

Actividad antibacteriana de propóleos con la adición de chalconas sintéticas

Antibacterial activity of propolis with the addition of synthetic chalcones

Betsabé Rodríguez Pérez^{1*}, José Guillermo Penieres Carrillo²,
María Margarita Canales Martínez³, Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez¹

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

²Laboratorio de Química Verde, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.

³Laboratorio de Farmacognosia, Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia

Resumen

La actividad antibacteriana de los propóleos se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides; sin embargo, no todos los propóleos presentan esta propiedad debido a la ausencia o baja cantidad de estos compuestos, pero se puede incrementar con la adición de chalconas sintéticas. Se sintetizaron tres chalconas: 1,3-difenilpropil-2E-1-ona (PLCR-1); y dos análogos con sustituyentes hidroxilo: 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-2) y 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-3) que se adicionaron en distintas proporciones a dos propóleos, uno del estado de Guanajuato (sin flavonoides) y otro del Estado de México (con flavonoides) para evaluar la actividad antibacteriana contra cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*, utilizando el método Kirby Bauer. Los resultados muestran que únicamente la chalcona PLCR-3 potencializó el efecto antibacteriano de ambas muestras frente a *S. aureus*. El incremento de la actividad antibacteriana de un propóleo con la adición de chalconas sintéticas está en relación con el microorganismo evaluado y la proporción utilizada.

Palabras clave: Propóleos; chalconas; actividad antibacteriana.

Abstract

The antibacterial activity of propolis is related to the content of phenolic compounds and flavonoids; however, not all propolis present this property because of the absence or low amount of these compounds, but it can be increased with the addition of synthetic chalcones. Three chalcones were synthesized: 1,3-diphenylpropyl-2E-1-one (PLCR-1); and two hydroxyl-replaced analogues: 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-(2,4,6-trihydroxyphenyl)prop-2E-en-1-one (PLRC-2) and 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2E-en-1-one (PLRC-3) that were added in different proportions to two propolis, one from the State of Guanajuato (without flavonoids) and another from the State of Mexico (with flavonoids) aiming to evaluate antibacterial activity against reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, using the Kirby Bauer method. The results show that only PLCR-3 chalcone strengthened the antibacterial effect of both samples against *S. aureus*. The increase of the antibacterial activity of a propolis with the addition of synthetic chalcones is relative to the evaluated microorganism and the proportion used.

Keywords: Propolis; chalcones; antibacterial activity.

Recibido: 26 de febrero de 2020

Aceptado: 14 de abril de 2020

Publicado: 29 de abril de 2020

Como citar: Rodríguez Pérez, B., Penieres Carrillo, J. G., Canales Martínez, M. M., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Actividad antibacteriana de propóleos con la adición de chalconas sintéticas. *Acta Universitaria* 30, e2849. doi. <http://doi.org/10.15174/au.2020.2849>

Introducción

El propóleo es un material resinoso que elaboran las abejas a partir de resinas de distintas especies botánicas y que son modificadas con sus secreciones salivales para transportarlas al interior de la colmena con el fin de utilizarlo como material de construcción, bloqueo de agujeros y grietas, como defensa química contra los microorganismos y como embalsamador de intrusos que han muerto en la colmena y que son demasiado grandes para ser eliminados por ellas (Naggar *et al.*, 2016; Rodríguez-Pérez, Canales-Martínez, Penieres-Carrillo & Cruz-Sánchez, 2020). Este producto ha sido utilizado en la medicina tradicional durante siglos por varias civilizaciones para tratar resfriados, heridas y úlceras debido a sus propiedades anestésicas antisépticas y locales. Los egipcios lo usaron para embalsamar a sus muertos y, más recientemente, fue utilizado en diferentes guerras para curar heridas y la regeneración de tejidos (Bankova, 2005; Sforcin, 2016).

Se ha señalado la presencia de, al menos, 300 compuestos en su composición: resinas (50%), ceras (30%), aceites esenciales (10%), polen (5%) y otros compuestos orgánicos (5%) (Gómez-Caravaca, Gómez-Romero, Arráez-Román, Segura-Carretero & Fernández-Gutiérrez, 2006; Roman, Madras-Majewska & Popiela-Pleban, 2011) que difieren en concentración, dependiendo del origen geográfico, botánico y de la época de recolección del propóleo (Sforcin & Bankova, 2011) y que presentan un efecto sinérgico que es esencial para las actividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, inmunomoduladora, pro-inflamatoria y antiinflamatoria. Se considera que la actividad biológica del propóleo en la reparación de heridas y la regeneración de tejidos puede estar correlacionada con sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras y que están relacionadas con la cantidad de compuestos bioactivos presentes en la resina y que pueden ser inhibitorias o estimulantes (Fischer *et al.*, 2007; Miguel, Nunes, Dandlen, Cavaco & Antunes, 2014; Sforcin, 2016; Soto-Vásquez, 2015). La actividad antimicrobiana es una de las propiedades constatadas en los propóleos debido a la presencia de diferentes flavonoides como pinocembrina, quercetina, naringenina, acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol y pinobanksina, principalmente (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014).

Por otro lado, las chalconas son compuestos orgánicos (metabolitos secundarios) distribuidos en la naturaleza y pertenecientes a la familia de los flavonoides con distintas actividades biológicas como antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirales, anticancerígenas, antiinflamatorias, inhibidoras enzimáticas, precursoras de sustancias tóxicas, formación de pigmentos y filtros solares, mecanismos de fotosensibilización y de transferencia de energía (Sapra, Sharma, Bhalla & Dhar, 2016). La estructura química de una chalcona se muestra en la figura 1. Esta se caracteriza por un anillo aromático en cada extremo de una cadena de tres átomos de carbono con sistema carbonílico α,β -insaturado (1,3-difenil-2E-propen-1-ona) (Blanco *et al.*, 2016). Este sistema carbonílico, la cantidad y posición de sustituyentes químicos determinan el amplio rango de su actividad biológica (Blanco *et al.*, 2016; Díaz-Tielas, Graña, Reigosa & Sánchez-Moreiras, 2016; Mahapatra & Bharti, 2016; Singh, Anand & Kumar, 2014).

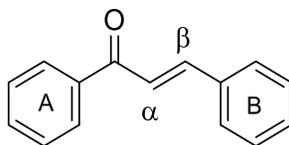


Figura 1. Estructura química general de las chalconas (1,3-difenilprop-2E-en-1-ona).
Fuente: Insuasty-Obando, 2016.

Las chalconas se pueden obtener en el laboratorio a partir de síntesis química, mediante la condensación de Claisen-Schmidt, siendo este uno de los métodos que más se han estudiado y utilizado para su formación entre un compuesto de tipo acetofenona con un aldehído aromático adecuado (Blanco

et al., 2016), por catálisis con un ácido (figura 2) o una base, seguido de una deshidratación para producirlas (Chetana, Mahajan & Suvarna, 2009).

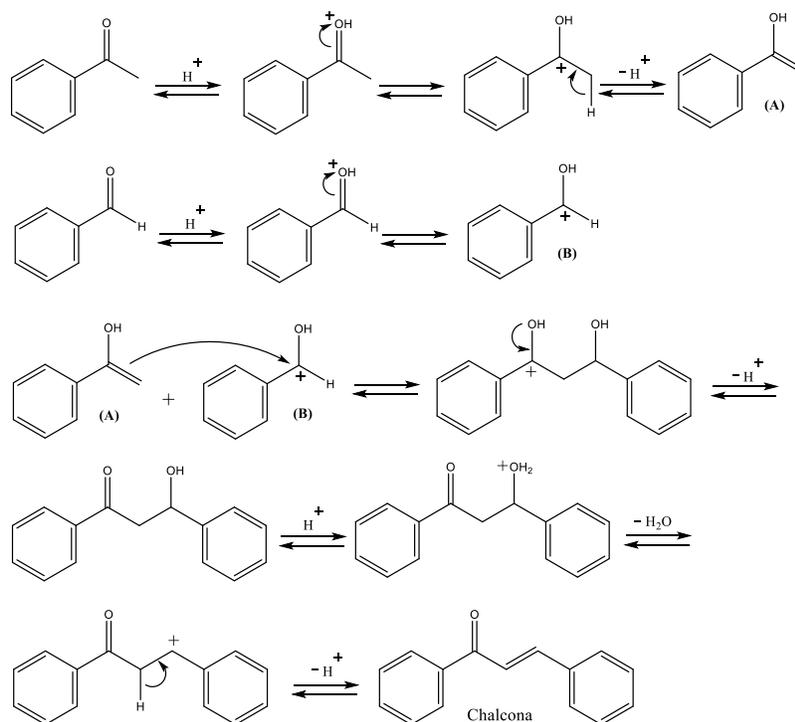


Figura 2. Mecanismo de reacción para la síntesis de chalconas en medio ácido
Fuente: Chetana et al., 2009.

El objetivo de esta investigación es evaluar la actividad antibacteriana de tres chalconas sintéticas: 1,3-difenilpropil-2E-1-ona (PLCR-1) y dos análogos con sustituyentes hidroxilo: 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-2) y 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-3) al adicionarse en distintas proporciones a dos propóleos, uno del estado de Guanajuato (sin flavonoides) y otro del Estado de México (con flavonoides) contra cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*, utilizando el método Kirby Bauer.

Materiales y Métodos

Productos químicos

Todos los reactivos, solventes y estándares se adquirieron en Sigma-Aldrich® (México). Para los ensayos microbiológicos, los medios de cultivo utilizados se adquirieron en Becton Dickinson (México).

Síntesis de chalconas

La metodología se realizó utilizando la reacción de condensación de Claisen-Schmidt. En un matraz bola de 250 ml de fondo redondo equipado con un agitador magnético, se colocó la acetofenona y el benzaldehído correspondiente, a una concentración de 0.01 M cada una y se añadió 10 ml de hidróxido de sodio (0.1 M) durante 30 min, manteniendo la temperatura de reacción entre 20 °C y 25 °C, utilizando un baño de hielo. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante por cinco horas y posteriormente se neutralizó con ácido clorhídrico (0.1 N), hasta la formación de un precipitado que se filtró y se secó a

temperatura ambiente. El producto fue purificado utilizando cromatografía en columna (sílica gel y hexano:acetato de etilo en proporción de 8:2) para la obtención de las chalconas puras. Los puntos de fusión se determinaron en un dispositivo Buchi B-450 y no se corrigieron, se compararon en la base de datos del sistema *SciFinder* (Chetana *et al.*, 2009; Hormaza, Arbeláez & Montes, 2009).

Recolección de propóleos

Las muestras de propóleos en greña se recolectaron en el mes de septiembre del año 2015 (cosecha de verano). El propóleo procedente del Estado de México corresponde al apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM) (19° 41' N, 99° 11' O, 2260 msnm) y se recolectó utilizando mallas plásticas. El otro propóleo empleado corresponde al municipio de San José Iturbide, Guanajuato (21° 07' N, 100° 32' O, 2100 msnm), recolectado por el método de raspado. Las muestras se acondicionaron eliminando las impurezas visibles, tales como virutas de madera, restos de abejas, pinturas, vegetales, entre otros; posteriormente, fueron protegidas de la luz y mantenidas a 4 °C hasta su utilización.

Obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP)

La obtención del extracto etanólico se realizó como lo establece la Norma Oficial Mexicana: NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento (Diario Oficial de la Federación [DOF], 2017). Se pesaron 25 g de los propóleos en greña libres de impurezas en una balanza analítica (marca AND, modelo HR200, Japón), se añadieron 75 ml de etanol al 70%, sometiendo la mezcla a extracción utilizando un ultrasonicador (Branson, CPX1800H, Danbury, Estados Unidos) con dos ciclos de 30 min. El extracto obtenido se separó por filtración, y el filtrado resultante se concentró utilizando un rotavapor (*Science MED*, SM100-PRO, Finlandia); posteriormente, se dejó a sequedad utilizando una bomba de vacío para eliminar los residuos de etanol. El extracto seco se mantuvo almacenado protegido de la luz y en refrigeración a 4 °C hasta su utilización (DOF, 2017; Trusheva, Trunkova & Bankova, 2007).

Cuantificación de compuestos fenólicos

Para medir la cantidad de compuestos fenólicos, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (FC) con base en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. Las muestras de propóleo se prepararon a una concentración de 0.05 mg/ml y se utilizó ácido gálico como estándar (Sigma-Aldrich) para la curva de calibración de 6.25 µg/ml a 200 µg/ml. La metodología se realizó como lo indican Rodríguez-Pérez *et al.* (2020), y los resultados se expresaron en porcentaje (%) (DOF, 2017).

Cuantificación de flavonoides

Para la cuantificación de los flavonoides presentes se utilizó el método colorimétrico del tricloruro de aluminio (AlCl₃) con formación de complejos de transferencia de carga aluminio-flavonoides. Se preparó una curva de calibración de 1 µg/ml a 90 µg/ml utilizando quercetina como material de referencia, las muestras a evaluar se prepararon a una concentración de 0.05 mg/ml. La metodología se realizó como lo indican Rodríguez-Pérez *et al.* (2020) y los resultados se expresaron en porcentaje (%) (DOF, 2017).

Cromatografía de Gases acoplada Espectrometría de Masas (CG-EM)

El análisis de los extractos etanólicos fue realizado en un cromatógrafo de gases (modelo 5975C, *Agilent Technologies*®, Pennsylvania, USA) acoplado a un espectrómetro de masas (*Agilent Technologies*, 5975C *Agilent Technologies*®, Pennsylvania, USA) utilizando una columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm) y con grosor de película de 0.25 mm (*J&C Scientific*, *Agilent Technologies*®, Pennsylvania, USA). El volumen de inyección fue de 1 µL en modo *Split*. Las condiciones de separación utilizadas fueron, al inicio, una temperatura de 70 °C por dos minutos con dos incrementos de rampa, el primero de 20 °C por minuto hasta alcanzar los 230 °C y el segundo fue de 8 °C por minuto hasta llegar a los 280 °C, manteniéndose por cinco

minutos. El tiempo total de análisis fue 21.25 min. El rango de masa detectado fue de 35 m/z a 750 m/z, la muestra fue ionizada por impacto electrónico a 70 eV, y la temperatura alcanzada por la fuente de ionización fue de 230 °C. La identificación de los compuestos fue llevada a cabo por comparación con la biblioteca de la base de datos del *National Institute of Standards and Technology* (NIST) versión 8.0 (Rivera-Yañez *et al.*, 2017).

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-DAD)

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo HPLC *Hewlett-Packard* HP modelo 1100 (*Hewlett-Packard*, Wilmington DE, Estados Unidos) con un detector de matriz de diodos (DAD) 1100 operado con *ChemStation* A0903 utilizando una columna *Discovery* C-18. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol:acetonitrilo:agua (25:25:50) acidificada con ácido fórmico (1%), a una corrida de 60 min, separación isocrática a 269 bar de presión y un rango de temperatura de 23 °C; velocidad de flujo, 1 ml/min; matriz de detectores de diodos con ajuste del detector a 260 nm y escaneo completo de 200 nm-400 nm. Se inyectaron 30 µL del extracto de propóleo (3 mg/ml). Los constituyentes se identificaron con base a una comparación del tiempo de retención y el espectro UV con estándares (Rivera-Yañez *et al.*, 2018).

Evaluación de la actividad antibacteriana

La evaluación antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) (Kiehlbauch *et al.*, 2000) empleando los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 8739, proporcionados por el Laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Preparación de los discos de papel filtro (sensidiscos)

Este procedimiento se realizó como se describe en la normatividad mexicana (DOF, 2017). Se impregnaron discos de papel filtro estériles con 6 mg/10 µL de la muestra a evaluar. Como testigo negativo se utilizaron discos impregnados con etanol al 70%, y como testigo positivo se utilizó un sistema de Multidiscos® combinados que contiene 12 antibióticos (BIORAD, Cat 200902260018).

Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de crecimientos en caldo Mueller-Hinton (MH), que fueron estandarizados utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (DLAB, SP-UV1000, China) a una longitud de onda de 625 nm con lecturas de absorbancia entre 0.08-0.12. Se procedió a realizar un sembrado masivo sobre placas de agar MH suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno, colocando los discos impregnados con las muestras a evaluar, los testigos negativos y positivos. Se incubaron por 24 h a 37 °C; transcurrido el tiempo, se midieron los halos de inhibición y se reportaron en mm (*Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI], 1999; DOF, 2017).

Actividad antibacteriana del EEP con la adición de chalconas sintéticas

Se realizaron modificaciones a las metodologías utilizadas para los ensayos de evaluación de sinergia entre EEP y antimicrobianos (Mirzoeva, Grishanin & Calder, 1997; Stepanović, Antić, Dakić & Švabić-Vlahović, 2003).

Este ensayo se realizó preparando diferentes concentraciones de EEP de 1 mg/ml a 5 mg/ml y una concentración de 1 mg/ml para cada chalcona. Se realizaron los cálculos químicos necesarios para tener cada una de las siguientes combinaciones entre cada chalcona con cada EEP:

Combinación 1: una parte de chalcona/una parte de EEP (1:1);

Combinación 2: una parte de chalcona/dos partes de EEP (1:2);

Combinación 3: una parte de chalcona/tres partes de EEP (1:3);

Combinación 4: una parte de chalcona/cuatro partes de EEP (1:4); y

Combinación 5: una parte de chalcona/cinco partes de EEP (1:5).

Se impregnaron discos estériles con 10 μ L de cada combinación y se realizó el procedimiento para evaluar la actividad antibacteriana como se describió con anterioridad.

Análisis estadístico

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

Resultados y Discusión

Síntesis de chalconas

Se obtuvieron tres productos: la chalcona 1,3-difenilpropil-2E-1-ona (PLCR-1) y dos análogos con sustituyentes hidroxilo en los anillos A y B: 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4,6-trihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-2) y 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(2,4-dihidroxifenil)prop-2E-en-1-ona (PLCR-3) (figura 3).

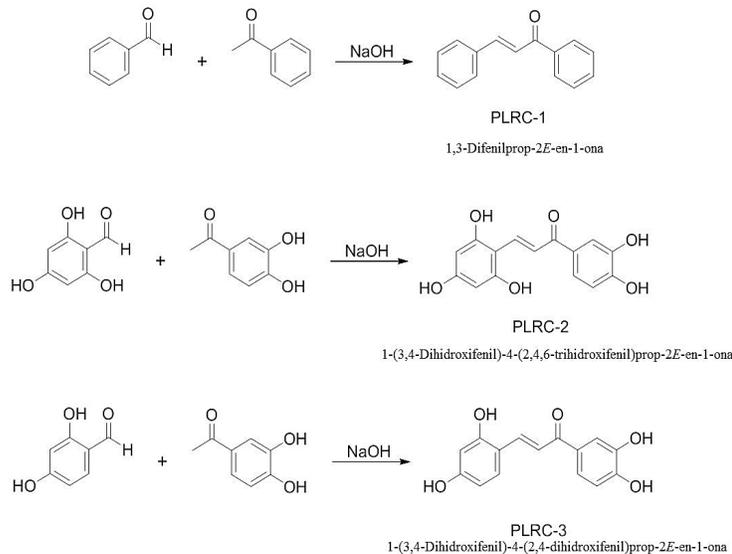
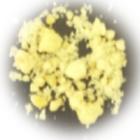
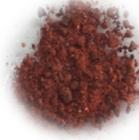


Figura 3. Síntesis general de chalconas PLCR 1-3.

Fuente: Elaboración propia.

Los porcentajes de rendimiento fueron satisfactorios con un valor promedio de 85% (tabla 1), lo cual es de gran importancia debido a que se utilizan catalizadores selectivos y que no afectan al medio ambiente, además de ser métodos más rápidos y eficientes (Rodríguez *et al.*, 2019).

Tabla 1. Especificaciones de las chalconas sintetizadas.

	PLCR-1 Cristales amarillos	PLCR-2 Polvo café	PLCR-3 Polvo rojo
Aspecto			
Peso obtenido (g)	13	5	6.7
Rendimiento (%)	88	71	96
Punto de fusión no corregido (°C)	47	100	230
Punto de fusión publicado (°C)	55 – 57	Estos datos no se encuentran reportados en la base del sistema <i>SciFinder</i> , considerando que son compuestos nuevos.	

Fuente: Elaboración propia.

Composición química de los propóleos

Los principales responsables de la actividad biológica de los propóleos son los compuestos fenólicos y flavonoides, que están en relación con la fuente vegetal, el método y la época de recolección y clima de la región (Delgado, Andrade & Ramírez, 2018).

Para la producción y recolección de la muestra del Estado de México (EM) se utilizan mallas plásticas, lo que evita la manipulación de la resina y que su composición química no sea alterada, cumpliendo la normatividad mexicana (DOF, 2017). Los resultados de la composición química de ambos propóleos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Composición química de los propóleos mexicanos estudiados.

Muestra	% Fenoles	% Flavonoides
Cuautitlán Izcalli, Estado de México	12.9 ± 0.001 ^a	5.4 ± 0.001 ^a
San José Iturbide, Guanajuato	7.5 ± 0.002 ^b	1.8 ± 0.74 ^b
Parámetro establecido en la NOM	Mínimo 5%	Mínimo 0.5%

* Cada valor es la media ± desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos por cromatografía muestran la presencia de flavonoides, ácidos grasos y cetonas (tabla 3, figura 4 y 5), que concuerdan con lo reportado por otros autores en estudios realizados a muestras del mismo apiario (Flores, 2016; González-Búrquez *et al.*, 2018; Londoño-Orozco *et al.*, 2010; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2020).

Tabla 3. Constituyentes del propóleo del Estado de México detectados por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	23.707	5.5	Ácido palmítico	Ácido graso	Fragancias en cosméticos, saborizante	National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2018a)
2	25.094	2.9	2-Nonadecanona	Cetona	Antibacteriana	Mihigo, Masesane, Sichilongo & Ndombele (2015)

3	25.801	3.5	Ácido oleico	Ácido graso	Cardioprotector	NCBI (2018b)
4	29.594	68	Pinocembrina	Flavonoide	Antimicrobiana, antioxidante, antiparasitaria	López, Ming & Towers (2002); Rasul <i>et al.</i> 2013

Fuente: Elaboración propia.

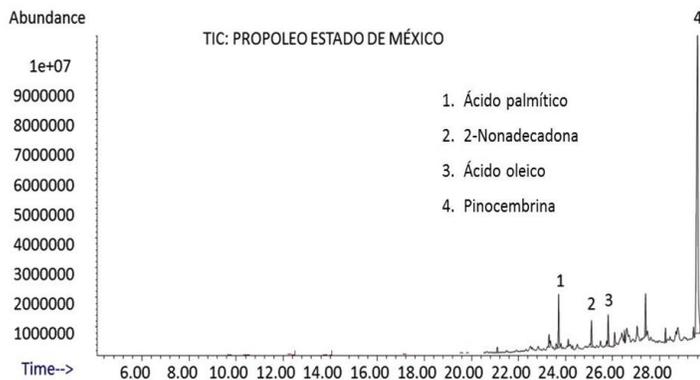


Figura 4. Cromatograma de gases correspondiente al propóleo de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
Fuente: Elaboración propia.

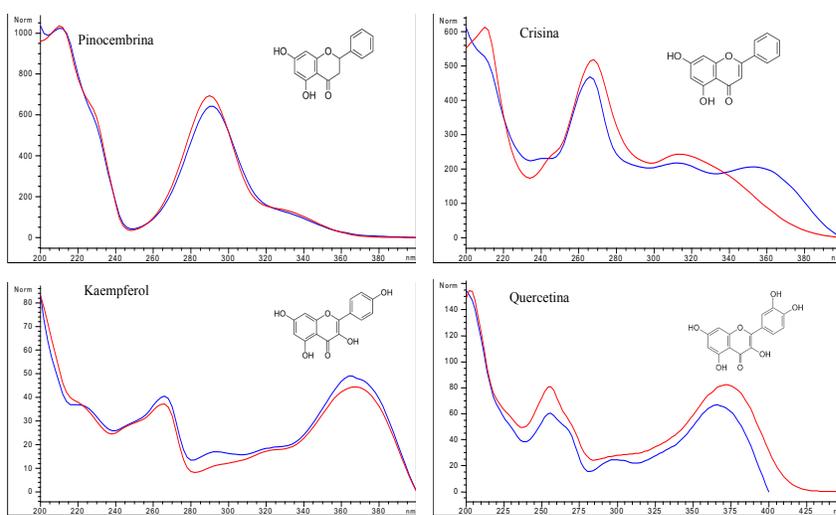


Figura 5. Espectros de absorción UV-Vis de los flavonoides detectados en el propóleo del Estado de México por HPLC-DAD y estructuras químicas entre 200 nm y 425 nm. Línea roja: espectro de absorción del estándar, línea azul: espectro de la muestra.
Fuente: Elaboración propia.

En el caso del propóleo de Guanajuato (G), se utilizó la técnica de raspado y se relaciona con la detección de únicamente un terpeno presente en los aceites esenciales del mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.), la (*E*)- α -Damascona (tabla 4) (García-Andrade *et al.*, 2013). Rodríguez-Pérez *et al.* (2020) reportan resultados similares a este estudio, pudiendo justificar que la presencia de terpenos en los propóleos de este apiario se debe a la producción y recolección en verano y otoño, como lo reportan Bankova *et al.* (2016). En la técnica de HPLC-DAD no hubo coincidencias entre lo detectado y la base de datos del equipo.

Tabla 4. Constituyentes del propóleo de San José Iturbide, Guanajuato, caracterizado por CG-EM.

Pico	TR (min)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
1	29.166	18.8	(E)- α -Damascona	Terpeno	Antimicrobiana	NIST (2011)

Fuente: Elaboración propia.

Actividad antibacteriana

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana contra *S. aureus*, empleando los dos EEP y las chalconas PLRC 1-3, de manera individual, y de las combinaciones A-E de las chalconas:EEP, se muestran en la tabla 5. Se observa diferencia significativa entre los halos de inhibición de los testigos positivos y las muestras estudiadas. El efecto del extracto del EM sobre *S. aureus* se incrementó al adicionar las chalconas hidroxisustituídas PLRC-2 y PLRC-3, siendo más efectiva la PLRC-3 en proporción 1:1 y 1:5, al tener un halo de inhibición de 14 mm, superior al obtenido por el extracto de propóleo de 12 mm y por la chalcona de manera individual (9.7 mm).

Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos de propóleos y las chalconas, de forma individual, y de la adición de las chalconas 1-3 a los EEP, frente a *Staphylococcus aureus*.

Sustancia evaluada	Halo de inhibición (mm)
Amikacina (30 μ g)	9.8 \pm 0.8 ^a
Ampicilina (10 μ g)	0
Cefalotina (30 μ g)	0
Ceftriaxona (30 μ g)	0
Cloranfenicol (30 μ g)	12.0 \pm 0.6 ^b
Dicloxacilina (1 μ g)	8.5 \pm 0.5 ^c
Enoxacina (10 μ g)	0
Eritromicina (15 μ g)	0
Gentamicina (10 μ g)	10.0 \pm 0.6 ^d
Netilmicina (30 μ g)	0
Penicilina (10 U)	0
Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 μ g)	0
Etanol al 70%	0
Extracto de Estado de México (EM)	12.0 \pm 0.0 ^b
Extracto de Guanajuato (G)	12.0 \pm 0.6 ^b
PLRC-1	0
PLRC-2	14.3 \pm 0.6 ^c
PLRC-3	9.7 \pm 0.6 ^a

Actividad antibacteriana de los EEP con la adición de chalconas							
Halo de inhibición (mm)							
Combinación evaluada (Chalcona: EEP)	PLRC-1		PLRC-2		PLRC-3		
	EM	G	EM	G	EM	G	
01:01	0	0	9.7 \pm 0.6 ^a	11.3 \pm 1.2 ^a	13.7 \pm 1.2 ^a	14.0 \pm 1.0 ^a	
01:02	0	0	11.0 \pm 1.0 ^a	0	7.3 \pm 0.6 ^b	7.3 \pm 0.6 ^b	
01:03	0	0	0	0	10 \pm 0.0 ^c	8.0 \pm 0.0 ^b	
01:04	0	9.7 \pm 0.6 ^a	0	0	10 \pm 0.0 ^c	11.3 \pm 0.6 ^c	
01:05	9.0 \pm 1.0	9.3 \pm 0.6 ^a	10.0 \pm 0.0 ^a	7.0 \pm 1.0 ^b	14.0 \pm 1.0 ^a	11.0 \pm 1.0 ^c	

*Cada valor es la media \pm desviación estándar, $n = 3$; Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). EM: Estado de México, G: Guanajuato

Fuente: Elaboración propia.

El efecto del EEP de G sobre esta bacteria se presentó al adicionar la PLRC-3 en proporción 1:1, con un incremento en el diámetro del halo de inhibición (14 mm). Es importante mencionar que el efecto antibacteriano presentado con las proporciones 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5 no puede relacionarse exclusivamente con

la chalcona, pues se encuentra en menor proporción, siendo importante realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana empleando los dos EEP y las chalconas PLRC 1-3, de manera individual contra *E. coli*, se muestran en la tabla 6. En el caso de la muestra del EM frente a *E. coli*, se presentan halos de inhibición con la adición de las chalconas hidroxisustituidas, pero que no son superiores al que presentan las chalconas de manera individual. No se presentó potencialización con el propóleo de G frente a *E. coli*, únicamente un halo de inhibición en la mezcla EEP G + PLCR-2 en proporción 1:1, sin diferencia significativa al halo generado por la chalcona.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de los extractos de propóleos y las chalconas, de forma individual, y de la adición de las chalconas 1-3 a los EEP, frente a *Escherichia coli*.

Sustancia evaluada	Halo de inhibición (mm)					
Amikacina (30 µg)	17.0 ± 0.6 ^a					
Ampicilina (10 µg)	0.0					
Cefalotina (30 µg)	0.0					
Ceftriaxona (30 µg)	25.0 ± 1.0 ^b					
Cloranfenicol (30 µg)	28.0 ± 0.6 ^b					
Dicloxacilina (1 µg)	0.0					
Enoxacina (10 µg)	0.0					
Eritromicina (15 µg)	0.0					
Gentamicina (10 µg)	14.0 ± 1.0 ^c					
Netilmicina (30 µg)	18.0 ± 0.6 ^{a,d}					
Penicilina (10 U)	0.0					
Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 µg)	30.0 ± 0.6 ^b					
Etanol al 70%	0.0					
Extracto de Estado de México (EM)	0.0					
Extracto de Guanajuato (G)	0.0					
PLRC-1	0.0					
PLRC-2	12.0 ± 0.6 ^d					
PLRC-3	10.0 ± 0.6 ^f					
Actividad antibacteriana de los EEP con la adición de chalconas						
Halo de inhibición (mm)						
Combinación evaluada (Chalcona: EEP)	PLRC-1		PLRC-2		PLRC-3	
	EM	G	EM	G	EM	G
1:1	0.0	0.0	10.3 ± 0.6 ^a	12.3 ± 0.6	0.0	0.0
1:2	0.0	0.0	9.3 ± 0.6 ^a	0.0	8.7 ± 0.6	0.0
1:3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1:4	0.0	0.0	9.7 ± 0.6 ^a	0.0	0.0	0.0
1:5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

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

Los propóleos muestran diferente actividad antimicrobiana y es atribuido a la compleja composición de la resina como lo mencionan Hegazi, Hilal & Abd (2014), pues se observa que ambos extractos de propóleos inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, sin presentar acción sobre *E. coli*. Los resultados concuerdan con los reportados por Sagdic, Silici & Yetim (2007) y Akca et al. (2016), observando la sensibilidad de las bacterias Gram positivas y resistencia de las bacterias Gram negativas frente a los extractos de propóleo.

El mecanismo de acción de los propóleos ha sido explicado por estudios del efecto bacteriostático y bactericida de flavonoides, ácido caféico, ácido benzoico y ácido cinámico, principalmente, sobre la estructura bacteriana por la alteración en los canales iónicos a consecuencia de reacciones de fosforilación y desfosforilación, provocando la inhibición de la motilidad bacteriana, factor importante en la virulencia y que ha sido demostrado por Mirzoeva *et al.* (1997) y Farnesi, Aquino-Ferreira, De Jong, Bastos & Soares (2009).

Por otro lado, las chalconas PLRC-2 y PLRC-3, de forma individual, presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ambas bacterias, siendo más efectiva la PLRC-2. Estos resultados apoyan lo descrito por Wang, Li & Bi (2018), quienes mencionan reportan que el grupo carbonilo α,β -insaturado, la posición y la cantidad de los grupos hidroxilo que presentan los anillos aromáticos son factores importantes que causan también alteración en la estructura de bacterias como *S. aureus* y *E. coli* (Desai & Desai, 2003), lo que abre la posibilidad de investigar a estas chalconas como nuevos potenciales antibacterianos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, haciendo mención que los estudios realizados frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (SAMR), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) y bacterias Gram negativas (*Bacillus proteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus typhi*, *Proteus vulgaris*) son estudios realizados *in vitro* (Liu *et al.*, 2017; Nielsen, Boesen, Larsen, Schønning & Kromann, 2004).

Los resultados de la evaluación de la potencialización de la actividad antibacteriana para *S. aureus* se muestran en la tabla 5. El efecto del extracto del EM sobre *S. aureus* se potencializó al adicionar las chalconas hidroxisustituidas, siendo más efectiva la PLCR-3 en proporción 1:1 y 1:5, al presentar un halo de inhibición de 14 mm, superior al obtenido por el extracto de 12 mm y por la chalcona de manera individual (9.7 mm). El efecto del EEP de G sobre esta bacteria se presentó al adicionar la PLCR-3 en proporción 1:1, con un incremento en el diámetro del halo de inhibición (14 mm).

En el caso de la muestra del EM frente a *E. coli*, se presentan halos de inhibición con la adición de las chalconas hidroxisustituidas, pero que no son superiores al que presentan las chalconas de manera individual, presentándose un posible efecto antagónico. No se presentó potencialización con el propóleo G frente a *E. coli*, únicamente se presentó un halo de inhibición en la mezcla EEP G + PLCR-2 en proporción 1:1, sin diferencia significativa al halo generado por la chalcona, como se observa en la tabla 6.

Los resultados obtenidos de esta investigación son preliminares y pioneros en la adición de chalconas sintetizadas a extractos etanólicos de propóleos para incrementar su actividad antibacteriana, pues solo se han realizado estudios utilizando antimicrobianos comerciales (Akca *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Stepanović *et al.*, 2003). Se observa que se presenta un sinergismo o antagonismo en la actividad antibacteriana en relación al microorganismo evaluado y la proporción utilizada entre el EEP y la chalcona, siendo necesarios estudios de los mecanismos de acción de estos compuestos y de la mezcla con el propóleo para el desarrollo futuro de compuestos clínicamente útiles como lo recomiendan Zhou & Xing (2015). Estos autores realizaron investigaciones del mecanismo de acción de las chalconas, únicamente en las actividades anticancerígenas, antiinflamatorias y antidiabéticas. Es por ello que, con el fin de ir esclareciendo los mecanismos de acción antibacteriana de las chalconas sintetizadas en este trabajo, es necesaria la realización de estudios en microscopía electrónica, genética y biología molecular, que permitan apreciar el daño estructural en los microorganismos probados.

Sahu, Balbhadra, Choudhary & Kohli (2012) reportan que las chalconas sintéticas con diferentes sustituyentes químicos han demostrado tener una mejor actividad que los fármacos estándar y podrían servir como compuestos principales para el desarrollo de nuevos fármacos; por lo anterior, es recomendable la evaluación de la citotoxicidad de las chalconas y de obtener resultados favorables,

profundizar en las investigaciones de la aplicación de estos compuestos como posibles agentes antimicrobianos y la realización de estudios *in vivo* y realizar el estudio con cepas de aislamientos clínicos con el propósito de evaluar la resistencia antimicrobiana a nuevos compuestos.

Finalmente, los antecedentes de este proyecto son el establecimiento de las pruebas necesarias para determinar la actividad biológica de los propóleos mexicanos, encontrando propóleos de baja actividad biológica y que impactan a la económica del apicultor, pues él realiza la producción y recolección para elaborar productos con fines terapéuticos. Por lo anterior, se considera importante potencializar la actividad de este producto apícola, pues la producción de propóleos podría brindar al apicultor alternativas económicas por sus propiedades biológicas incrementadas, que podrían proporcionar grandes beneficios en la salud animal, la inocuidad alimentaria y fomentar la creación de nuevos nichos en el mercado nacional al implementar los propóleos como materia prima. Por esto, es importante mencionar que, para la aplicación práctica de este ensayo, es necesaria la realización de pruebas piloto para implementar la adición de chalconas a propóleos de baja actividad, así como evaluar el costo-beneficio utilizando una cantidad no menor a cinco litros de producto.

Conclusiones

La actividad antibacteriana de los propóleos se determina por la presencia y cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides que si se encuentran en bajas cantidades o ausentes, la actividad es baja o nula.

En este estudio, la chalcona PLRC-3 fue más efectiva para potencializar el efecto antibacteriano de los extractos de propóleo frente a *S. aureus*. Por lo tanto, el incremento de la actividad antibacteriana de un propóleo con la adición de chalconas está en relación con microorganismo evaluado y la proporción utilizada entre el EEP y la chalcona.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido de los proyectos: UNAM-DGAPA PAPIIT IT 200915, PAPIIT IN217118, PAPIIT IN223719, FESC:PIAPIC 1632, FESC PIAPI 1802.

Referencias

- Akca, A. E., Akca, G., Topçu, F., Macit, E., Pıkdöken, L., & Özgen, I. (2016). The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: An *in vitro* study. *BioMed Research International*, 2016, 1-8. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/3627463>
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.004
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., Barbosa, I., Danert, C., Nogueira, M., Falcão, S. I., Isla, M. I., Nieva, M. I., Papotti, G., Popova, M., Basso, K., Salas, A., Frankland, A. C. H., Vilczaki, N., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., Trusheva, B., Vilas-Boas, M., Wilson, M., & Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49. doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- Blanco, M., Dip, A., Torres, E., Peña, D., Vogel, C., Bullain, M. & Fajardo, L. (2016). Actividad antibacteriana *in vitro* de nuevas chalconas halogenadas. *Química Viva*, 15(2), 17-28. Recuperado el 8 de enero de 2020 de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v15n2/E0035.pdf>
- Chetana, B. P., Mahajan, S. K., & Suvarna, A. K. (2009). Chalcone: A versatile molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(3), 11-22. Recuperado el 8 de enero de 2020 de <https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/Vol1Issue3/pdf/jpsr01030902.pdf>

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline. Recuperado el 26 de febrero de 2019 de https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf
- Delgado, M. L., Andrade, J. A., & Ramírez, C. A. (2018). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 74-87. doi: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i28.270>
- Desai, N. J., & Desai, K. R. (2003). Synthesis and antibacterial activity of chalcone and 2-Amino pyrimidine and their related compound. *Asian Journal of Chemistry* 15(2), 650-654. Recuperado el 9 de octubre de 2019 de http://www.asianjournalofchemistry.co.in/user/journal/viewarticle.aspx?ArticleID=15_2_13
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Reigosa, M. J., & Sánchez-Moreiras, A. M. (2016). Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha*, 34(3), 607-616. doi: <https://doi.org/10.1590/s0100-83582016340300022>
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (6 de octubre de 2017). NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (Sagarpa). Recuperado el 6 de octubre de 2017 de http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6794/sagarpa11_C/sagarpa11_C.html
- Farnesi, A. P., Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J. K., & Soares, A. E. E. (2009). Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 635-640. doi: <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr023>
- Fischer, G., Rochedo, F., Pereira, F., Alves, L., D'Avila, G., de Oliveira, S., Dellagostin, O. A., Paulino, N., Scremin, A., & Vidor, T. (2007). Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25(7), 1250-1256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.005>
- Flores Rodríguez, I. S., Moreno Monteagudo, M., Londoño Orozco, A., & Cruz Sánchez, T. A. (2016). Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomycosis in Horses. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6, 1-8. doi: [10.4236/ojvm.2016.61001](https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.61001)
- García-Andrade, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Rosales-Castro, M., & Medina-Torres, L. (2013). Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*. 44(2013), 336-342. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.030>
- González-Búrquez, M. J., González-Díaz, F. R., García-Tovar, C. G., Carrillo-Miranda, L., Soto-Zarate, C. I., Canales-Martínez, M. M., Penieres-Carrillo, J. G., Cruz-Sánchez, T. A., & Fonseca-Coronado, S. (2018). Comparison between *In Vitro* antiviral effect of Mexican propolis and three commercial flavonoids against canine distemper virus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018, 1-9. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/7092416>
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(4), 1220-1234. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>
- Hegazi, A. G., Hilal, A. M., & Abd, A. (2014). Egyptian propolis 11: Its antimicrobial activity with comparison with different localities. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(9), 530-538. Recuperado el 2 de octubre de 2019 de <https://pdfs.semanticscholar.org/bd22/66ea1d2e89528480ac07ffa020c01da359e6.pdf>
- Hormaza, A., Arbeláez, O. F., & Montes, N. (2009). Synthesis and spectroscopic characterization of a series of chalcones. *Scientia et Technica*, 15(43), 316-321. Recuperado el 02 de octubre de 2019 de [Dialnet-SintesisYCaracterizacionEspectroscopicaDeUnaSerieD-4726074.pdf](https://doi.org/10.18257/raccefyn.309)
- Insuasty-Obando, B. (2016). Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 234-243. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.309>
- Kiehlbauch, J. A., Hannett, G. E., Salfinger, M., Archinal, W., Monserrat, C., & Carlyn, C. (2000). Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York State laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3341-3348. Recuperado el 2 de octubre de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87384/>

- Liu, H., Gopala, L., Avula, S. R., Jeyakkumar, P., Peng, X., Zhou, C., & Geng, R. (2017). Chalcone-Benzotriazole conjugates as new potential antimicrobial agents: Design, synthesis, biological evaluation and synergism with clinical drugs. *Chinese Journal of Chemistry*, 35(4), 483-496. doi: <https://doi.org/10.1002/cjoc.201600639>
- Londoño, A., Penieres, J. G., García, C. G., Carrillo, L., Quintero, M. L., García, S. E., Mendoza, M. A., & Cruz, T. A. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en Marcha*, 21(1), 49-55. Recuperado el 2 de octubre de 2019 de https://www.researchgate.net/publication/267271152_Estudio_de_la_actividad_antifungica_de_un_extracto_de_propoleo_de_la_abeja_Apis_mellifera_proveniente_del_estado_de_Mexico
- López, A., Ming, D. S., & Towers, G. H. N. (2002). Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaeifolium*. *Journal of Natural Products*, 65(1), 62-64. doi: <https://doi.org/10.1021/np010410g>
- Mahapatra, D. K., & Bharti, S. K. (2016). Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sciences*, 148(1), 154-172. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.048>
- Mihigo, S. O., Masesane, I. B., Sichilongo, K., & Ndombele, L. (2015). Preliminary GC-MS profiling and anti-bacterial activity investigation of *Chromolaena odorata* Linn. R.M. King and H. Robinson (Asteraceae). *International Journal of Chemistry and aquatic sciences* 1(1), 38-49. Recuperado el 2 de octubre de 2019 de <http://chemistryjournal.kypublications.com/1.1.15/38-49.pdf>
- Miguel, M., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., & Antunes, M. D. (2014). Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology* 34(1), 16-23. doi: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100002>
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152(3), 239-246. doi: [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80034-1)
- Naggar, Y., Sun, J., Robertson, A., Giesy, J. & Wiseman, S. (2016). Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian propolis. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 305-314. doi:10.1080/00218839.2016.1233700
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018a). PubChem Database. CID=5373026. Recuperado el 22 de agosto de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019308>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018b). PubChem Database. CID=5373026. Recuperado el 22 de agosto de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019301>
- National Institute of Standards and Technology (NIST). (2011). Chemistry WebBook of NIST. Recuperado el 22 de agosto de 2018 de <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=E%29-%CE%B1-Damascone&Units=SI>
- Nielsen, S. F., Boesen, T., Larsen, M., Schønning, K., & Kromann, H. (2004). Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4-hydroxy group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(11), 3047-3054. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.071>
- Ramírez, M. E., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A., & Silva, S. Y. (2012). Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 43(4), 7-14. Recuperado el 31 de Marzo de 2020 de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=579/57928311002>
- Rasul, A., Millimouno, F. M., Eltayb, W. A., Ali, M., Li, J., & Li, X. (2013). Pinocebrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International*, 2013, 1-9. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/379850>
- Rivera-Yañez, C. R., Terrazas, L. I., Jiménez-Estrada, M., Campos, J. E., Flores-Ortiz, C. M., Hernandez, L. B., Cruz-Sánchez, T., Garrido-Fariña, G. I., Rodríguez-Monroy, M. A., & Canales-Martínez, M. M. (2017). Anti-*Candida* activity of *Bursera morelensis* Ramírez essential oil and two compounds, α -Pinene and γ -Terpinene-An *in vitro* study. *Molecules*, 22(12), 1-13. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22122095>
- Rivera-Yañez, N., Rodríguez-Canales, M., Nieto-Yañez, O., Jiménez-Estrada, M., Ibarra-Barajas, M., Canales-Martínez, M. M., & Rodríguez-Monroy, M. (2018). Hypoglycaemic and antioxidant effects of propolis of Chihuahua in a model of experimental diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/4360356>

- Rodríguez, P. B., Penieres, C. J., Canales, M. M., Luna, M. R. & Cruz, S. T. (2019). Potencialización de la actividad antifúngica de propóleos. *Biotecnía*, *XXI*(3), 76-85. doi: <http://doi.org/10.18633/biotecnía.v21i3.1014>. Recuperado el 18 de noviembre de 2019 de https://www.researchgate.net/publication/334549517_Potentialization_of_the_Mexican_propolis_antifungal_activity_by_the_addition_of_synthetic_chalcones
- Rodríguez-Pérez, B., Canales-Martínez, M. M., Penieres-Carrillo, J. G., & Cruz-Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, *30*(e2435). doi: <https://doi.org/10.15174.au.2020.2435>. Recuperado el 20 de enero de 2020 de <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/view/2435/3432>
- Roman, A., Madras-Majewska, B., & Popiela-Pleban, E. (2011). Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. *Journal of Apicultural Science*, *55*(2), 97-106. Recuperado el 10 de abril de 2019 de https://www.researchgate.net/publication/263714192_Comparative_study_of_selected_toxic_elements_in_propolis_and_honey
- Sagdic, O., Silici, S., & Yetim, H. (2007). Fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in apple juice treated with propolis extract. *Food Microbiology*, *57*, 345-348. Recuperado el 10 de abril de 2019 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03175071>
- Sahu, N. K., Balbhadra, S. S., Choudhary, J., & Kohli, D. V. (2012). Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: A review. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(2), 209-225. doi: <https://doi.org/10.2174/092986712803414132>
- Sapra, S., Sharma, K., Bhalla, Y., & Dhar, K. L. (2016). Chalconoid derived heterocycles as potent bioactive molecules: A review. *Journal of Chemical Sciences*, *7*(2), 2-8. Recuperado el 15 de noviembre de 2019 de <https://www.hilarispublisher.com/open-access/chalconoid-derived-heterocycles-as-potent-bioactive-molecules-a-review-2150-3494-1000129.pdf>
- Singh, P., Anand, A., & Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *85*, 758-777. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.033>
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(2), 253-260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>
- Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*, *30*(6), 894-905. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>
- Soto-Vásquez, M. R. (2015). Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. *In Crescendo. Institucional*, *6*(2), 22-32. Recuperado el 10 de abril de 2019 de <https://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo/article/view/1051>
- Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I., & Švabić-Vlahović, M. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, *158*(4), 353-357. doi: <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00215>
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, *1*(13), 1-4. doi: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-1-13>
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., SánchezEscalante, J. J., Peñalba-Garmendia, M. C., & Sánchez-Escalante, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotecnía*, *16*(1), 32-37. Recuperado el 16 de octubre de 2019 de <http://biotecnía.unison.mx/index.php/biotecnía/article/view/31/27>
- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 12-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Zhou, B., & Xing, C. (2015). Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. *Medicinal Chemistry*, *5*(8), 388-404. doi: <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000291>