding of the effects of this natural bee product.

Acknowledgements

We are greatly indebted to Mariana Meckes for donation of xanthomicrol. We thank professional beekeepers Humberto Saavedra, Gilberto Valenzuela and Jose Puentes for propolis collection. We thank Marco Valencia-Sanchez for helpful discussion and reading of the manuscript.

References

Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. and Nakayama, T. (2007) Antioxidant activity

© 2007 The Author
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem* **101**, 1383–1392.

Akao, Y., Maruyama, H., Matsumoto, K., Ohguchi, K., Nishizawa, K., Sakamoto, T., Araki, Y., Mishima, S., *et al.* (2003) Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* **26**, 1057–1059.

Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F. and Cormier, M. (1994) Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod* **57**, 644–647.

Baizman, E.R., Branstrom, A.A., Longley, C.B., Allanson, N., Sofia, M.J., Gange, D. and Goldman, R.C. (2000) Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. *Microbiology* **146**, 3129–3140.

Bankova, V. (2005) Recent trends and important developments in propolis research. *Evid based Complement Alternat Med* **2**, 29–32.

Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C. and Popova, S. (1995) Chemical-composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch C* **50**, 167–172.

Bankova, V.S., de Castro, S.L. and Marcucci, M.C. (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**, 3–15.

Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S. and Sabatini, A.G. (2002) Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch C* **57**, 530–533.

Banskota, A.H., Tezuka, Y. and Kadota, S. (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* **15**, 561–571.

Blonska, M., Bronikowska, J., Pietsz, G., Czuba, Z.P., Scheller, S. and Krol, W. (2004) Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J Ethnopharmacol* **91**, 25–30.

Bonvehi, J.S. and Coll, F.V. (1994) Phenolic composition of propolis from China and from South-America. *Z Naturforsch C* **49**, 712–718.

Burdock, G.A. (1998) Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* **36**, 347–363.

Castaldo, S. and Capasso, F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* **73**, 51–86.

Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M. and Kim, J.M. (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Sci Technol* **39**, 756–761.

Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **26**, 343–356.

da Silva, J.F.M., de Souza, M.C., Matta, S.R., de Andrade, M. and Vidal, F.V.N. (2006) Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* **99**, 431–435.

Fesen, M.R., Pommier, Y., Leteurtre, F., Hiroguchi, S., Yung, J. and Kohn, K.W. (1994) Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (Cape) and related compounds. *Biochem Pharmacol* **48**, 595–608.

Ghisalberti, E.L. (1979) Propolis: a review. *Bee World* **60**, 59–84.

Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E.M., Efros, L., Caldwell, M., Estevez, V. and Nakanishi, K. (1988) Preferential cyto-toxicity on tumor-cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* **44**, 230–232.

Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K. and Abd Allah, F.A.M. (2000) Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch C* **55**, 70–75.

Isla, M.I., Moreno, M.I.N., Sampietro, A.R. and Vattuone, M.A. (2001) Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* **76**, 165–170.

Isla, M.I., Paredes-Guzman, J.F., Nieva-Moreno, M.I., Koo, H and Park, Y.K. (2005) Some chemical composition and biological activity of northern argentine propolis. *J Agric Food Chem* **53**, 1166–1172.

Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. and Washington, J.A. (1999) Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology* ed. Murray, P.R., Jo Baron, E., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Yolken, R.H. pp. 1526–1543. Washington DC: ASM Press.

Kamalakkannan, N. and Prince, P.S.M. (2006) Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **98**, 97–103.

Khayyal, M.T., Elghazaly, M.A. and Elkhatib, A.S. (1993) Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res* **19**, 197–203.

Kloos, W.E. and Bannerman, T.L. (1999) *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology* ed. Murray, P.R., Jo Baron, E., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Yolken, R.H. pp. 264–282. Washington DC: ASM Press.

Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K. and Bowen, W.H. (2002) Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1302–1309.

Krol, W., Czuba, Z., Scheller, S., Gabrys, J., Grabiec, S. and Shani, J. (1990) Anti-oxidant properties of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of lu. *Biochem Int* **21**, 593–597.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. and Popov, S. (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* **64**, 235–240.

Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. and TomasBarberan, F.A. (1997) Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J Agric Food Chem* **45**, 2824–2829.

