

Extracción e identificación de metabolitos secundarios en extracto hexánico de propóleos

D. Hernández Romero¹, E. Sánchez Pavón¹, J. Calderón Pardo², R. Colorado Peralta¹, M. E. Márquez López*¹

¹LADISER Química Orgánica y Biotecnología, Facultad de Químicas, Universidad Veracruzana, Prolongación de Oriente 6 No. 1009, C.P.94340, Orizaba Ver., Méx

²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Circuito exterior s/n Ciudad Universitaria. Coyoacán CP 04510. D.F México.
elmarquez@uv.mx

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

El propóleos es una resina cérea que las abejas elaboran a partir de exudados y resinas de árboles, plantas y flores, por lo que su composición química es compleja y depende de la flora presente en el área de recolección, lo utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. En el presente trabajo se aislaron e identificaron algunos metabolitos secundarios a partir de propóleos colectado cerca de Angangueo, estado de Michoacán, empleando una cromatografía en columna por gravedad (CCG) del extracto hexánico y monitoreada por medio de cromatografía en capa fina (CCF). Los compuestos obtenidos fueron purificados mediante técnicas de cromatografía en placa preparativa y fueron identificados como 13-epi-torulosol, y el succinato de 13-epi-torulosol. Los derivados semisintéticos que se obtuvieron fueron el acetato de 13-epi-torulosol y el ester metílico del succinato de 13-epitorulosol. Los compuestos obtenidos se caracterizaron mediante técnicas de RMN ¹H y ¹³C.

Palabras clave: Propóleos, metabolito secundario, cromatografía.

Abstract

The propoleos is a waxen resin that the bees prepare from exudados and resins of trees, plants and flowers, therefore its chemical composition that is complex and depends on the present flora in the field of compilation, they use it in the construction, repair and protection of the beehive. In the present work were isolated and identified some secondary metabolites of propoleos collected near Angangueo, Michoacan, by gravity column chromatography (GCC) and the hexane extract was monitored by thin layer chromatography (TLC) was performed. The obtained compounds were purified by preparative plate chromatography techniques and were identified as 13-epitorulosol and 13-epitorulosol succinate. The semisynthetic derivatives obtained were 13-epi-torulosol acetate and 13-epitorulosol succinate methyl ester. The obtained compounds were characterized by techniques of ¹H and ¹³C NMR.

Introducción

La palabra propóleos se deriva del griego pro (en defensa de) y polis (la ciudad), con la cual se designa a la sustancia que recubre la colmena o polis de las abejas y cumple funciones defensivas. El propóleos es una sustancia resinosa y altamente adhesiva, que es colectada, transformada y usada por las abejas para sellar los agujeros, fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores y proteger la entrada contra los intrusos (Figura 1) [Burdock, 1998].

En el pasado, la mayoría de los apicultores consideraban el propóleos como un producto inútil y carente de valor; alejarlo de la colmena era un problema ya que además se debía efectuar cada año. Hace poco, este producto fue reconsiderado, debido al precio que se cotiza en el mercado.



Figura 1. Abeja recolectora "pecoreadora"

Composición química de propóleos

La composición del propóleo es bastante compleja y variada ya que depende de la flora y de las condiciones geográficas y climáticas donde se elabora el producto. Las abejas recolectan las resinas en un perímetro de 1-2 Km alrededor de la colmena y su composición dependerá de la vegetación circundante y de la preferencia de la abeja por un determinado tipo de flores, según su color, aroma, forma y floración [Bankova y col., 2002].

En estudios anteriores se han aislado más de 180 compuestos de los cuales se ha obtenido la composición promedio que se muestra en la Tabla 1. Los compuestos que han resultado con actividad biológica son los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles, flavononas y flavononoles [Yang y col., 2011].

Tabla 1. Composición promedio de propóleos

Composición	(%)	Compuestos, características y observaciones
Resinas	45 – 55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55 – 35	En su mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Terpenos Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predomina la prolina.
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb. Cetonas, lactonas, quinonas, esteroides, Ácido benzoico ésteres. Vitaminas: B1, B2, B3, B6. Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen, azúcares

Actualmente es aceptado y químicamente demostrado que en zonas templadas como Europa, Norte América y regiones no tropicales de Asia, la principal fuente del propóleo son los exudados de los brotes de las especies *Populus* y sus híbridos. Las investigaciones realizadas sobre la composición química de propóleos recolectado en diferentes regiones, tales como Bulgaria, España, Francia, Gran Bretaña, Hungría y México, revelan que el origen de estos es el mismo, y que su fuente principal son las secreciones de los álamos negros (*Populus nigra*) [Bankova y col., 2000, Hegazi y col., 2000].

En las zonas tropicales donde no se encuentran álamos ni abedules, las abejas encuentran disponibles una gran variedad de plantas. Las especies reconocidas en éstas zonas como la mayor fuente de exudados son *Clusia*

spp., *Araucaria heterophylla*, y *Baccharis spp.* Los propóleos de zonas tropicales están compuestos principalmente por ácidos p-cumáricos prenilados, acetofenonas, lignanos, di y triterpenos [Bankova 2000].

Propiedades y actividad biológica

El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos como antibacteriano, antiviral, antifúngico, anticancerígeno, antioxidante, cicatrizante, inmunoenestimulante, anestésico, analgésico, entre otras. [Farré y col., 2004; Kumar y col., 2008; Palomino y col., 2010; Pineda y col., 2010; Valencia y col., 2012]. Los flavonoides (queracetina, apigenina, galangina, etc.) y los ácidos fenólicos (cafeico, isoferúlico, cinámico y benzoico), además de ser tóxicos para las levaduras, inhiben la actividad enzimática de la hialuronidasa y el ácido cafeico y la actividad de la dihidrofolato reductasa, lo cual podría explicar la similitud entre algunos de sus efectos y los de algunos antiinflamatorios no esteroideos [Strehl y col., 1994; Bariliak y col., 1996; Miyataka y col., 1997].

Al estudiar la actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) y antiviral (*Avia influenza*) de propóleos de diferente origen geográfico, se comprueba que todos son activos frente a hongos y cepas bacterianas Gram. (+) y muchas de ellas, también frente al virus de la influenza. En las muestras procedentes de zonas templadas esta actividad se atribuye a sus contenidos en ésteres y ácidos fenólicos, componentes de los que carecen los propóleos de origen tropical que, sin embargo, muestran una actividad similar por su contenido en derivados carbono prenilados del ácido p-cumárico [Kujumgiev A y col., 1999].

Por otra parte debido a la naturaleza antioxidante del propóleo resulta como una alternativa en la industria alimentaria para ayudar en la estabilidad de los alimentos [Vargas y col., 2013].

Debido a que la composición del propóleo varía de acuerdo a la zona de la cual se obtiene, el presente trabajo tiene como finalidad contribuir al conocimiento químico y enriquecer la información sobre propóleos realizando un estudio fitoquímico de muestras colectadas en la sierra madre oriental cerca de Angangueo, estado de Michoacán. Para lo cual se realizó el aislamiento e identificación de algunos de sus metabolitos secundarios y derivados semisintéticos a través de reacciones de acetilación y metilación con diazometano.

Metodología

Materiales

Para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en el propóleo reportado en este trabajo se utilizó cromatografía en columna por gravedad (CCG) con sílica gel (230/400 mesh), la cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) se realizó en cromatoplacas de vidrio ALUGRAM de 20x20 cm sílica 100 G/UV254 de 1.0 mm de espesor. Como métodos de revelado se utilizó luz ultravioleta emitida de una lámpara portátil modelo MODER-UVLS-26 con longitud de onda de 254 nm y posteriormente se empleó como agente cromogénico una solución de 12 gr de sulfato célico amoniacial y 22 mL de ácido sulfúrico. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , fueron determinados en un espectrómetro Brucker-Avance de 400 MHz.

Obtención de los extractos

El propóleo que se utilizó para realizar el presente trabajo se recolectó cerca de Angangueo, estado de Michoacán. El propóleo fue obtenido a través de la técnica de raspado de la colmena. La cantidad que se obtuvo de la muestra fue de 20.15 g, el aspecto que presentaba era color café oscuro, olor dulce, textura sólida y chiclosa con restos orgánicos, (abejas muertas, huevecillos, palos, etc). La muestra fue desmenuzada y colocada en un matraz elermeyer de 500 ml y se le agregaron 300 ml de hexano, se agitó suavemente durante 90 min a baño maría, esperando a que se disolviera completamente el propóleo, para posteriormente filtrarlo con una gasa para eliminar todo tipo de basura. Posteriormente se volvió a filtrar con papel Whatman a alto vacío para seguir eliminando las partículas que aún quedaban.

El filtrado se colocó en un matraz balón de 500 ml para eliminar el disolvente en el rotavapor, el residuo obtenido se secó con una bomba de alto vacío obteniendo 7.54 g de peso.

Cromatografía en columna del extracto de hexano de propóleos

A 7.54 g de extracto hexánico de propóleos se le realizó la purificación por cromatografía en columna por gravedad (CCG). La columna fue eluida con mezclas de hexano-Acetato de etilo incrementando el porcentaje de acetato de etilo. Se obtuvieron 110 fracciones de 150 ml cada una, las cuales fueron monitoreadas por medio de cromatografía de capa fina (CCF).

Aislamiento de 13-epi-torulosol

Las fracciones 46-51 fueron reunidas obteniéndose 290 mg, los cuales se purificaron en 2 cromatoplacas preparativas, en cada cromatoplaca se utilizaron 72.5 mg de muestra y se eluyó con una mezcla de Hexano-AcOEt 7:3 obteniéndose de la 1^a placa 46.2 mg de 13- epi-torulosol puro y de la 2^a placa 39.6 mg, los cuales se enviaron a RMN ¹H y ¹³C.

Aislamiento del Succinato del 13-epi-torulosol

Las fracciones 102-110 obtenidas de la cromatografía en columna por gravedad (CCG) pesaron 51.7 mg. La comparación de estas fracciones por medio de cromatografía en placa fina con una muestra del Succinato del 13-epi-torulosol previamente obtenido, permitió la identificación del Succinato del 13-epi-torulosol en estas fracciones los cuales se enviaron a RMN ¹H y ¹³C.

Metodología para la obtención de derivados semisintéticos

Procedimiento para la acetilación del 13-epi- torulosol

De la fracción del 13-epi-torulosol se pesaron 224 mg y se disolvieron en 1 mL de piridina, se le adicionó 1.0 mL de anhídrido acético y la mezcla de reacción se dejó en reposo durante 3 horas, al finalizar este tiempo se tomó una cromatoplaca la cual fue eluida con una mezcla de Hexano-AcOEt 7:3, mostrando la formación de dos compuestos. El exceso de reactivos se eliminó en una bomba de vacío. Se purificaron 75 mg de la mezcla de la reacción en 1 placa de 10x20 cm y 1.0 mm de espesor y se eluyó con una mezcla Hexano-AcOEt 7:3 obteniéndose de esta purificación 34.6 mg, los cuales se enviaron a RMN ¹H y ¹³C.

Procedimiento para la esterificación del Succinato de 13- epi-torulosol

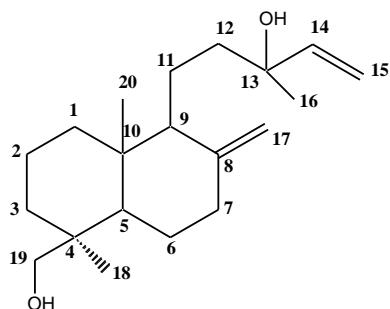
De la fracción del succinato de 13-epi-torulosol se pesaron 51.7 mg y se disolvieron en 10 mL de éter etílico, se adicionó 4 mL de una solución de diazometano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se monitoreo por CCF hasta la desaparición del Succinato. La mezcla de reacción se llevó a sequedad en rotavapor.

Resultados y discusión

Del extracto en hexano del propóleos se obtuvieron 2 diterpenos, de los cuales al 13-epi-torulosol se le realizó una reacción de acetilación y al succinato de 13-epiturolosol una esterificación, obteniendo los derivados semisintéticos correspondientes.

Aislamiento de 13-epi- torulosol

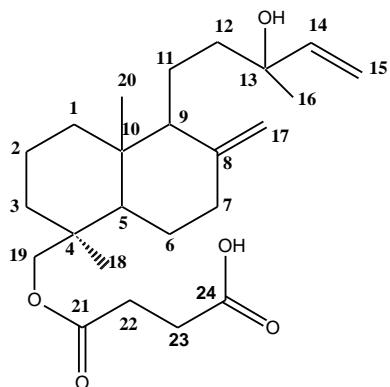
Se obtuvo el primer producto de las fracciones 46-51 resultando ser un sólido blanco translúcido, el cual primero se identificó por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y al purificar se logró elucidar su estructura con apoyo de RMN de ¹H y ¹³C, como un compuesto diterpenoide denominado 13-epitorulosol (Figura 2).

**Figura 2.** Estructura del 13-Epiturolosol

En el espectro de RMN de protón se observan a campo bajo de 4.5-5.9 ppm las señales características de los dobles enlaces que tiene el 13-epiturolosol y a campo alto están todas las señales del resto de los protones. En el espectro total de ^{13}C se observaron 20 señales las cuales corresponden a 20 átomos de carbono, confirmándonos la naturaleza diterpenica del 13-epi-torulosol.

Aislamiento del Succinato de 13-epi-torulosol

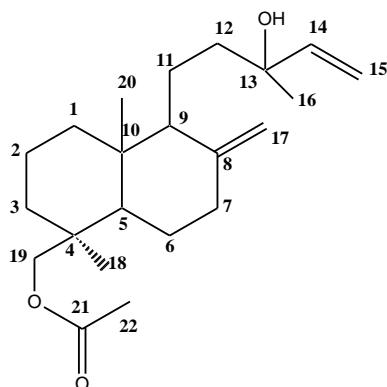
De las fracciones 102-110 de la cromatografía del extracto hexánico se aisló un sólido amarillo claro, el cual se identificó por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y al purificarlo se obtuvo un compuesto que al elucidar la estructura con RMN ^1H se identificó como el diterpeno Succinato de 13-epi-torulosol (Figura 3).

**Figura 3.** Estructura del Succinato del 13-Epiturolosol

Por RMN de ^1H además de las señales del 13 epiturolosol se identificó un múltiplete en la zona entre 2.6-2.68 el cual corresponde a los protones de la posición 22 y 23 respectivamente.

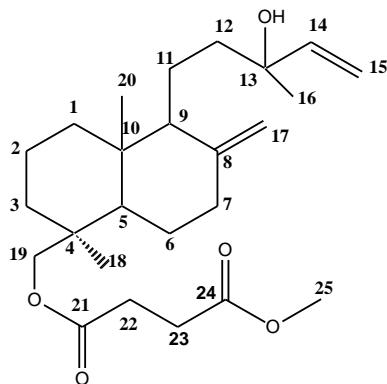
Derivados semisintéticos

Con el 13-epiturolosol y el succinato de 13-epiturolosol que se aislaron se realizaron las reacciones de acetilación y esterificación respectivamente.

**Figura 4.** Estructura del Acetato del 13-Epiturolosol

La acetilación del 13-epiturolosol se hizo con anhídrido acético en presencia de piridina, después de 3 h de reacción por cromatografía de capa fina se observó la formación de dos compuestos menos polares, por lo cual se procedió a purificar, obteniendo el producto deseado (Figura 4). Por RMN de ¹H se observó en 2.05 ppm la señal característica del metilo 22.

La esterificación del succinato del 13-epiturolosol (Figura 5) se realizó con diazometano a temperatura ambiente hasta la completa desaparición por cromatografía de capa fina del producto de partida. Finalmente el producto se obtuvo y por RMN de protón se observa la señal característica del metilo del ester en 3.6 ppm.

**Figura 5.** Estructura del Ester del Succinato de 13-Epiturolosol

La obtención de los derivados semisintéticos permitió confirmar de manera inequívoca los metabolitos aislados del propóleos. Con lo cual se contribuye a la identificación de los derivados terpéticos que se encuentran en el propóleos como parte esencial de su composición.

Trabajo a futuro

En trabajos futuros se pretende identificar los metabolitos presentes en el propóleos aislado con disolventes polares lo cual permitirá aislar otro tipo de metabolitos que no sean de naturaleza terpénica. Por otra parte se estudiará la capacidad antioxidante, así como la actividad antimicrobiana y antiparasitaria en extractos de propóleos extraídos con disolventes de diferente polaridad, además de identificar las características fisicoquímicas del mismo y realizar la evaluación por HPLC de los extractos.

Conclusiones

Del propóleos recolectado en la zona de Angangueo, estado de Michoacán, se aislaron y elucidaron mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13, las estructuras de 2 metabolitos secundarios a partir del extracto hexánico de propóleos los cuales fueron determinados como 13-epitorulosol y Succinato de 13-epitorulosol. Finalmente con estos metabolitos se obtuvieron dos derivados semisintéticos identificados como acetato de 13-epi-torulosol y el ester metílico del succinato de 13-epitorulosol.

Referencias

1. Bariliak IR.; Berdyshev GD.; Dugan AM. (1996). The antimutagenic action of apiculture products. *Tsitol Genet*, **(30)**, 48-55.
2. Burdock, G. A. (1998). Review of the biological proprieties and toxicity of bee propolís (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, **(36)**, 347- 363.
3. Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A-G. (2002). Chemical composition of European propolís: expected and unexpected results. *Zeitchrift fur Naturforschung*, **(57c)**, 530-533.
4. Bankova, V. S.; Castro, S. L. D.; Marcucci M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **(31)**, 3-15.
5. Farré, R.; Frasquet, I.; Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharm*, **(45)**, 21-43
6. Hegazi A.; Abd El Hady F., Abd Allah F. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolís. *Z. Naturforsch*, **(55)**, 70-75.
7. Kumar N.; Mueen-Ahmad KK.; Dang R.; Husain A. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. *J. Med. Plants Res*. **(2)**, 361-364.
8. Kujumgiev A.; Tsvetkova I.; Serkedjieva Y.; Bankova V.; Christov R.; Popov S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Etnopharmacol*, **(64)**, 235-240.
9. Miyataka H.; Nishiki M.; Matsumoto H.; Fujimoto T.; Matsuka M.; Satoh T. (1997). Evaluation of propolis. 1. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull*, **(20)**, 496-501.
10. Palomino GR.; Martínez GJ.; García PM.; Gil GJ.; Durango RD. (2010) Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev. Fac. Nac. Agric. Medellín*, **(63)**, 5373-5383.
11. Pineda J.; Principal J.; Barrios C.; Milla D.; Solano Y.; Gil E. (2010) Propiedad fungistática *in vitro* de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Zootecn. Trop*. **(28)**, 83-91.
12. Strehl E.; Volpert R.; Elstner EF. (1994). Biochemical activities of propolis extracts. III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Z Naturforsch C*, **(49)**, 39-43.
13. Valencia D.; Alday E.; Robles-Zepeda R.; Garibay-Escobar A.; Galvez-Ruiz JC.; Salas-Reyes M.; Jiménez-Estrada M.; Velazquez-Contreras E.; Hernandez J.; Velazquez C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem*. **(131)**, 645-651.
14. Vargas S. R.D.; Torrescano U.G.R.; Sánchez E. A. (2013). El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*. **(38)**, 705-711.
15. Yang H.; Dong Y.; Du H.; Shi H.; Peng Y.; Li X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* **(16)**, 3444-3455.