Michaluart, P., Masferrer, J.L., Carothers, A.M., Subbaramaiah, K., Zweifel, B.S., Koboldt, C., Mestre, J.R., Grunberger, D., *et al.* (1999) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res* **59**, 2347–2352.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

Munoz, O., Pena, R.C., Ureta, E., Montenegro, G., Caldwell, C. and Timmermann, B.N. (2001a) Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z Naturforsch C* **56**, 273–277.

Munoz, O., Pena, R.C., Ureta, E., Montenegro, G. and Timmermann, B.N. (2001b) Propolis from Chilean matorral hives. *Z Naturforsch C* **56**, 269–272.

Natarajan, K., Singh, S., Burke, T.R., Grunberger, D. and Aggarwal, B.B. (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9090–9095.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Wayne, PA: Approved Standard M2–A6.

Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H.R. and Uz, E. (2005) Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem* **38**, 191–196.

Pascual, C., Torricella, R.G. and Gonzalez, R. (1994) Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* **41**, 9–13.

Pepeljnjak, S. and Kosalec, I. (2004) Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **240**, 111–116.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. (2004) Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem Anal* **15**, 235–240.

Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O. and Bankova, V. (2005) Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* **12**, 221–228.

Quiroga, E.N., Sampietro, D.A., Soberon, J.R., Sgariglia, M.A. and Vattuone, M.A. (2006) Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* **101**, 103–110.

Russo, A., Longo, R. and Vanella, A. (2002) Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* **73**, S21–S29.

Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A. and Garbarino, J.A. (2004) Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* **76**, 545–558.

Salomao, K., Dantas, A.P., Borba, C.M., Campos, L.C., Machado, D.G., Neto, F.R.A. and de Castro, S.L. (2004) Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol* **38**, 87–92.

Scifo, C., Cardile, V., Russo, A., Consoli, R., Vancheri, C., Capasso, F., Vanella, A. and Renis, M. (2004) Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. *Oncol Res* **14**, 415–426.

Silici, S. and Koc, A.N. (2006) Comparative study of *in vitro* methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Lett Appl Microbiol* **43**, 318–324.

Su, Z.Z., Lin, J., Grunberger, D. and Fisher, P.B. (1994) Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type-5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res* **54**, 1865–1870.

Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G. and Wegrzyn, G. (2006) Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch Microbiol* **184**, 271–278.

Usia, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K. and Kadota, S. (2002) Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J Nat Prod* **65**, 673–676.

Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Coguloglu, D., Gencay, M. and Salih, B. (2005) Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* **160**, 189–195.

Valcic, S., Montenegro, G. and Timmermann, B.N. (1998) Lignans from Chilean propolis. *J Nat Prod* **61**, 771–775.

Wollenweber, E. and Buchmann, S.L. (1997) Peral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Z Naturforsch C* **52**, 530–535.

Xiang, D.B., Wang, D., He, Y.J., Xie, J., Zhong, Z.Y. and Li, Z.P. (2006) Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* **17**, 753–762.

Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

© 2007 The Authors

Munoz, O., Pena, R.C., Ureta, E., Montenegro, G., Caldwell, C. and Timmermann, B.N. (2001a) Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z Naturforsch C* **56**, 273–277.

Munoz, O., Pena, R.C., Ureta, E., Montenegro, G. and Timmermann, B.N. (2001b) Propolis from Chilean matorral hives. *Z Naturforsch C* **56**, 269–272.

Natarajan, K., Singh, S., Burke, T.R., Grunberger, D. and Aggarwal, B.B. (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9090–9095.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Wayne, PA: Approved Standard M2–A6.

Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H.R. and Uz, E. (2005) Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem* **38**, 191–196.

Pascual, C., Torricella, R.G. and Gonzalez, R. (1994) Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* **41**, 9–13.

Pepeljnjak, S. and Kosalec, I. (2004) Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **240**, 111–116.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. (2004) Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem Anal* **15**, 235–240.

Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O. and Bankova, V. (2005) Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* **12**, 221–228.

Quiroga, E.N., Sampietro, D.A., Soberon, J.R., Sgariglia, M.A. and Vattuone, M.A. (2006) Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* **101**, 103–110.

Russo, A., Longo, R. and Vanella, A. (2002) Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* **73**, S21–S29.

Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A. and Garbarino, J.A. (2004) Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* **76**, 545–558.

Salomao, K., Dantas, A.P., Borba, C.M., Campos, L.C., Machado, D.G., Neto, F.R.A. and de Castro, S.L. (2004) Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol* **38**, 87–92.

Scifo, C., Cardile, V., Russo, A., Consoli, R., Vancheri, C., Capasso, F., Vanella, A. and Renis, M. (2004) Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. *Oncol Res* **14**, 415–426.

Silici, S. and Koc, A.N. (2006) Comparative study of *in vitro* methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Lett Appl Microbiol* **43**, 318–324.

Su, Z.Z., Lin, J., Grunberger, D. and Fisher, P.B. (1994) Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type-5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res* **54**, 1865–1870.

Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G. and Wegrzyn, G. (2006) Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch Microbiol* **184**, 271–278.

Usia, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K. and Kadota, S. (2002) Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J Nat Prod* **65**, 673–676.

Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Cogulu, D., Gencay, M. and Salih, B. (2005) Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* **160**, 189–195.

Valcic, S., Montenegro, G. and Timmermann, B.N. (1998) Lignans from Chilean propolis. *J Nat Prod* **61**, 771–775.

Wollenweber, E. and Buchmann, S.L. (1997) Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Z Naturforsch C* **52**, 530–535.

Xiang, D.B., Wang, D., He, Y.J., Xie, J., Zhong, Z.Y. and Li, Z.P. (2006) Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* **17**, 753–762.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology

Munoz, O., Pena, R.C., Ureta, E., Montenegro, G., Caldwell, C. and Timmermann, B.N. (2001a) Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z Naturforsch C* **56**, 273–277.

Munoz, O., Pena, R.C., Ureta, E., Montenegro, G. and Timmermann, B.N. (2001b) Propolis from Chilean matorral lives. *Z Naturforsch C* **56**, 269–272.

Natarajan, K., Singh, S., Burke, T.R., Grunberger, D. and Aggarwal, B.B. (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9090–9095.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Wayne, PA: Approved Standard M2–A6.

Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H.R. and Uz, E. (2005) Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem* **38**, 191–196.

Pascual, C., Torricella, R.G. and Gonzalez, R. (1994) Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* **41**, 9–13.

Pepeljnjak, S. and Kosalec, I. (2004) Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **240**, 111–116.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. (2004) Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem Anal* **15**, 235–240.

Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O. and Bankova, V. (2005) Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* **12**, 221–228.

Quiroga, E.N., Sampietro, D.A., Soberon, J.R., Sgariglia, M.A. and Vattuone, M.A. (2006) Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* **101**, 103–110.

Russo, A., Longo, R. and Vanella, A. (2002) Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* **73**, S21–S29.

Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A. and Garbarino, J.A. (2004) Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* **76**, 545–558.

Salomao, K., Dantas, A.P., Borba, C.M., Campos, L.C., Machado, D.G., Neto, F.R.A. and de Castro, S.L. (2004) Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol* **38**, 87–92.

Scifo, C., Cardile, V., Russo, A., Consoli, R., Vancheri, C., Capasso, F., Vanella, A. and Renis, M. (2004) Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. *Oncol Res* **14**, 415–426.

Silici, S. and Koc, A.N. (2006) Comparative study of *in vitro* methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Lett Appl Microbiol* **43**, 318–324.

Su, Z.Z., Lin, J., Grunberger, D. and Fisher, P.B. (1994) Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type-5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res* **54**, 1865–1870.

Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G. and Wegrzyn, G. (2006) Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch Microbiol* **184**, 271–278.

Usia, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K. and Kadota, S. (2002) Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J Nat Prod* **65**, 673–676.

Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Cogulu, D., Gencay, M. and Salih, B. (2005) Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* **160**, 189–195.

Valcic, S., Montenegro, G. and Timmermann, B.N. (1998) Lignans from Chilean propolis. *J Nat Prod* **61**, 771–775.

Wollenweber, E. and Buchmann, S.L. (1997) Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Z Naturforsch C* **52**, 530–535.

Xiang, D.B., Wang, D., He, Y.L., Xie, J., Zhong, Z.Y. and Li, Z.P. (2006) Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* **17**, 753–762.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology