



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Ciencias con mención en
Microbiología

**Interacciones entre compuestos mayoritarios anti-*Helicobacter pylori*
presentes en propóleos de la región del Biobío.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología

MARIO HERBERT ROMERO RIVERA

CONCEPCIÓN-CHILE

2017

Profesor Guía: Dr. Carlos González Correa

Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

© Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Edgar Pastene Navarrete
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Mariana Domínguez Yévenes
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Mario Aranda Bustos
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



DEDICATORIA:

A Dios y mi familia. A mi Mamá María del Rosario Rivera, mi Papá Mario Romero, mi hermana Jazmín Romero Rivera y mi mamá abuelita Angelina Pérez, quienes pese a la distancia me acompañaron siempre en esta aventura, gracias por dejarme volar, por alentarme a nunca rendirme y seguir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A la agencia chilena de cooperación internacional para el desarrollo (AGCID) por seleccionarme y ser beneficiario del programa de becas de cooperación horizontal, convocatoria año 2015, gracias por permitir la formación de capital humano de mi país El Salvador. A los proyectos Fondecyt 1150948, Fondequip EQM150025 y Fondequip N° EQM 130209 los cuales contribuyeron a la realización del estudio analítico de esta tesis.

A mi profesor guía Dr. Carlos González que aun con sus múltiples ocupaciones siempre destinó tiempo de calidad para orientarme en la realización de esta tesis, por ayudarme a cuestionar, interpretar y discutir mis resultados para lograr sacar de ellos el máximo provecho, por contribuir con su ejemplo a mi formación académica y profesional ayudándome a ser más crítico. A mi profesor co-guía Dr. Edgar Pastene gracias por su comprensión y por el trabajo en conjunto (supervisión) de los ensayos analíticos de esta tesis, por compartir sus experiencias en la investigación y por ser un ejemplo de ocurrencia científica al tener ideas originales fuera de serie. Ha sido un gusto, un honor, un privilegio ser su “discípulo” muchas gracias por mostrarme como se hace ciencia.

A la profesora Dra. Apolinaria García, a quien tengo un infinito agradecimiento tanto académico como personal, mi ejemplo a imitar en muchos aspectos profesionales y personales, quedaran grabados en mi mente y corazón todos los consejos, pláticas, momentos y experiencias compartidas. A los profesores que forman parte de mi comisión evaluadora de tesis Dra. Mariana Domínguez y Dr. Mario Aranda, gracias por la oportuna revisión, opiniones y observaciones que contribuyeron a obtener una mejor investigación.

A mis amigos chilenos los lechones María José, Alejandra, Romina, Eillen y Jonathan, gracias por ser un gran soporte emocional en este tiempo, por los almuerzos y toda la comida compartida, por aguantarme, por aprender a conocernos, por su ayuda tanto en lo académico como en lo personal, por ser buenos compañeros de curso como de laboratorio, la amistad es un tesoro y con ustedes lo encontré.

A mi amigo Nicaragüense Ali, esta experiencia nos regaló la oportunidad de ser un apoyo el uno del otro estando tan lejos de los nuestros, te convertiste en un hermano. A la familia García-Guidotti: don Rafael, Gianfranco, Ángela, Waleska, Tomás, Raffaello, Tío Tucu, Abuelita Rosa, Tía Carmen, Tía Teli, gracias por todo y por hacerme sentir como uno más de la familia, Dios les bendiga, el cariño y aprecio es reciproco.

A mis amigas del laboratorio de Patogenicidad Bacteriana: Valeria, Sixta, Michelle y mis compañeros Enrique, Cristian Parra, Marcela, Paulina, Marco, gracias por mantener un ambiente ameno de trabajo y por ayudarme en lo que estuvo a su alcance. A la señora Angélica por ser siempre amable y ayudarme con el material de laboratorio que necesitaba. A Paula por su eficiencia y auxilio en los trámites administrativos siempre dispuesta a solucionar muy gentil.

RESUMEN

Aproximadamente el 50% de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori* convirtiéndose en una bacteria que participa en la causalidad de gastritis aguda y crónica, y de patologías como la úlcera péptica, linfoma de MALT, atrofia gástrica y es el principal factor de riesgo en el desarrollo del cáncer gástrico. La resistencia antibacteriana parece ser la causa principal del fracaso de los tratamientos de erradicación de este patógeno. En consecuencia, la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad de inhibir o matar *H. pylori* ha sido necesario. Dado que la región del Biobío es una región apícola, se exploró la presencia de moléculas activas anti-*H. pylori* entre sus más de 300 compuestos químicos, incluidos flavonoides y ácidos fenólicos. En esta tesis se propuso determinar si los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en el propóleo son los responsables de su actividad anti-*H. pylori* y si existe interacción entre éstos para generar dicho efecto. Para ello se realizó un estudio analítico que consistió en la sustracción química de los compuestos mayoritarios por medio de Cromatografía de Partición Centrifuga (CPC), se purificaron por HPLC semipreparativo, se cuantificaron por HPLC-DAD y se confirmó su identidad a través de TLC-MS interface. El análisis microbiológico de la actividad anti-*H-pylori* de estos compuestos se verificó por medio del ensayo de difusión en agar, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada compuesto polifenólico mayoritario, la CMI en mezclas de estos compuestos, además se estableció la cinética de muerte bacteriana en el tiempo de las mejores mezclas de compuestos mayoritarios observando si ocurría un cambio morfológico en la bacteria a través de microscopia electrónica de transmisión (TEM). Los resultados mostraron que fueron seis los compuestos polifenólicos mayoritarios que corresponden a crisina, pinocembrina, galangina, CAPE, canferol y pinobansina-3-o-acetato en propóleos de la región del Biobío. Todos los extractos del propóleo (compuestos mayoritarios y minoritarios)

presentaron actividad antibacteriana sobre *H. pylori*. En mezclas los compuestos mayoritarios presentaron alta proporción de efecto de indiferencia y en baja proporción, efecto de sinergia o antagonismo. Los compuestos mayoritarios del propóleos inducen alteraciones de la estructura celular bacteriana, que incluyen formación de vesículas de membrana, alteraciones a nivel de membrana y lisis celular.

ABSTRACT

Approximately 50% of the world population is infected by *Helicobacter pylori* becoming a bacterium that participates in the causality of chronic and acute gastritis, and pathologies such as peptic ulcer, MALT lymphoma, duodenal ulcer, gastric atrophy and it's able to develop gastric cancer. Antibacterial resistance seems to be the main cause of the failure of the eradication treatments of this pathogen. Consequently, the search for new molecules capable of inhibiting or killing *H. pylori* has been necessary. Given that the Biobío region is an apicultural region, the presence of active anti-*H. pylori* molecules was explored among over 300 chemical compounds, including flavonoids and phenolic acids. In this thesis was proposed to determinate if polyphenolics majority compounds present in the propolis are responsible for their anti-*H. pylori* activity and if exist an interaction between them to generate such effect. For this, an analytical study was carried out which consisted in chemical subtraction of the majority compounds through Centrifuga Partition Chromatography (CPC), purified by semipreparative HPLC, quantified by HPLC-DAD and their identity was confirmed through TLC-MS Interface. Microbiological analysis anti-*H. pylori* activity of these compounds was verified by agar diffusion test, the minimum inhibitory concentration (MIC) of each polyphenolics majority compound, the MIC in mixtures of these compounds, also it was established the kinetics of bacterial death in time of the best mixtures of majority compounds by observing if occurs a morphologic change in the bacteria through transmission electron microscopy (TEM). The results showed that six were the

polyphenolics majority compounds corresponding to chrysin, pinocembrin, galangin, CAPE, kaempferol and pinobanksin-3-o-acetate in propolis of the Biobío region. All the extracts of the propolis (majority and minority compounds) presented antibacterial activity on *H. pylori*. In mixtures the majority compounds presented high proportion of indifference effect and low proportion, synergy effect or antagonism. Majority propolis compounds induce alterations in bacterial cell structure, including membrane vesicles formation, alterations at the membrane level and cell lysis.



TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
TABLA DE CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>HELICOBACTER PYLORI</i> : PATOLOGÍAS ASOCIADAS E INFECCIÓN.	1
1.2 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA Y FRACASO DEL TRATAMIENTO DE <i>H. PYLORI</i>	2
1.3 ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO PARA <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	4
1.4 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....	5
1.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PROPÓLEOS.....	7
1.6 PROPÓLEOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	8
1.7 ACTIVIDAD ANTI- <i>H. PYLORI</i> DE LOS PROPÓLEOS.....	11
1.8 SUSTRACCIÓN QUÍMICA POR MEDIO DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR PARTICIÓN CENTRÍFUGA (CPC).....	12
1.9 COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CONTRA MICROORGANISMOS RESISTENTES.....	13
2. MATERIALES Y METODO.....	17
2.1 CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN CENTRIFUGA (CPC), SUSTRACCIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL PROPÓLEOS.	17
2.2 HPLC UV-DAD: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS.	18

2.2.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS.	18
2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS.....	18
2.3 HPLC SEMIPREPARATIVO: PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS.....	19
2.4 TLC-MS INTERFASE: CONFIRMACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS.	19
2.5 CEPA DE <i>H. PYLORI</i> Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	20
2.6 ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR.	20
2.7 DETERMINACIÓN DE LA CMI PARA CADA COMPUESTO PURIFICADO.	21
2.8 DETERMINACIÓN DE LA CMI EN MEZCLAS.	22
2.9 CINÉTICA DE MUERTE.	22
2.10 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	23
2.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	24
3. RESULTADOS	26
3.1 CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN CENTRIFUGA (CPC) Y SUSTRACCIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL PROPÓLEOS.	26
3.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL PROPÓLEOS POR HPLC UV-DAD.	29
3.2.1 Identificación de compuestos mayoritarios	29
3.2.2 Cuantificación de compuestos mayoritarios.....	32
3.3 PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL PROPÓLEOS POR HPLC SEMIPREPARATIVO.	34
3.4 CONFIRMACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS POR TLC-MS INTERFACE.	35
3.5 ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR.	38
3.6 DETERMINACIÓN DE LA CMI PARA CADA COMPUESTO PURIFICADO.	43
3.7 DETERMINACIÓN DE LA CMI EN MEZCLAS.	45
3.8 CINÉTICA DE MUERTE.	48
3.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	51
4. DISCUSION.....	55
5. CONCLUSIONES	59

6. PROYECCIONES.....	60
7. REFERENCIAS	61



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Cromatografía de capa fina de fracciones de propóleos.	27
Figura 3.2 Cromatograma del segundo análisis por CPC.	28
Figura 3.3 Representación de la zona de sustracción química.	28
Figura 3.4 Cromatograma de la caracterización del contenido total de compuestos presentes en la muestra de propóleos en estudio.	29
Figura 3.5 Cromatograma ejemplo de la identificación de cada compuesto mayoritario.	31
Figura 3.6 Fracciones agrupadas de acuerdo al cromatograma de la caracterización del contenido total de los compuestos presentes en la muestra de propóleos.	32
Figura 3.7 Curva de calibración de galangina.	33
Figura 3.8 Cromatograma de los compuestos mayoritarios purificados.	35
Figura 3.9 Espectro de masas del compuesto mayoritario feniletíl éster del ácido cafeico (CAPE).	36
Figura 3.10 Actividad anti- <i>H. pylori</i> de los compuestos mayoritarios del propóleos sobre la cepa <i>H. pylori</i> ATC J99.	38
Figura 3.11 Actividad anti- <i>H. pylori</i> de los compuestos mayoritarios del propóleos sobre la cepa <i>H. pylori</i> ATCC 43504.	39
Figura 3.12 Actividad anti- <i>H. pylori</i> de los compuestos mayoritarios del propóleos sobre la cepa clínica de <i>H. pylori</i> 84C.	40
.....	40
Figura 3.13 Ejemplo del efecto anti- <i>H. pylori</i> del compuesto mayoritario CAPE frente a la cepa J99	40

Figura 3.14 Actividad inhibitoria de propóleos sin CAPE y del propóleos total sobre las cepas de <i>H. pylori</i>	41
Figura 3.15. Actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas de la separación de compuestos polifenólicos de propóleos.....	42
Figura 3.16 Comparación de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas con el propóleos total.....	42
Figura 3.17. Ejemplo de la concentración mínima inhibitoria del compuesto mayoritario pinocembrina sobre la cepa de <i>H. pylori</i> ATCC 43504.....	45
Figura 3.18 Representación de resultados de tablero de ajedrez con la mezcla de compuestos, sobre la cepa 43504.....	46
Figura 3.19 Fotografía de tablero de ajedrez para cálculo de índice FIC.....	46
Figura 3.20 Isobologramas que representan el resultado del método de tablero de ajedrez.	47
Figura 3.21 Cinética de muerte de <i>H. pylori</i> ATCC 43504.	49
Figura 3.22 Análisis de las pendientes de la curva de muerte.	50
Figura 3.23 Microfotografías electrónicas de transmisión de <i>H. pylori</i> cepa ATCC 43504 con las mezclas de compuestos mayoritarios de propóleos al tiempo 0 horas.	51
Figura 3.24 Microfotografías electrónicas de transmisión de <i>H. pylori</i> cepa ATCC 43504 con las mezclas de compuestos mayoritarios de propóleos a tiempo 12 horas.	52
Figura 3.25 Microfotografías electrónicas de transmisión de <i>H. pylori</i> 43504 a 12 horas de incubación.	53
Figura 3.26 Microfotografías electrónicas de transmisión de <i>H. pylori</i> 43504 a 12 horas de incubación.	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Identificación de cada peak del análisis de la muestra de propóleos en estudio.....	30
Tabla 3.2 Contenido de los compuestos mayoritarios en la muestra de propóleos en estudio.....	34
Tabla 3.3 Compuestos mayoritarios identificados por TLC-MS Interface en la muestra de propóleos en estudio.	36
Tabla 3.4 Estructura y clasificación química de los compuestos mayoritarios del propóleos en la muestra de estudio.	37
Tabla 3.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los Compuestos mayoritarios ensayo realizado por dilución en agar con la cepa ATCC.	43
Tabla 3.6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los Compuestos mayoritarios presentes en el propóleos con la cepa clínica.	44
Tabla 3.7 Efectos de la combinación de compuestos mayoritario del propóleos sobre la cepa <i>H. pylori</i> ATCC 43504.	48
Tabla 3.8 Muerte bacteriana <i>H. pylori</i> ATCC 43504 (Criterio de Pearson).....	50

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 *Helicobacter pylori*: patologías asociadas e infección.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo Gram negativo, microaerófilico, con forma de espiral y flagelado (Wenming *et al.*, 2012). Se caracteriza por la producción de ureasa, una enzima muy activa característica de este microorganismo, que le permite colonizar y permanecer en la capa mucosa que cubre la cavidad gástrica (Fariña *et al.*, 2007). Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por *H. pylori*, convirtiéndose en una de las infecciones bacterianas crónicas más comunes de los humanos (Sachs y Scott, 2012).

La bacteria requiere colonizar el epitelio gástrico y para acceder a éste, usa su aparato flagelar. Además, este microorganismo requiere sobrevivir en la capa mucosa y el jugo gástrico, donde el pH es letal; para esto genera un microambiente neutro mediante la actividad de la ureasa. La bacteria se adhiere a las células epiteliales gástricas, provocando una respuesta inflamatoria mediada por el sistema inmune del hospedador (Yoshiyama y Nakazawa, 2000).

H. pylori es el agente causal de gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma de MALT y es el principal factor de riesgo del cáncer gástrico (Trespalacios *et al.*, 2010). De los infectados, alrededor del 10% desarrollan la enfermedad de úlcera péptica y más o menos el 1% desarrollan cáncer gástrico y menos de 0,1% linfoma de MALT (Sachs y Scott, 2012).

La infección por *H. pylori* muestra grandes variaciones geográficas, siendo mayor en países en vías de desarrollo (Muhammad JS *et al.*, 2012). En estudios europeos (Breckan, 2009; Sýkora *et al.*, 2009) la prevalencia varía entre 7 y 33%, entre 48 y 78% en estudios realizados en América Latina (Santos *et al.*, 2009), y entre 37,5 y 92% en Asia (Mishra *et al.*, 2008, Jafri *et al.*, 2010).

Las condiciones socioeconómica es una de las causas principales en la prevalencia de la infección por *H. pylori* (Lee y Derakhshan, 2013), En países en vías de desarrollo, la mayoría de los niños están infectados antes de cumplir los 10 años. En países desarrollados, en cambio, raramente se encuentran infecciones por *H. pylori* antes de esa edad, pero la prevalencia aumenta a 10% en individuos entre 18 y 30 años de edad y a 50% en mayores de 60 (Jafri *et al.*, 2010). En cualquier grupo etario, la infección parece ser más común en la población hispana y negra, comparada con la población blanca (Crowe, 2012). En Chile, la prevalencia de esta infección alcanza el 73% en adultos asintomáticos (Ferreccio *et al.*, 2007), y un 25,6% en niños entre 3 y 14 años, con una edad promedio de niños infectados de $10,1 \pm 4,0$ años (González *et al.*, 2007).

1.2 Resistencia antibiótica y fracaso del tratamiento de *H. pylori*.

En el V consenso de Maastricht se estableció el tratamiento farmacológico a seguir como terapia de erradicación de *H. pylori*, el cual ya no está reservada solo a los pacientes con manifestaciones clínicas de la infección sino también a aquellos pacientes asintomáticos. Dicho tratamiento consiste en una triple terapia convencional que incluye un inhibidor de la bomba de protones (PPI) y los antibióticos claritromicina, amoxicilina o metronidazol. Dicha terapia presenta la dificultad de la resistencia bacteriana a la claritromicina, cuando ésta es menor a un 15 o 20 % el tratamiento es el ya mencionado. En cambio, cuando la resistencia es mayor, este último componente es reemplazado por levofloxacino además de la alternativa de adicionar bismuto al

tratamiento, utilizar altas dosis de PPI, dos veces al día y aumentar la duración del tratamiento, de 10 a 14 días es la terapia actual a seguir (Malfertheiner *et al.*, 2016). Esta terapia provoca malestar en muchos pacientes, incluyendo cefaleas, náuseas, vómitos y sensación de mareo, siendo responsable del abandono e incumplimiento de la misma (Camargo *et al.*, 2014) otras explicaciones para la disminución de la eficacia de esta terapia sería, la alta acidez gástrica que provoca, alta carga bacteriana y cepas bacterianas presentes, pero lo más importante es el aumento de la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina (Malfertheiner *et al.*, 2016).

Siguiendo La recomendación de la Agencia Europea de Medicamentos sobre la evaluación de los medicamentos indicados para el tratamiento de la infección bacteriana, se pueden definir tres categorías de especies bacterianas según su susceptibilidad, donde *H. pylori* cae en la segunda categoría, inconstantemente susceptible (10-50% Resistente) (Malfertheiner *et al.*, 2016).

Las tasas de resistencia a los antibióticos de la terapia para *H. pylori* han aumentado, en especial las tasas de resistencia a la claritromicina. En Italia y Japón aumento aproximadamente un 30 %, 40% en Turquía, y El 50% en China, aunque las tasas en Suecia y Taiwán son más bajas también aumentaron un 15% (Thung *et al.*, 2016). Cabe destacar que la OMS en su lista de prioridad global de bacterias resistentes a antibióticos, declaró a *H. pylori* en la lista de prioridad 2, es decir alta prioridad, por su resistencia a claritromicina (Tacconelli y Magrini, 2017).

La resistencia antibiótica varía de acuerdo a la región geográfica, en Europa, estudios de resistencia a levofloxacina indican que en Francia es entre el 3,8%, y 3,3%; en Holanda 4,7%; en Portugal 20,9% tasa de resistencia más alta en este continente a este antibiótico (Suzuki *et al.*, 2012; Megraud, 2007). En Taiwán la resistencia se

cuadruplicó después de 2004 de 3,2% a 16,3%. En Europa la resistencia promedio informada en el año 2009 fue de 14,1% (Kuo *et al.*, 2012).

En los resultados resumidos de resistencia primaria a los antimicrobianos entre los adultos varió según antibióticos, incluyendo 12% de claritromicina, 53% de metronidazol, 4% para la amoxicilina, 6% para la tetraciclina, 3% para furazolidone, 15% para fluoroquinolonas, y 8% para el duo claritromicina y metronidazol. La prevalencia varía considerablemente según el país. Además, el uso de claritromicina y sin pruebas de sensibilidad puede no ser apropiado en algunos otros países de América (> 15-20 % de prevalencia) (Camargo *et al.*, 2014).

En Chile, la prevalencia de cepas resistentes a claritromicina y a metronidazol en la población adulta es de alrededor de 9% y 31%, respectivamente. Para metronidazol, la resistencia se ha registrado entre 12,5% y 44,9% en Valdivia (Otth *et al.*, 2011) y Santiago (Vallejos *et al.*, 2007); en tanto, la resistencia a claritromicina oscila entre 2,2% en Concepción y 20,0% en Santiago, respectivamente (González *et al.*, 2001; Vallejos *et al.*, 2007). La resistencia informada para amoxicilina, por otra parte, es de un 2,3% en Valdivia (Otth *et al.*, 2011). La resistencia para metronidazol fue de 65,7%, para amoxicilina de 6,5%, para claritromicina de 14%, para tetraciclina de 8,3%, para levofloxacina de 39% y para furazolidona de 6,9% (Martínez *et al.*, 2014).

1.3 Alternativas de tratamiento para *Helicobacter pylori*.

Numerosos productos naturales se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones bacterianas, sólo 8 años después de que Warren y Marshall descubrieron este patógeno la primera publicación en informar sobre la actividad anti-*H. pylori* de los productos vegetales salió a la luz (Cassel-Beraud *et al.*, 1991).

Los estudios recientes más relevantes en el desarrollo de vacunas y nuevos tratamientos que utilizan los recursos naturales tales como plantas, probióticos, microorganismos, los péptidos, polisacáridos, y la irradiación de luz ultra violeta intragástrica demuestran ser una alternativa al tratamiento de este patógeno. Las terapias alternativas no han sido efectivas en la erradicación de la bacteria pero han sido capaces de mantener los niveles bacterianos bajos. Sin embargo, algunos de ellos son útiles en la prevención de los efectos adversos de los antibióticos, la modulación de la respuesta inmune, protección gástrica, y la promoción de la salud en general. Por lo tanto, dichos agentes naturales se pueden utilizar como adyuvantes de la terapia de erradicación anti-*H. pylori* (Ayala *et al.*, 2014).

Tanto *in vitro* como *in vivo* estudios han demostrado la utilización con éxito de algunos productos naturales para el tratamiento de las infecciones relacionadas con *H. pylori*. Sin embargo, la prescripción rutinaria de posibles medicinas complementarias y alternativas continúa sin ser comprobada, ya que, las pruebas sobre la seguridad y eficacia de los compuestos activos de origen natural son un tema de debate en curso. El uso de medicinas alternativas se ha informado para aliviar los problemas de resistencia antibiótica. Los productos naturales generalmente se consideran seguros en algunas tasas de dosis permitidas, su uso se puede considerar como un suplemento dietético o una terapia alterna a la convencional. Varios productos naturales presentan actividad anti-*H. pylori*, entre ellos han sido probados en preclínica y clínica: La goma de masilla, brócoli, arándano, propóleos, la canela y la curcumina (Murali *et al.*, 2014).

1.4 Compuestos polifenólicos.

Los polifenoles, tales como ácidos fenólicos y flavonoides, tienen en común que en su estructura presentan más de un grupo fenol y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las fuentes de estos compuestos son las frutas, verduras, vino, té, cacao,

aceite extra virgen, entre muchos otros, siendo sus metabolitos secundarios, los que se asocia con la producción de defensa y la respuesta de la planta al estrés, tales como radiación ultravioleta o la agresión por agentes patógenos (Fernández-Bolaños *et al.*, 2012, Manach *et al.*, 2004).

Estos compuestos podrían tener un efecto protector no sólo para el huésped (citoprotegiendo el epitelio), sino también sobre *H. pylori* (contribuyendo a sus defensas antioxidantes). La actividad anti-*H. pylori* de dichos preparados parece estar asociada a determinadas especies vegetales de uso médico y/o alimenticio, y por consiguiente pudiera estar limitada a sólo algunas familias fitoquímicas. Ejemplos de esto lo constituyen diferentes bayas (berries ricos en polifenoles), algunas crucíferas (brócoli rico en glucosinolatos), propóleos y especies con aceites esenciales. Sin embargo, dentro de los grupos de fitoquímicos más estudiados destacan los polifenoles (Parreira *et al.*, 2014).

Una de las hipótesis que se ha aceptado es que los polifenoles ejercen parte de su actividad antimicrobiana mediante interacciones inespecíficas con componentes de la membrana plasmática (Mori *et al.*, 1987; Haraguchi *et al.*, 1998; Funatogawa *et al.*, 2004). Al respecto, se observó un efecto dosis-dependiente al evaluar el daño provocado por algunos polifenoles en los modelos de integridad de liposomas y de alteraciones en la morfología de *H. pylori* (Funatogawa *et al.*, 2004).

Estudios realizados con flavonoides concluyen que la mayor solubilidad en lípidos se asocia con un efecto bactericida más potente (Hashimoto *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2005; Ustün *et al.*, 2006). Se ha propuesto un nuevo mecanismo mediante el cual ciertos flavonoides de baja polaridad pueden ejercer un efecto anti-*H. pylori*. Así, la actividad bactericida de tres flavonoides: quercetina, apigenina y sakuranetina ha sido atribuida a su capacidad de inhibir en forma competitiva a la β -hidroxiacil deshidratasa-acil

proteína presente en *H. pylori* (HpFabZ) (Zhang *et al.*, 2008). La principal función de Hp FabZ es participar en la fase de elongación durante la biosíntesis de ácidos grasos saturados e insaturados.

Moreira *et al.* (2007) estudiaron el efecto de cuatro flavonoides: quercetina, miricetina, canferol y galangina sobre la producción de ROS en neutrófilos de conejo estimulados con dos receptores del complemento (FcγR, CR). Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio de flavonoides no dependía de la clase del receptor de membrana celular estimulado, pero sí estaba relacionado con la lipofilia de los compuestos.

1.5 Composición química de los propóleos.

El propóleo es un producto apícola resinoso y complejo, con una variable apariencia física, recogido por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) desde la vegetación que visitan. Las abejas transforman este compuesto, añadiendo secreciones salivales y ceras mediante la masticación (Salatino *et al.*, 2005). El propóleo está compuesto de resinas, (flavonoides y ácidos fenólicos relacionados), ceras, aceites esenciales y polen (Burdock, 1998). Más de 300 compuestos químicos se han descrito en los propóleos de diversos orígenes (Castaldo y Capasso, 2002; Pereira *et al.*, 2002).

Feniletil éster del ácido cafeico (CAPE) y crisina también están presentes en todas las muestras de propóleos en diferentes concentraciones, y son responsables de las muchas propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Catchpole *et al.*, 2015). Se ha reportado que el propóleo rojo y verde de Brasil contienen algunos flavonoides específicos como artepillina C, pinocembrina, daidzeína y biocanina (Cheung *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2014).

En muestras de propóleos tipificadas palinológicamente se demostró la presencia de terpenos y flavonoides (Barrientos *et al.*, 2013). Entre estos últimos, se ha reportado

la presencia de acacetina, ácido cinámico, cumarina, galangina, izalpina, canferido pinocembrina, preniletina, viscidona y vanillina (Muñoz, 2001). Se analizaron 20 muestras suministradas por diferentes productores apícolas de las regiones central y sur de Chile (Valparaíso, Metropolitana, Libertador Bernardo O'Higgins y La Araucanía) caracterizadas químicamente mediante cromatografía (HPLC). Los perfiles cromatográficos HPLC de todas las muestras de propóleos se observaron muy similares, mostrando variaciones en la concentración de ácido caféico, miricetina, quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina y galangina. Además, los polifenoles detectados en muestras de propóleos provenientes de la región central y sur de Chile, por análisis HPLC demostraron la presencia, en todas las muestras, de pinocembrina y galangina. Así, la cuantificación de polifenoles mostró que la pinocembrina es el principal compuesto presente en propóleos chilenos, siendo de los propóleos procedentes del sur de Chile los que contenían una mayor proporción de este compuesto (Barrientos *et al.*, 2013).

La identificación de los compuestos activos presentes en las fracciones de propóleos obtenidas por TLC-MS y por HPLC mostró que los propóleos Chilenos son ricos en flavonoides, compuestos fenólicos y sus ésteres. Entre los compuestos más abundantes se encuentran Crisina, Pinobansina, Galangina Pinocembrina, Feniletil Ester del Ácido Cafeico (CAPE), Quercitina y Canferol (Castro *et al.*, 2014).

1.6 Propóleos con actividad antibacteriana.

El propóleos ha mostrado actividad antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatoria, anestésica, entre otras (Bankova *et al.*, 2000). Además, se ha observado sinergismo entre propóleos y agentes antibacterianos (Krol *et al.*, 1993; Stepanovic *et al.*, 2003). La actividad del propóleos es de carácter bactericida, pero ésta depende de las características de la bacteria (Mirzoeva *et al.*, 1997).

Estudios *in vitro* describen la actividad antibacteriana del propóleo contra *Streptococcus* aislados de la zona oral (Steinberg *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1998), *Streptococcus agalactiae* (Takaisi y Schilcher, 1994) y en contra de cepas aisladas de pacientes con infecciones del tracto respiratorio superior (Focht *et al.*, 1993). La actividad del propóleo es de carácter bactericida, pero ésta depende de las características de la bacteria. Por ejemplo, se observó que las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a la acción del propóleo, mientras que las bacterias Gram positivas son más susceptibles (Mirzoeva *et al.*, 1997). Se encontró que el propóleo y algunos de sus derivados cinámicos y flavonoides son capaces de desacoplar la transducción de energía de la membrana citoplasmática e inhibir la motilidad bacteriana (Mirzoeva *et al.*, 1997). Por otra parte, estudios de microscopía electrónica mostraron que el propóleo tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, evitando la división celular. Esta actividad resulta en la formación de estructuras pseudo-multicelulares; además, el propóleo desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular, causando bacteriólisis parcial y la inhibición de la síntesis de proteínas (Takaisi y Schilcher, 1994). En propóleos obtenidos de Bulgaria y países Mediterráneos se han identificado principalmente flavonoides y ésteres de los ácidos cafeico y ferúlico, los cuales han mostrado actividad antibacteriana. En propóleos de origen brasileño, también se ha encontrado principalmente flavonoides y ácidos fenólicos, los cuales mostraron actividad en contra de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium* spp. (Santos *et al.*, 2003).

Si bien el propóleo ha mostrado actividad antibacteriana frente a Gram positivos, como se mencionó anteriormente, la actividad frente a Gram negativos es aún controversial. Por ejemplo, el propóleo ha mostrado buena actividad frente a *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, pero no frente a cepas de *Enterobacteriaceae*. Esto se debe principalmente a que las bacterias Gram negativas tienen lipopolisacárido (LPS) en la pared celular y un complejo de proteínas que son

capaces de impedir el paso de materiales no deseados dentro de la célula bacteriana, en comparación con las bacterias Gram positivas (Drago *et al.*, 2000).

Propóleos recolectados de la zona oeste de la India, Gujarat, presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Extractos etanólicos de la muestra de propóleos mostraron una alta actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas (*B. subtilis*), pero menos actividad contra bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa* y *E. coli*). La levadura *C. albicans* mostró una zona de inhibición moderada y *A. niger* no mostró inhibición. Extractos preparados con éter y cloroformo no mostraron ninguna actividad. Mientras que los extractos etanólicos de propóleos presentaron una zona máxima de inhibición contra *B. subtilis* (Kumar *et al.*, 2008).

En cuatro diferentes muestras de propóleos de Anatolia, Turquía se evaluó la actividad antimicrobiana contra diferentes grupos de microorganismos incluyendo algunos patógenos orales (*Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *C. tropicalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*) y se realizó comparación entre sus composiciones químicas. El extracto etanólico de propóleos (EEP) fue capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos de prueba y los principales compuestos identificados en las cuatro muestras de propóleos de Anatolia fueron flavonoides tales como: pinocembrina, pinostropin, isalpinin, pinobanksina, quercetina, naringenina, galangina y crisina (Uzel *et al.*, 2005).

1.7 Actividad anti- *H. pylori* de los propóleos.

Varios estudios demuestran la actividad anti-*H. pylori* del propóleos: En 1998, Hashimoto *et al.* fueron los primeros en informar la actividad anti-*H. pylori* del propóleos, y más tarde en 2001, Banskota *et al.* Reportaron que diterpenos del tipo labdano y algunos de los compuestos fenólicos prenilados aislados de propóleos exhiben actividad anti-*H. pylori*. En el estudio realizado por Boyanova L *et al.* (2005), utilizaron extractos etanólicos de propóleos búlgaros (EEP) en concentraciones crecientes y se ensayaron 21 cepas de *H. pylori*. Los investigadores encontraron que estos extractos tenían una considerable actividad antibacteriana contra *H. pylori in vitro*. Un estudio similar realizado *in vitro* por Nostro *et al.* (2005, 2006) mostró que el propóleos tiene un valor de MIC 0,075 mg/mL, usando 11 aislados clínicos de *H. pylori*, en el año siguiente, un informe del mismo grupo de investigadores indicaron que propóleos en combinación con el antibiótico claritromicina también ejercía buena actividad anti-*H. pylori*.

En Chile un estudio demostró que propóleos chilenos provenientes de distintas zonas melíferas del país tienen actividad anti-bacteriana sobre cepas de *H. pylori* y que sus características antibacterianas varían según la zona de procedencia (Villanueva *et al.*, 2015). Así mismo otra investigación arrojó resultados donde los propóleos colectados de distintas áreas geomorfológicas de la región del Biobío presentan variación en los compuestos activos con actividad anti-*H. pylori*, dependiendo del tipo de flora con el cual estén elaborados. Estos propóleos presentan capacidad profiláctica *in vitro* contra la infección de *H. pylori* (Freire, 2015).

Recientemente se sigue demostrando la actividad anti-*H. pylori* del propóleos: a 15 diferentes extractos etanólicos de propóleos (EEP) se les determinó la actividad anti-*H. pylori* y anti-ureasa así como también el contenido total de polifenoles y flavonoides contenidos en éste. Todos los extractos de propóleos mostraron alta inhibición de *H.*

pylori, con diámetros de zona de inhibición desde 31.0 a 47.0 mm. El grado de inhibición se relacionó con el contenido fenólico del EEP (Baltas *et al.*, 2016).

1.8 Sustracción química por medio del análisis cromatográfico por partición centrífuga (CPC).

Esta técnica es un tipo de cromatografía líquida (LC) donde se utilizan dos fases líquidas inmiscibles sin soporte sólido. La fase estacionaria líquida se mantiene en su lugar por la fuerza centrífuga, mientras que la fase móvil se bombea a través de ella. Se utiliza un sistema hidrostático donde la columna se caracteriza por tener pequeñas cámaras de elución interconectadas mediante un tubo capilar, con rotación alrededor de un único eje. A medida que la muestra es procesada, es posible obtener los compuestos con diferentes características de polaridad y concentrarlos. Además, CPC es una técnica cromatográfica versátil, que permite invertir la dirección de flujo e intercambiar las fases móvil y estacionaria durante el proceso cromatográfico. Esta técnica es útil e ideal para separar compuestos a partir de extractos crudos (Marchal *et al.*, 2003).

La sustracción química es un resultado del agotamiento de metabolitos a partir de un extracto total con la separación contracorriente (CS) que incluye cromatografía contracorriente (CCC) y cromatografía por reparto centrífuga (CPC). Se generan extractos de diseño que se describen como el agotamiento y el enriquecimiento de los metabolitos mayoritarios del extracto y que sirven para evaluar la actividad biológica de productos naturales dentro y fuera de sus matrices naturales. Se introdujo el concepto de sustracción química usando la separación por contracorriente (CS) para la eliminación específica de un solo compuesto de una mezcla bioactiva de metabolitos. El término "sustracción química" se homologa a la sustracción aritmética y se aplica a una operación de producto químico destinado en la eliminación o

supresión de determinados componentes. La sustracción química fue inicialmente desarrollada para estudiar fitoquímicos antiadherentes de *E. coli*, bacteria que puede causar infecciones en las vías urinarias. Para ello extrajeron un componente antibacteriano conocido, el ácido benzoico, el cual se eliminó selectivamente por CS desde jugo de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*), con una pureza de 97,47% medida por qHNMR. Desde entonces, esta técnica cromatográfica ha evolucionado aún más con respecto a la orientación analito-actividad, variando según los coeficientes de reparto (K). Un aspecto clave de la sustracción química se refiere a la evaluación de la pureza de los compuestos diana (TS), así como la evaluación de su complejidad residual (RC) (Ramos *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014).

1.9 Combinación de antibióticos contra microorganismos resistentes.

Está ampliamente demostrado que las bacterias exhiben resistencia a aquellos elementos que ejercen presión selectiva como las condiciones ambientales y uso de medicamentos. Para el tratamiento de microorganismos multiresistentes se utilizan combinaciones de antibióticos por las siguientes razones: garantizar cobertura de amplio espectro, tratamiento para infecciones polimicrobianas, prevención de la resistencia antimicrobiana, tratar de reducir la toxicidad de determinado fármaco y para obtener sinergismo antibacteriano (Jackson y Machado Reyes, 1998).

In vitro es posible evaluar si el efecto al combinar dos antimicrobianos será sinergia, adición, indiferencia o antagonismo. Esto puede realizarse por diversas técnicas, siendo el método de microdilución en tablero de ajedrez uno de los métodos más utilizados (Rand *et al.*, 1993).

Mediante este método se determina un parámetro conocido como Índice Inhibitorio Fraccionado (Σ FIC), para lo que se necesita conocer la concentración inhibitoria

fraccional (FIC) de los antibióticos de la combinación (Pillai *et al.*, 2005). La FIC se obtiene de la siguiente manera:

$$FIC_A = \frac{\text{concentración compuesto A en la combinación}}{CMI_A}$$

$$FIC_B = \frac{\text{concentración compuesto B en la combinación}}{CMI_B}$$

El índice FIC corresponde a $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B$

Dependiendo del valor de este parámetro se puede establecer el efecto de la combinación antibiótica. Así, se obtiene sinergia si el índice FIC es $\leq 0,5$; adición si oscila entre $>0,5$ y $\leq 1,0$; indiferencia si varía entre $>1,0$ - $\leq 2,0$ y antagonismo cuando es $>2,0$ (Hernández *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2005; Kobayashi, 2005; Shields *et al.*, 2011).

Por otra parte, resulta de interés conocer si combinaciones *in vitro* producen muerte bacteriana, los estudios de interacción se pueden complementar con estudios de curva de muerte en el tiempo, evaluando lo que sucede con la población bacteriana al exponerla a combinaciones con diferente concentración de antibióticos, tomando muestras en una serie de tiempo durante un periodo, generalmente, de 24 a 48 horas (Vogelman y Craig, 1986).

Con estos antecedentes, surgió la siguiente pregunta de investigación: ¿Tendrán todos los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en el propóleo actividad

anti-*H. pylori* y entre sí presentarán efecto de indiferencia en su acción contra este patógeno?

El propóleo posee documentada actividad anti-*H. pylori*, la cual estaría asociada a la presencia de polifenoles. Dentro de estos últimos, existen 7 compuestos mayoritarios destacando entre ellos pinocembrina, CAPE y galangina. Interesantemente, en la región del Biobío los propóleos se caracterizan por poseer una elevada concentración de dichos polifenoles. Estos poseen marcada actividad contra *H. pylori* cuando son ensayados en forma aislada (pura). Sin embargo, dado que en resultados previos, la sustracción selectiva de dichos compuestos desde el extracto total no modifica su actividad inhibitoria sobre *H. pylori*, en esta tesis se postula la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

Los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en el propóleo tienen actividad anti-*H. pylori* y, entre sí, presentan preferentemente efecto de indiferencia en su acción.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en el propóleo son responsables de su actividad anti-*H. pylori* y si ejercen esta actividad en forma independiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Establecer la concentración en que cada compuesto polifenólico mayoritario se encuentra en el propóleos.
2. Determinar la intensidad de acción anti-*H. pylori* de los compuestos polifenólicos mayoritarios.
3. Determinar si existe interacción en la actividad antimicrobiana de estos compuestos mayoritarios en mezclas.



2. MATERIALES Y METODO.

La muestra de propóleos que se utilizó en este estudio proviene de la zona de San Fabián de Alico, la cual es una zona representativa de la región del Biobío. Se encontraba almacenada a -20 °C en el Laboratorio de Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. El proceso de recolección de la muestra se especifica en Freire (2015).

2.1 Cromatografía de partición centrifuga (CPC), sustracción química de los compuestos mayoritarios del propóleos.

La selección del solvente por cromatografía contracorriente (CCC) se realizó por medio del sistema Arizona, el sistema óptimo constituido por hexano/acetato de etilo/metanol/agua en relación 5:4:5:4.5 v/v/v/v se estableció esta fase móvil para su uso en este ensayo, se pesaron 2.0 g de la muestra de propóleos (seco y liofilizado) y se sometió a análisis CPC. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó la metodología descrita por Kohler y Winterhalter (2005), el instrumento HSCCC utilizado fue un Spot-CPC 250-L (Centrifugal Partition Chromatograph) de Armen, Francia, (volumen total: 250 mL). La fase estacionaria fue propulsada con una bomba HPLC semipreparativa de 50 mL/min (Young Lyn, Corea). El modo de elución fue ascendente. El flujo usado fue de 4 mL/min y la velocidad de rotación de 2000 rpm generó una presión interna de 581 psi. El monitoreo de la separación se realizó mediante un detector preparativo dual (Young Lyn, Corea) a 280 y 350 nm. Las fracciones fueron colectadas de manera automática. Una vez que se obtuvieron las fracciones, se concentraron a presión reducida y se secaron al vacío para eliminar el solvente. Se utilizó una válvula manual de inyección de la muestra equipada con un loop de 10 mL. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante TLC según la metodología descrita por Tang *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Esta técnica permitió obtener fracciones de distinta polaridad, ordenadas desde las apolares hasta las polares las cuales se revelaron a través de luz

UV (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12). Para la sustracción química se procedió identificando el peak que correspondía a cada compuesto mayoritario y los tubos correspondientes a este se retiraron del extracto total almacenándolos por separado para posterior análisis, para comprobar la identidad de este compuesto que se separó se realizó una TLC en comparación con el estándar para aquellos que se encontraban disponibles.

2.2 HPLC UV-DAD: identificación y cuantificación de compuestos mayoritarios.

2.2.1 Identificación de compuestos mayoritarios.

La cromatografía se realizó utilizando un Waters 2695 Separations Module, (Alliance U.S.A.) modular sistema modelo 1100, que consistía en un desgasificador de vacío, una bomba cuaternaria, un muestreador automático, un compartimento de columna termoestabilizado y un detector de arreglos de diodos (DAD). Los cromatogramas se registraron utilizando el software YLCatir. Los análisis se llevaron a cabo en una columna Kromasil C-18 4,6 x 150 mm. La fase móvil estaba compuesta por (A) H₂O/Ac. Fórmico 0.01% y (B) Acetonitrilo. El gradiente de elución se modificó de la siguiente manera: un flujo de 1.2 mL/min. El tiempo de post corrida fue de 5 minutos. La temperatura de la columna se fijó en 30 °C. El volumen de inyección de muestra fue de 20 µL a la concentración de 5 mg/mL. Las longitudes de onda a la cual se identificaron los compuestos activos del propóleo fueron a 280nm y 350 nm.

2.2.2 Cuantificación de compuestos mayoritarios.

La solución patrón de cada compuesto (fenil ester del ácido cafeico CAPE, pinocembrina, crisina, galangina, canferol, canferido) se preparó de la siguiente manera: una cantidad exactamente pesada de compuesto puro (2-6 mg) se colocó en

un matraz volumétrico de 10 mL; se utilizó MeOH como solvente y la solución se diluyó hasta volumen con el mismo disolvente. La curva de calibración estándar externa se generó usando cinco puntos de datos. Alícuotas de 5 μ L de cada solución estándar se utilizaron para el análisis por HPLC. Las inyecciones de cada compuesto al equipo se realizaron por triplicado para cada nivel de concentración. La curva de calibración se obtuvo representando gráficamente el área del peak del compuesto en cada nivel frente a la concentración de la muestra. La cantidad de ácidos fenólicos y flavonoides en muestras de propóleos se determinó mediante el uso de estas curvas de calibración, con los estándares comerciales disponibles.

2.3 HPLC semipreparativo: purificación de compuestos mayoritarios.

La cromatografía se realizó utilizando YL9111S BYNARY PUMP con un detector uv/vis modular sistema modelo 1100, que poseía una bomba BINARIA y un muestreador manual. Los cromatogramas se registraron utilizando el software YLClatiry. Los análisis se llevaron a cabo en una columna Kromasil C-18 10.0 x 250 mm. La fase móvil estaba compuesta por (A) H₂O/Ac fórmico 0.01% y (B) Acetonitrilo. El gradiente de elución se modificó de la siguiente manera: un flujo de 5 mL/min. El tiempo de post corrida fue de 5 minutos. El volumen de inyección de muestra fue de 500 μ L a la concentración de 5 mg/mL. Las longitudes de onda a la cual se identificaron los compuestos mayoritarios del propóleos estuvieron en el rango de 280 nm y 350 nm.

2.4 TLC-MS Interfase: confirmación de compuestos mayoritarios.

El análisis TLC-MS se llevó a cabo usando un LCMS-8030 (SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH SPECTROMETER U.S.A.). Los parámetros se establecieron de la siguiente manera: la tensión capilar fue de 4,5 kV, la presión del nebulizador (N₂) fue de 3 L/min, la temperatura del gas de secado fue de 250 °C, el flujo de gas de

secado fue 15 L/ min y el voltaje del fragmentador fue de 135 V. Los datos se adquirieron por LabSolutions (Rev. B.02.01). Se utilizó TQ en el pleno-escanear modos de iones positivos y negativos en el rango de m/z 100-1000 y en la exploración de iones producto de modo (PIS) usando nitrógeno como el gas de colisión (con una energía de colisión (CE) de 20 V.

Los compuestos mayoritarios obtenidos y purificados se sometieron al proceso de liofilización y desecación con Nitrógeno gaseoso para ser almacenados a -20 °C, protegidos de la luz y la humedad, hasta que se requirieron para el análisis microbiológico correspondiente.

2.5 Cepa de *H. pylori* y condiciones de cultivo.

Se trabajó con las cepas de referencia *H. pylori* ATCC 43504 y J99, y con una cepa clínica aislada de biopsias gástricas, disponibles en el cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción. Las cepas se inocularon en medio agar Columbia suplementado con 5% de sangre de caballo (defibrinada) e inhibidor DENT y se incubaron entre 3 y 5 días en microaerofilia (10 % CO₂) a 37°C. Los aislamientos se confirmaron mediante prueba de ureasa, catalasa y microscópicamente para confirmar morfología.

2.6 Ensayo de difusión en agar.

Se utilizó la metodología descrita por Valgas *et al.* (2007), con algunas modificaciones. En placas de agar Müeller-Hinton suplementado con 5% de sangre de caballo defibrinada estéril se prepararon pocillos con una pipeta Pasteur estéril; luego se diseminaron 3 µL de la suspensión bacteriana de cada cepa de *H. pylori* que se ajustó aproximadamente a 6×10^8 UFC/mL (McFarland 2) de un subcultivo de no más de 72 h

para ello se empleó solución salina fisiológica estéril. Los pocillos se llenaron con alícuotas de 20 μL de las diferentes concentraciones de los compuestos polifenólicos así como del control positivo y negativo. Se ensayó con las siguientes concentraciones: 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de cada compuesto en estudio, dimetilsulfoxido (DMSO) al 10% se usó como disolvente (control solvente) y amoxicilina 2 $\mu\text{g/mL}$ como control positivo. Se incubó bajo microaerofilia (10% CO_2), a 37°C durante 72 h. El ensayo se realizó por duplicado y la actividad antibacteriana se expresó como el promedio del halo de inhibición (mm) medido con un pie de metro (modificado de Pastene *et al.*, 2009).

2.7 Determinación de la CMI para cada compuesto purificado.

Se determinó la CMI mediante dilución en agar como lo recomienda el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010) para cada compuesto polifenólico, utilizando placas de 6 pocillos (TPP, Suiza). Se preparó medio agar Müeller-Hinton suplementado con 5% de sangre de caballo defibrinada y se agregaron los compuestos mayoritarios del propóleo purificados en concentraciones decrecientes (2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 $\mu\text{g/mL}$). Como control positivo de crecimiento se utilizó medio Müeller-Hinton suplementado con 5% de sangre, medio Müeller-Hinton suplementado con 5% de sangre más DMSO 10 % como control de solvente y medio Müeller-Hinton suplementado con 5% de sangre más amoxicilina 2 $\mu\text{g/mL}$ como control negativo. Cada cepa de *H. pylori* se utilizó desde un traspaso en agar con 2 a 3 días de crecimiento. El inóculo bacteriano McFarland 2, se preparó en suero fisiológico estéril, correspondiente a una concentración bacteriana de 6×10^8 UFC/mL. Luego se tomó 3 μL del inóculo y se sembró por triplicado (microgota) en las placas de agar preparadas previamente. Las placas se incubaron tapadas y selladas con parafilm por 72 h, a 37° C y microaerofilia (10% CO_2). La concentración mínima inhibitoria correspondió a la menor concentración en la cual no hay crecimiento visible. Se

confirmó crecimiento obtenido mediante prueba de ureasa, catalasa y microscópicamente para confirmar morfología.

2.8 Determinación de la CMI en mezclas.

Esta se realizó utilizando el método del tablero de ajedrez, de acuerdo a las recomendaciones del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). Se trabajó con microplacas de 96 pocillos, utilizando las combinaciones de compuesto polifenólicos purificados A y B en el rango de 0–4 CMI. Para cada serie de estudio, se mantuvo la concentración de uno de los polifenoles constante y se varió el segundo polifenol entre 0 y 4 CMI modificado de la técnica descrita por Tanaka *et al.* (2002). Se trabajó con volúmenes finales de 200 microlitros y un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL. Las microplacas se incubaron por 72 h, a 37° C y microaerofilia (10% CO₂). Luego de este tiempo, se agregó 10 µL de resazurina a cada pocillo, incubando por 1 h más. Los ensayos se realizaron en triplicado para cada combinación de compuestos por cada cepa estudiada.

Con los resultados obtenidos se dibujó el isoblograma respectivo, el cual se construyó graficando la CMI de cada compuesto obtenida en presencia del segundo compuesto en concentración constante.

2.9 Cinética de Muerte.

Para este ensayo se seleccionó la cepa ATCC 43504, tomando como criterio que aquellas mezclas que presentaron el mejor efecto en las combinaciones de compuestos (Pillai *et al.*, 2005) se sometieron a este análisis. El ensayo de curva de muerte se desarrolló en caldo infusión cerebro corazón (BHI) suplementado con 1 % de levadura, utilizando las concentraciones correspondientes a la de la menor combinación que produjo inhibición del crecimiento. A partir de un cultivo de 72 h a 37

°C de la cepa bacteriana, en caldo BHI se preparó una suspensión bacteriana con turbidez equivalente al estándar Mc Farland 0,5 (10^8 UFC/mL) y se hizo una dilución en caldo BHI hasta una concentración que permitiera obtener, aproximadamente, 10^5 UFC/ml como población inicial en cada matraz. Se inocularon matraces conteniendo 1 mL de caldo BHI con las diferentes combinaciones de compuestos establecidas y un matraz sin compuesto como control de crecimiento. Se tomaron muestras en los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas para recuento bacteriano. Para esto se tomaron alícuotas de 10 μ L de cultivo que se colocaron en una placa de agar Columbia suplementado con sangre de caballo desfibrinada y se realizó microgota. Se utilizó el criterio de Pearson *et al.* (1980) para establecer muerte bacteriana, El ensayo de curva de muerte se realizó en duplicado para cada combinación de compuesto con la cepa estudiada.

2.10 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Con el propósito de observar si hubo cambios morfológicos que se produjeron en la bacteria al estar en contacto con las diferentes mezclas de compuestos mayoritarios, se fueron obteniendo alícuotas al realizar la cinética de muerte de la cepa 43504 y se analizaron mediante microscopía electrónica. Para esto se centrifugaron las muestras y el pellet bacteriano, el cual se lavó 3 veces con 750 μ L de agua destilada estéril, centrifugando a 5.000 g por 10 min cada vez. Después de eliminarse el sobrenadante, los pellets se fijaron con glutaraldehído al 2,5% y se conservaron a 4°C, hasta el momento de su procesamiento. Las muestras ya fijadas en glutaraldehído se llevaron al Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción donde fueron procesadas y analizadas.

Para preparar las muestras para microscopía electrónica de transmisión, se utilizó la técnica de inclusión en Araldita (Durcupan ACM, de Fluka, Suiza). Se pusieron en una solución lavadora (con fosfato de sodio pH 7.2), por 12 horas, a 4°C. Se refijaron las

muestras con tetróxido de Osmio por 2 horas (el pellet bacteriano adquirió una coloración negra). Se deshidrataron en pasos sucesivos de acetona: 30° por 15 min, de 50° de 15 min, de 70° con acetato de uranilo por 30 min, de 90° por 30 min y acetona de 100° por 30 min. Luego las muestras se hicieron pasar por óxido de propileno (OC) por 30 min, óxido de propileno 3 partes y 1 parte de mezcla Araldita (MA, una resina epoxi) durante 1 hora, OC 2 partes + 2 partes de MA por 1 hora, 1 parte de OC + 3 partes de MA por 1 hora. Luego solo MA por toda la noche. Para formar las cápsulas con las muestras en los moldes se incluyó un poco de la mezcla de la resina compuesta por 10 mL de la resina Epoxy, 10 mL del endurecedor, 0,3 a 0,4 mL del catalizador y 0,1 a 0,2 mL del plastificante (Ftalandibutil y Dibutilftalato), luego se incluyó la resina con la muestra, tratando de que en la punta del molde quedara con la mayor cantidad de partículas posibles. Se rellenó el molde con la mezcla resinosa y se llevó a la estufa por 48 horas a 60° C. Se sacaron las cápsulas, se esperó 24 horas y se tallaron, de modo de eliminar el exceso de resina que hubiera quedado sin o con muy poca muestra. A partir de estos tallados se obtuvieron cortes de unos 50-60 nm con un ultra micrótopo y con un cuchillo de vidrio. Algunos de estos cortes teñidos se analizaron previamente en un microscopio óptico, de modo de determinar si contenían una cantidad suficiente de bacterias para poder ser visualizadas mediante microscopía electrónica. Una vez que se determinó que la cantidad bacteriana era adecuada se recogieron cortes en Grillas de 200 mesh, hecha de colodión y una capa de carbón, 2 por cada muestra. Estos cortes se tiñeron y se visualizaron en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL-JEM 1200 EX II (Jeol Technics Ltd, Tokyo, Japan).

2.11 Análisis estadístico.

Para los análisis estadísticos realizados: análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95% de confianza, el test de Tukey y para graficar, se utilizó el programa GraphPad Prism 6. En el experimento de difusión en agar los datos representan los resultados

de dos experimentos independientes realizado en triplicado (placas). Para determinar, si existían diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En el análisis de cinética de muerte los datos son resultado de dos experimentos independientes y también se determinó si existía diferencia significativa en cuanto a su crecimiento.



3. RESULTADOS

3.1 Cromatografía de partición centrifuga (CPC) y sustracción química de los compuestos mayoritarios del propóleo.

A partir de 20.10 g de propóleo crudo que se sometió a la extracción etanólica, se obtuvo un porcentaje de rendimiento del 50.84 %, que en masa fue un equivalente a 10.21 g de propóleo. Este se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta su utilización en los distintos análisis del estudio.

Para seleccionar el sistema Arizona que se utilizó en la cromatografía de partición centrifuga (CPC) se ensayaron los sistemas M, N, P, Q y el sistema óptimo, calculando mediante HPLC-DAD el coeficiente de partición K_D de cada uno. El que mejor resultado presentó fue el sistema óptimo (Hexano/Acetato de etilo/metanol/agua 5:4:5:4.5), en el que los compuestos seleccionados presentaron valores de K_D entre 0.5-1.5, por lo que este fue el que se eligió como fase móvil para los siguientes separaciones de CPC (datos no mostrados).

Al realizar la separación de la muestra de propóleo mediante CPC en modo ascendente en el sistema Arizona óptimo se obtuvieron fracciones apolares y polares, las cuales se agruparon según el contenido de compuestos polifenólicos que poseían, esto se evidenció a través de TLC (Figura 3.1), utilizando estándares comerciales permitió identificar tentativamente presencia del fenil éster del ácido cafeico (CAPE) en la fracción 10 (carril 10), galangina en la fracción 8, pinocembrina en la fracción 9, crisina y canferol en la fracción 11. Los compuestos que presentaron cualitativamente mayor abundancia relativa, según la intensidad de la banda, fueron CAPE (F10), galangina (F8) y pinocembrina (F9).

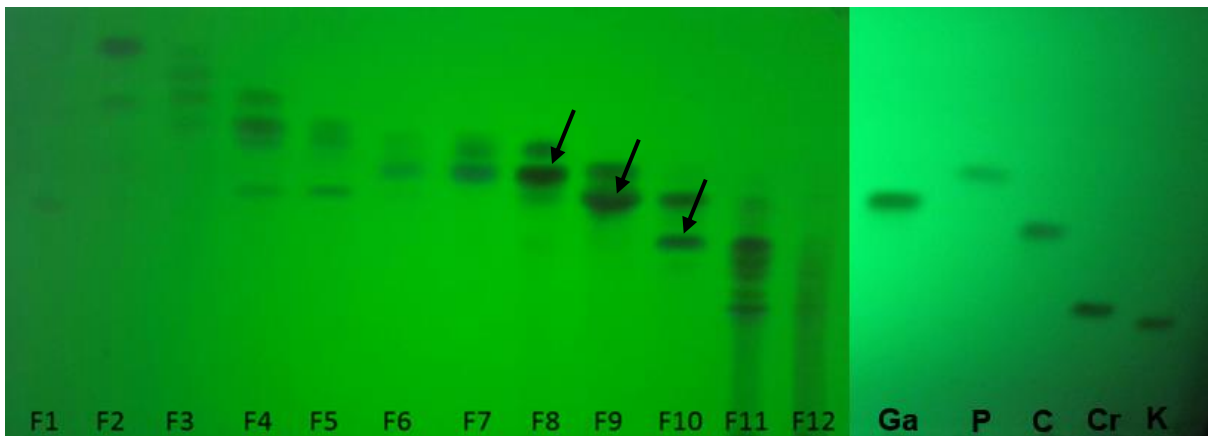


Figura 3.1 Cromatografía de capa fina de fracciones de propóleos. F1-F12 corresponden a las fracciones obtenidas por CPC. Como estándar se utilizaron los siguientes compuestos: Ga (Galangina), P (Pinocembrina), C (CAPE), Cr (Crisina), K (Canferol). Las flechas indican los compuestos con una abundancia relativa mayor.

Fuente: elaboración propia.

Identificadas las fracciones donde se encontraban los compuestos mayoritarios, estas se sometieron a un segundo análisis por CPC para una mejor separación de los compuestos. En la Figura 3.2 se señalan las zonas del cromatograma (peak) que se agruparon donde se encontraban los compuestos mayoritarios: en una fracción se encontró que estaban presentes K (canferol), C (CAPE) y Cr (crisina) y en la otra fracción con una mayor intensidad de señal y un peak más prominente se encontró Ga (galangina) y P (pinocembrina). Se estableció que se trataba de dichos compuestos por cromatografía de capa fina TLC con su respectivo estándar. Este mismo procedimiento se siguió para la fracción donde estaban presente pinobansina y derivados. Estas se separaron del resto de fracciones para su posterior caracterización por HPLC-DAD.

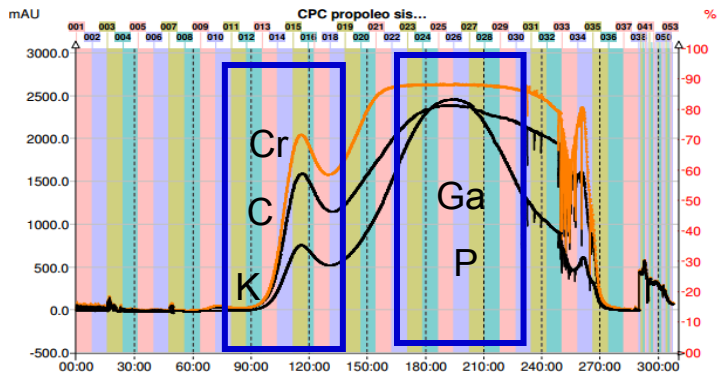


Figura 3.2 Cromatograma del segundo análisis por CPC. Espectros obtenidos a distintas longitudes de onda: línea negra (280 nm), línea naranja (350 nm). Compuestos mayoritarios: K (canferol), C (CAPE), Cr (crisina), Ga (galangina), P (pinocembrina).

Fuente: elaboración propia.

Todas las fracciones obtenidas por CPC a partir del extracto total se unieron en un pool, exceptuando la F10 rica en CAPE. La Figura 3.3 muestra la zona de extracción del cromatograma que se sustrajo. El análisis del pool por TLC y HPLC-DAD confirmó la ausencia de CAPE y se le denominó propóleos sin CAPE.

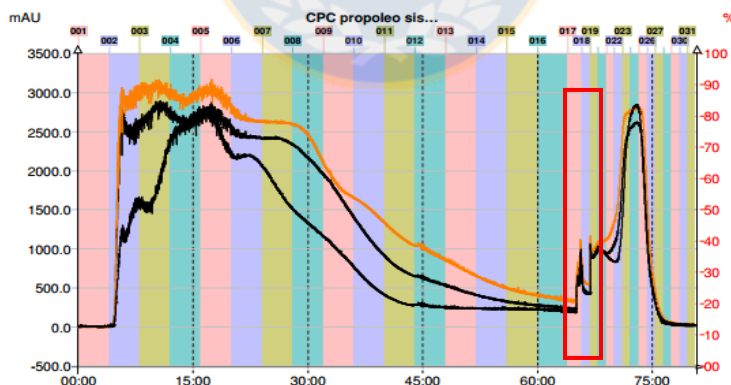


Figura 3.3 Representación de la zona de sustracción química. El cromatograma de la muestra total de propóleos muestra en el recuadro la zona correspondiente a la fracción 10, eliminada para formar el pool de propóleos sin CAPE. Línea negra: cromatograma a 280 nm, línea naranja cromatograma a 350 nm.

Fuente: elaboración propia.

3.2 Identificación y cuantificación de compuestos mayoritarios del propóleo por HPLC UV-DAD.

3.2.1 Identificación de compuestos mayoritarios

El contenido total de compuestos presentes en la muestra de propóleos en estudio evidenció la presencia de 20 polifenoles (Figura 3.4 y Tabla 3.1), los cuales mayoritariamente pertenecen a flavonoides y ácidos fenólicos. Según su tiempo de retención, su fácil aislamiento y su probada actividad anti-*H. pylori* los compuestos mayoritarios identificados en la muestra de propóleos fueron: crisina, CAPE, canferol, pinocembrina, galangina, pinobansina y derivados.

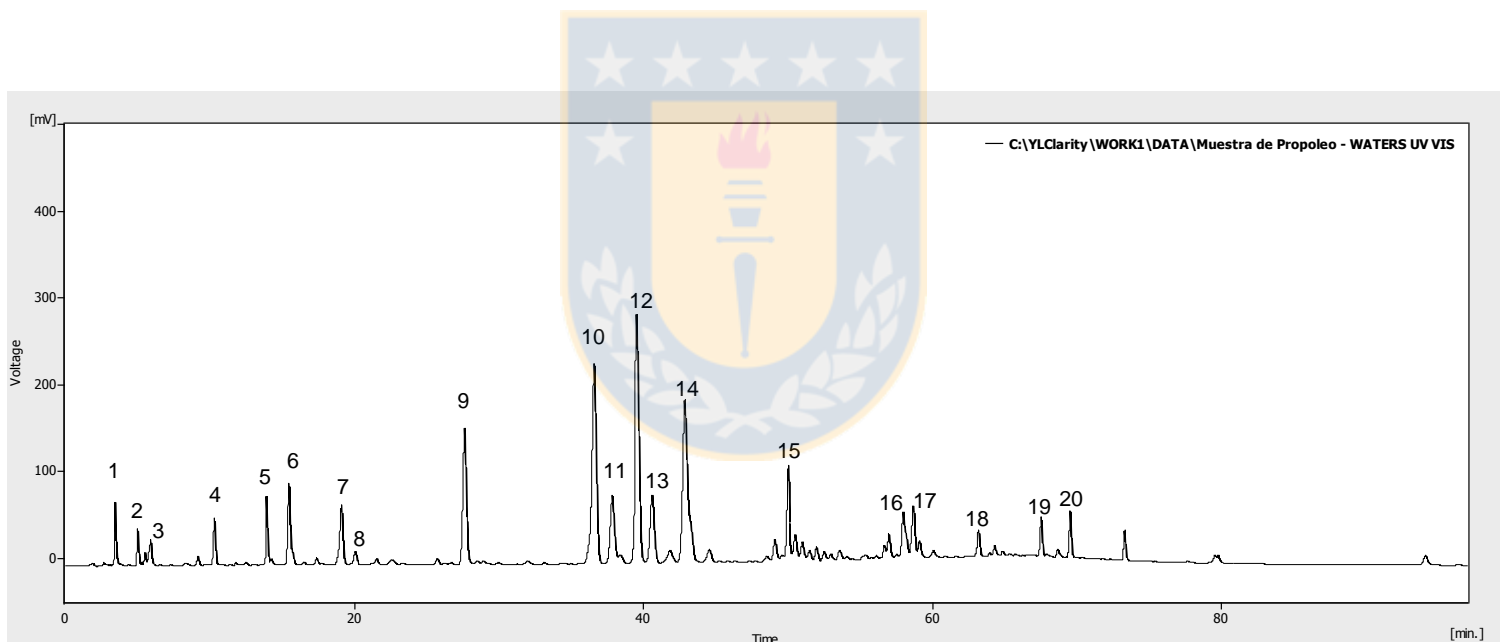


Figura 3.4 Cromatograma de la caracterización del contenido total de compuestos presentes en la muestra de propóleos en estudio. Los números 1 al 20 representan los peak mayoritarios con los compuestos de interés.

Fuente: elaboración propia.

De los 20 compuestos caracterizados, 12 se identificaron por comparación con datos de referencias publicadas y los otros 8, por comparación con estándares comerciales.

Cabe señalar que los estándares comerciales con los que se contó fueron: canferol, crisina, CAPE, canferido, galangina, pinocembrina, ácido cafeico, quercitina, ácido cinámico y ácido ferulicó. De los cuales no se encontraban en nuestra muestra quercetina y ácido cinámico, ya que, no fueron detectados.

Tabla 3.1 Identificación de cada peak del análisis de la muestra de propóleos en estudio

Compuesto	Tiempo de retención Tr (min)	Número de peak	Referencia
Ácido cafeico	3,6	1	A
Acido p-cumarico	5,2	2	B
Ácido ferulicó	6,2	3	A
Ácido cafeico 3,4-Dimetil (DMCA)	10,9	4	B
Pinobanksin-5-metil-eter	14,7	5	B
Canferide	16,4	6	A
Apigenina	18,8	7	B
Canferol	20,3	8	A
Acido cinamiliden acetico	29,1	9	B
Acido cafeico metil éter	38,5	10	B
Crisina	39,6	11	A
Pinocembrina	41,5	12	A
Galangina	42,6	13	A
CAPE	44,7	14	A
Pinobansina-3-o-acetato	44,7	14	B
Prenil ester p-cumarico	51,9	15	B
Cinamil ester p-cumarico	58,5	16	B
Pinobansina-3-o-butirato	59,1	17	B
Pinobansina-3-o-pentanoato	64,3	18	B
Pinobansina-3-o-hexanoato	65,7	19	B
Ácido cinamico cinamil ester p-metoxi	68,5	20	B

^a confirmado con estándar, ^b confirmado con referencias (base de datos). Fuente: elaboración propia.

La Figura 3.5 muestra la estrategia utilizada para la identificación de los peak del cromatograma de la caracterización del contenido total de compuestos, como ejemplo: el compuesto galangina, cuyo estándar comercial presento un tiempo de retención t_R de 40,63 min, lo que permitió localizar dicho compuesto en el cromatograma. Para los peak que se identificaron por referencia se prosiguió de acuerdo con lo informado por Pellati *et al.* (2011).

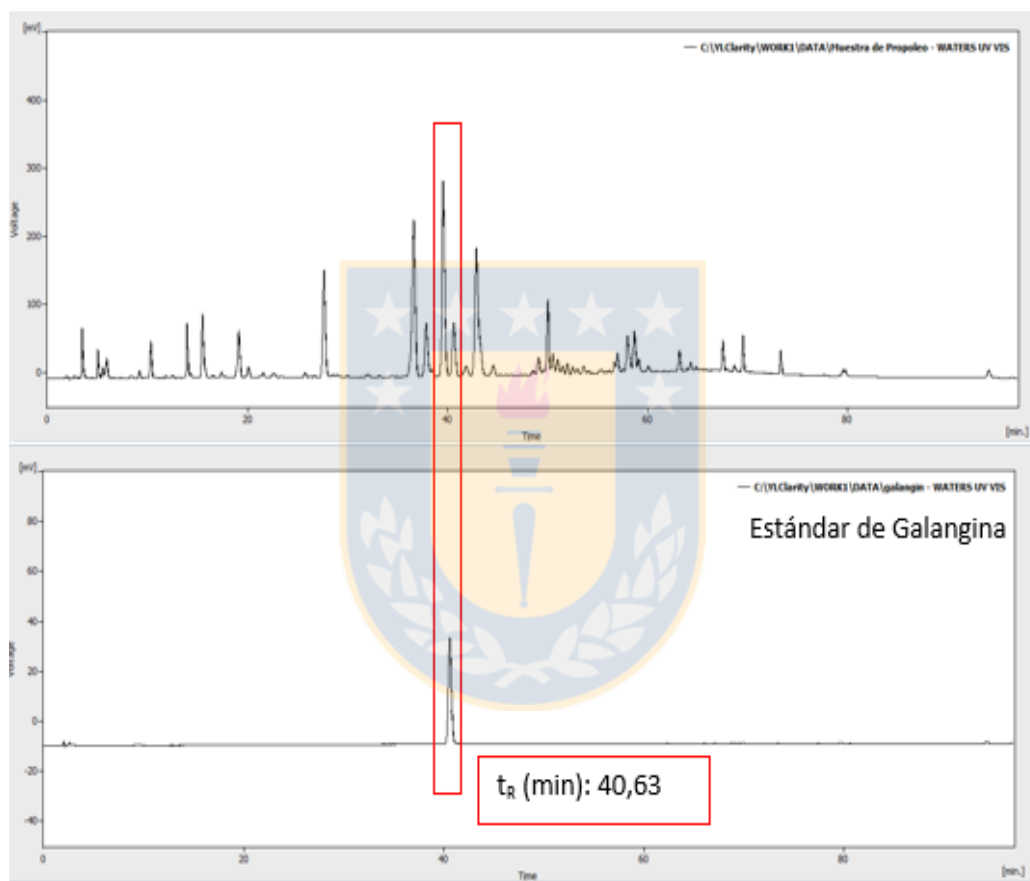


Figura 3.5 Cromatograma ejemplo de la identificación de cada compuesto mayoritario. Fuente: elaboración propia.

Para conocer si los compuestos minoritarios del propóleos tenían actividad anti-*H. pylori* y no discriminarlos a la hora de seleccionar cuales continuarían en los análisis posteriores, se conformaron en tres fracciones de acuerdo con el cromatograma de la caracterización del contenido total (Figura 3.6). Agrupando los peak de cada fracción

y probando su actividad por el ensayo de difusión en agar (datos mostrados más adelante en la Figura 3.15), cabe destacar que los compuestos mayoritarios se encontraron en la fracción 2 (F2). Al ser obtenidas estas fracciones por HPLC semipreparativo la cantidad de la F1 fue de 22.1 mg, de F2 42.2 mg y de F3 26.5 mg.

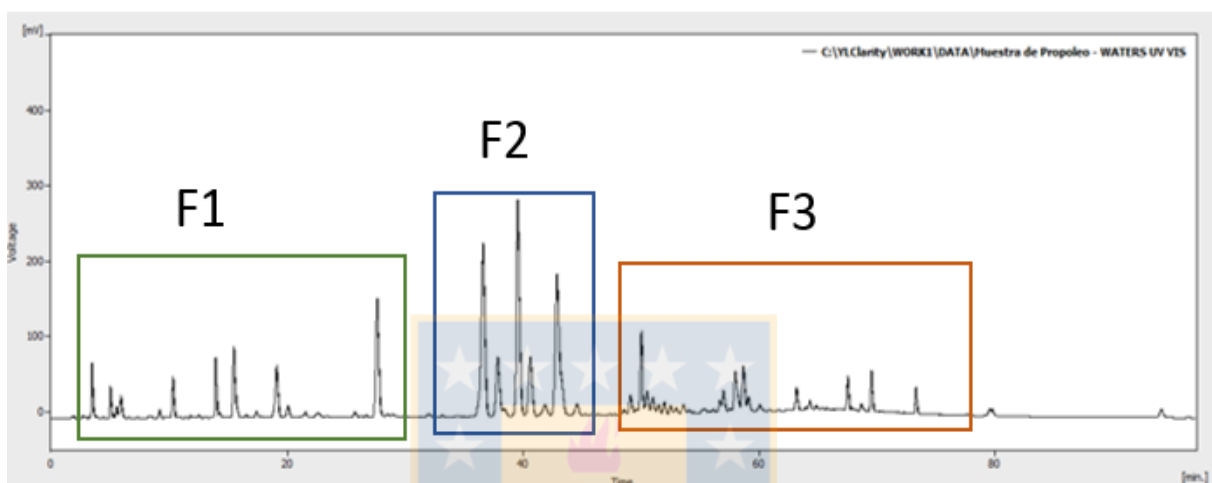


Figura 3.6 Fracciones agrupadas de acuerdo al cromatograma de la caracterización del contenido total de los compuestos presentes en la muestra de propóleos. F1: fracción 1, F2: fracción 2, F3: fracción 3. Fuente: elaboración propia.

3.2.2 Cuantificación de compuestos mayoritarios

Los estándares disponibles de los compuestos mayoritarios del propóleos se dividieron en dos grupos de tres, uno formado por CAPE, canferol, canferido y el otro, por crisina, pinocembrina y galangina. Cada grupo de estándar triple se sometió a análisis de HPLC-DAD en 5 diferentes concentraciones (150, 75, 37, 18, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por duplicado y se construyó las curvas de calibración correspondientes. En la Figura 3.7 se muestra como ejemplo el cromatograma del estándar triple de crisina, galangina y pinocembrina a concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

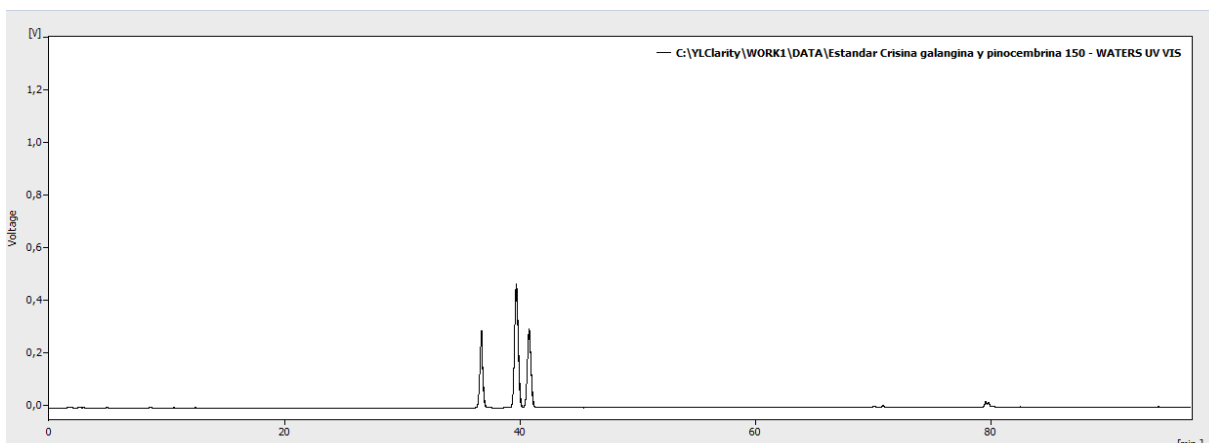
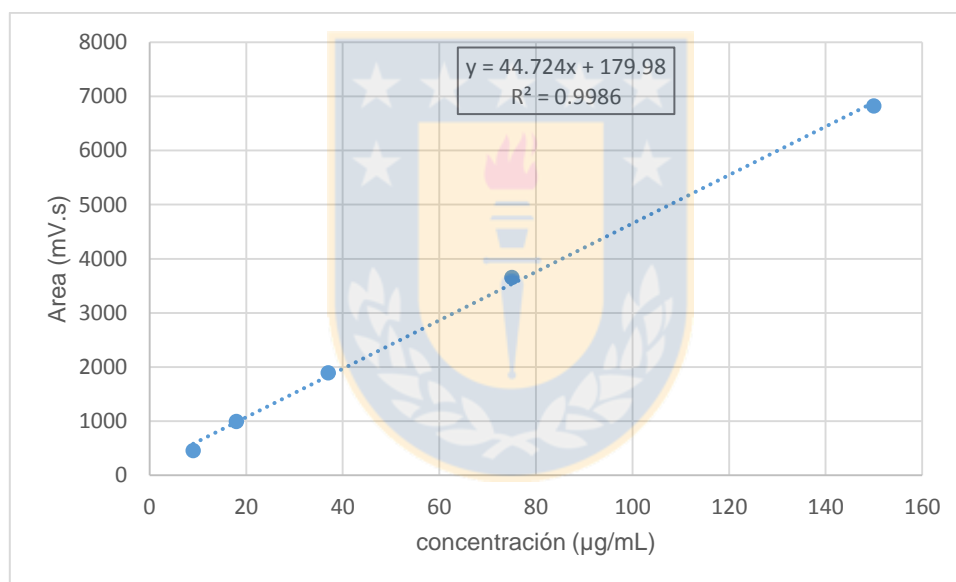
A**B**

Figura 3.7 Curva de calibración de galangina. A: Cromatograma del estándar triple: crisina, galangina y pinocembrina a concentración 150 µg/ml, B: curva de calibración obtenida del cromatograma. Fuente: elaboración propia.

El análisis de los cromatogramas y su cuantificación permitió establecer que de los compuestos caracterizados y que presentaron actividad anti-*H. pylori*, se determinó que CAPE presentaba la mayor concentración (8.02 %) seguido de pinocembrina (4.00 %). La menor concentración la presentó el compuesto canferido (1.00 %) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Contenido de los compuestos mayoritarios en la muestra de propóleos en estudio.

Compuesto	Pendiente (a)	Intercepto (b)	R ²	Porcentaje en la muestra de propóleos
CAPE	31.446	15.007	0.9993	8.02
Canferol	26.347	68.130	0.9978	2.02
Canferido	29.803	25.191	0.9997	1.00
Crisina	42.435	95.176	0.9980	1.85
Galangina	44.729	179.980	0.9986	3.42
Pinocembrina	70.748	373.620	0.9980	4.00

a y b se obtienen de la ecuación $y = ax + b$ dada por la curva de calibración. R² coeficiente de regresión lineal. Fuente: elaboración propia.

3.3 Purificación de compuestos mayoritarios del propóleos por HPLC semipreparativo.

Al conocer los tiempos de retención de los compuestos mayoritarios y el patrón del cromatograma, se procedió a recolectar manualmente la muestra que correspondían a los compuestos de interés. En la Figura 3.8 se muestran los tiempos de retención para los compuestos galangina (G), pinocembrina (P), pinobansina y derivados (Pn). Las fracciones recolectadas se sometieron a desecación con nitrógeno líquido, obteniéndose las siguientes cantidades de compuestos puros: galangina 3.6 mg, pinocembrina 10.5 mg, CAPE 74.5 mg, pinobansina y sus derivados 18.4 mg.

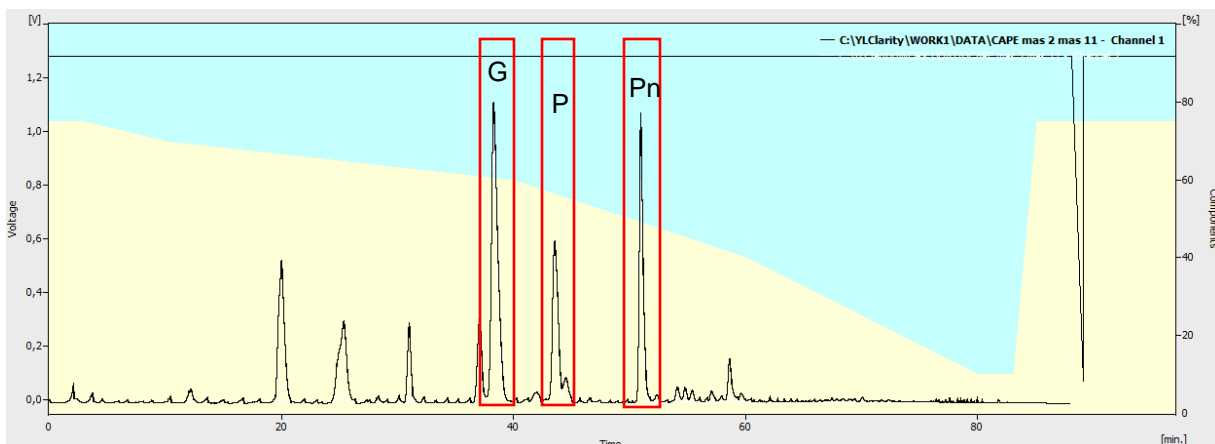


Figura 3.8 Cromatograma de los compuestos mayoritarios purificados. Peak señalados se recolectaron. Fuente: elaboración propia.

3.4 Confirmación de compuestos mayoritarios por TLC-MS Interface.

Al realizar el análisis de cromatografía de capa fina se encontraron bandas características de los compuestos mayoritarios del propóleo, que luego se sometieron a TLC-MS. La masa experimental de cada compuesto con este proceso, permitió su identificación (Tabla 3.3). Crisina presentó una masa experimental de m/z 253; pinobansina presentó una masa experimental de m/z 313.00, que permitió identificar a pinobansina-3-O-acetato como único compuesto. El resto de los compuestos identificados en las otras muestras fueron galangina con m/z 269.05, pinocembrina con m/z 256.00, feniletil éster del ácido cafeico (CAPE) con m/z 283.10 y canferol con m/z 285.10. Como ejemplo del procedimiento desarrollado, en la Figura 3.9 se presenta el espectro de masas del feniletil éster del ácido cafeico (CAPE) con una masa experimental de m/z 285.10, que muestra la intensidad de la banda mayoritaria en modo negativo además de sus dímeros producto de la fragmentación. Cabe señalar que estos últimos corresponden a la masa del compuesto menos la masa de una molécula de agua y menos la masa de una molécula de dióxido de carbono.

Aplicado el mismo procedimiento con los estándares comerciales de los compuestos, se obtuvo resultados de masas que coincidieron con la masa de espectros disponibles en la literatura (Pellati *et al.*, 2011), lo que a su vez sirvió de base de datos para este estudio (datos no mostrados).

Tabla 3.3 Compuestos mayoritarios identificados por TLC-MS Interface en la muestra de propóleos en estudio.

Masa Exacta	[M-H] ⁻ experimental	Compuesto
254.05	253.00	Crisina
314.07	315.00	Pinobanksin-3-o-acetato
270.05	269.05	Galangina
256.07	256.00	Pinocembrina
284.10	285.10	Feniletil ester del ácido cafeico (CAPE)
286.04	285.10	Canferol

[M-H]⁻: ion molecular realizado en el modo de iones negativos. Fuente: elaboración propia.

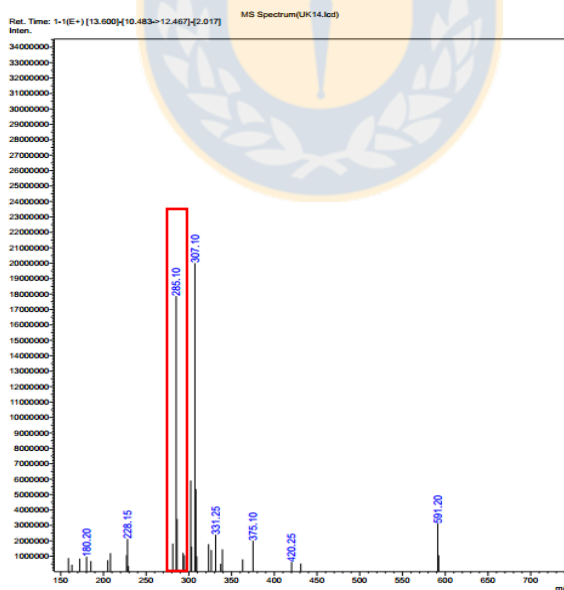
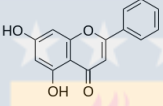
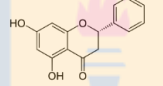
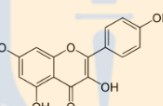
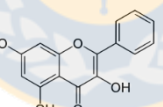
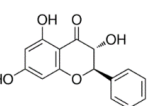
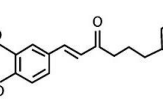


Figura 3.9 Espectro de masas del compuesto mayoritario feniletil éster del ácido cafeico (CAPE). $[M-H]^- = 285.10$, $[M-H-H_2O]^- = 213$, $[M-H-CO_2]^- = 181.05$.

Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 3.4 se presenta un resumen de los compuestos mayoritarios del propóleos identificados y su clasificación química: crisina, galangina y canferol pertenecen a los flavonoles y flavonas; Pinocembrina y pinobansina-3-o-acetato pertenecen a las flavononas y dihydroflavonolas, en tanto que el feniletíl ester del ácido cafeico (CAPE) corresponde a los ácidos fenólicos y derivados.

Tabla 3.4 Estructura y clasificación química de los compuestos mayoritarios del propóleos en la muestra de estudio.

compuesto	Estructura	Clasificación química
Crisina		flavonoles y flavonas
Galangina		
Canferol		
Pinocembrina		flavononas y dihydroflavonolas
Pinobanksin-3-o-acetato		
fenil ester del ácido cafeico (CAPE)		ácido fenólico y sus derivados

Fuente: elaboración propia.

A continuación se presentan los resultados de los ensayos funcionales de los seis compuestos mayoritarios del propóleos descrito previamente.

3.5 Ensayo de difusión en agar.

Todos los compuestos mayoritarios del propóleos que se lograron aislar tuvieron actividad inhibitoria sobre las cuatro cepas en estudio de *H. pylori* (Figuras 3.10, 3.11, 3.12). Sin embargo, se observó cualitativamente que la actividad de estos compuestos mayoritarios era dependiente de la cepa en estudio; así, las cepas ATCC (Figura 3.10 y Figura 3.11) presentaron mayor zona de inhibición, a una misma concentración del compuesto, en comparación a con las cepa clínica (Figura 3.12).

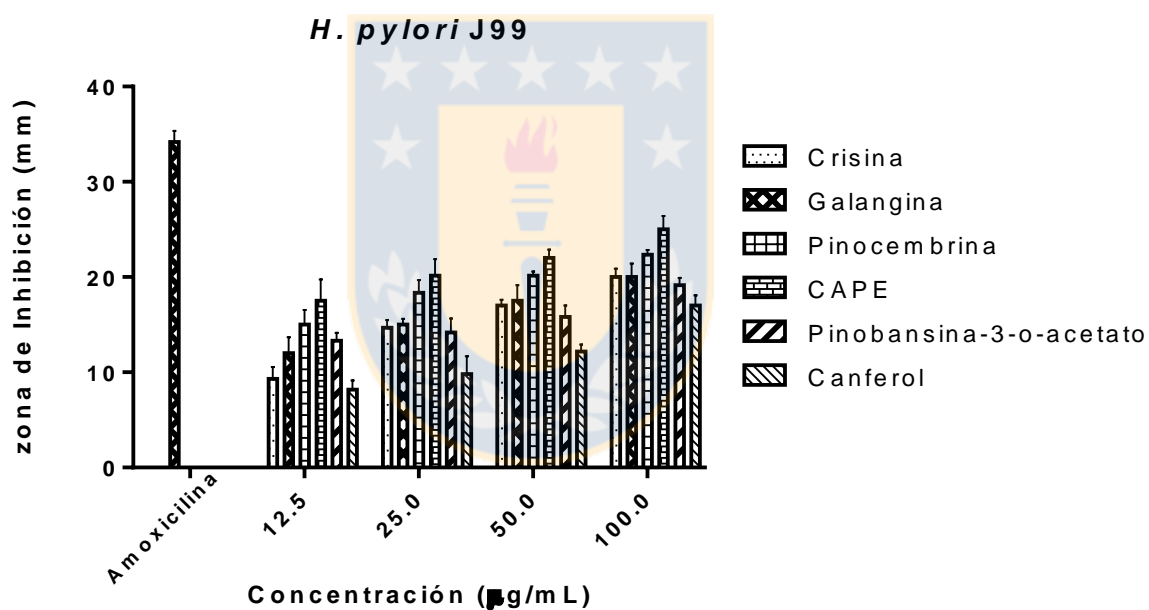


Figura 3.10 Actividad anti-*H. pylori* de los compuestos mayoritarios del propóleos sobre la cepa *H. pylori* ATC J99. Fuente: elaboración propia.

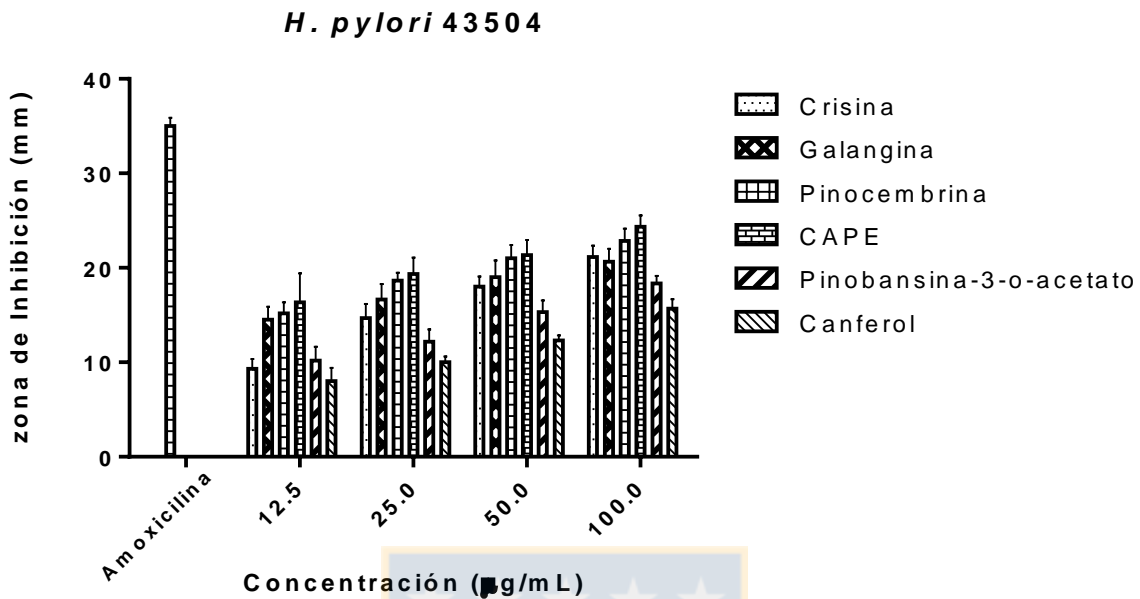


Figura 3.11 Actividad anti-*H. pylori* de los compuestos mayoritarios del propóleo sobre la cepa *H. pylori* ATCC 43504. Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, la comparación de los compuestos en su actividad anti-*H. pylori*, a una misma concentración, demostró diferencias en su capacidad inhibitoria. El compuesto con mayor zona de inhibición para las cepas en estudio fue CAPE, alcanzando halos de inhibición con diámetros entre los 21 mm (a concentración 12,5 µg/mL) y 26 mm (a concentración 100 µg/mL) para la cepa J99 (Figura 3.13). Con la cepa 43504 se observó variaciones en el diámetro de las zonas de inhibición desde 21 mm para la menor concentración hasta 25 mm, con la mayor; con la cepa clínica 84 C, en tanto, las variaciones del diámetro de la zona de inhibición según la concentración utilizada varió entre 10 y 21 mm, respectivamente. Cualitativamente, canferol fue el compuesto que presentó menor zona de inhibición para las cepas ATCC, con halos cuyo diámetro variaron entre 12 y 18 mm para la cepa J99, entre 13 y 20 mm para la cepa 43504.

Para la cepa clínica 84 C, dependiendo de la concentración empleada en el ensayo el compuesto que presentó menor zona de inhibición fueron canferol y pinobansina-3-o-acetato los compuestos que presentaron menor zona de inhibición. Canferol con halos de 9 y 17 mm para la cepa 84 A, y entre 8 y 16 mm para la cepa 84 C. mientras que pinobansina-3-o-acetato entre los 8 y 15 mm para la cepa 84 A y 6 y 16 mm para la cepa 84 C.

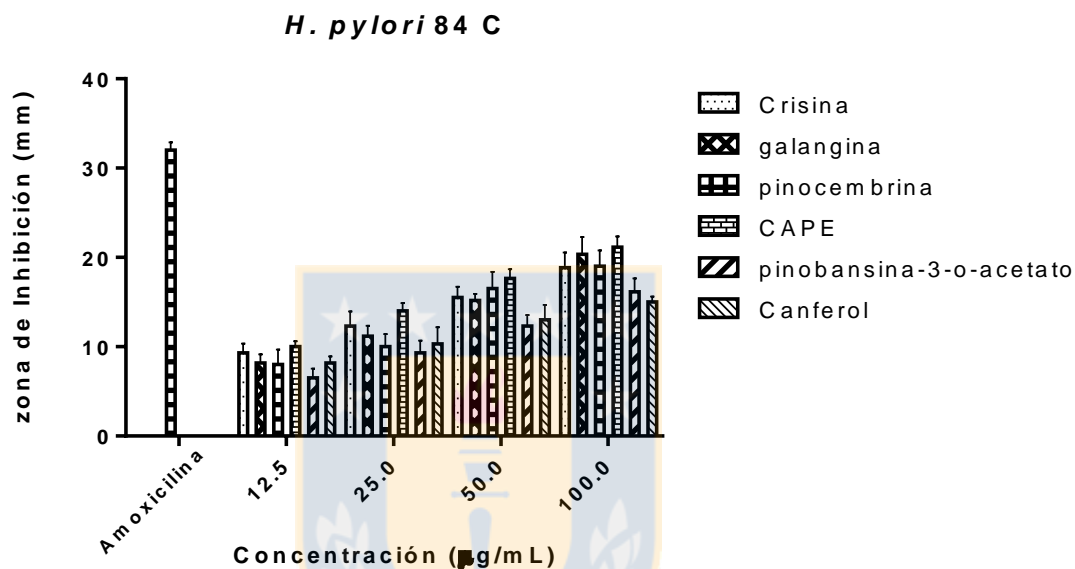


Figura 3.12 Actividad anti-*H. pylori* de los compuestos mayoritarios del propóleos sobre la cepa clínica de *H. pylori* 84C. Fuente: elaboración propia.

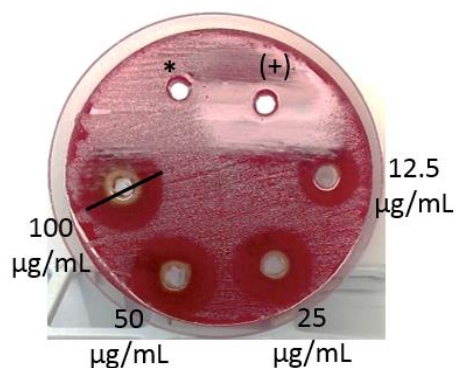


Figura 3.13 Ejemplo del efecto anti-*H. pylori* del compuesto mayoritario CAPE frente a la cepa J99 . *: DMSO 10%, (+): Amoxicilina 2 µg/mL. Fuente: elaboración propia.

Los resultados de los ensayos de inhibición de *H. pylori* utilizando propóleos total y propóleos sin CAPE (ver materiales y métodos) muestran una diferencia significativa en su actividad inhibitoria ($p < 0.05$) frente a las cepas en estudio (Figura 3.14). Así, la ausencia de CAPE en el propóleos se asoció en una disminución en la actividad bacteriana, observándose zonas de inhibición con diámetros menores a los presentados en el propóleos total.

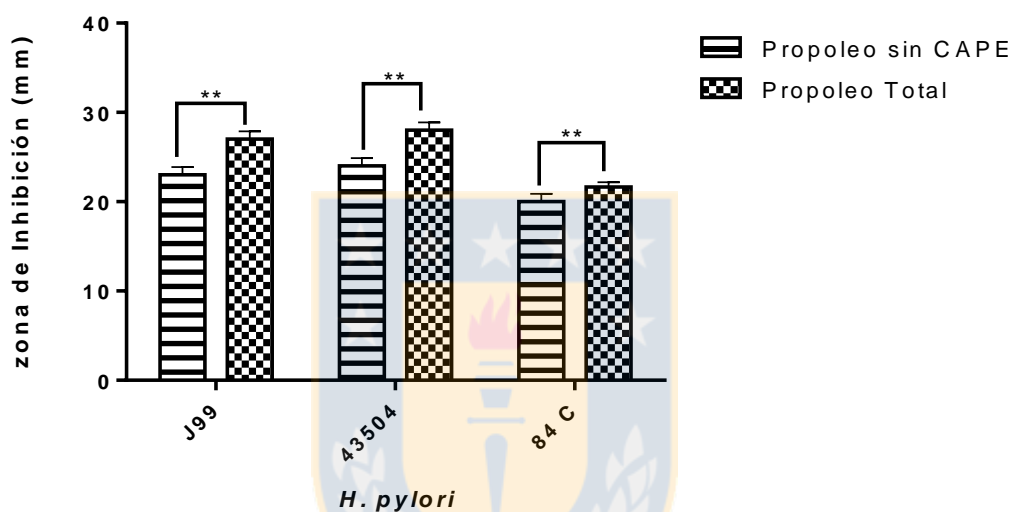


Figura 3.14 Actividad inhibitoria de propóleos sin CAPE y del propóleos total sobre las cepas de *H. pylori*. Se utilizó como control positivo Amoxicilina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obteniendo una zona de inhibición de 35 mm (datos no mostrados). Fuente: elaboración propia.

El estudio de la actividad anti-*H. pylori* de cada fracción obtenida de la separación de compuestos polifenólicos de propóleos (Fracción F1, F2 y F3, ver materiales y métodos) mostró que todas las fracciones poseían actividad inhibitoria sobre la cepa ATCC y la cepa clínica 84 C de *H. pylori* (Figura 3.15). La mayor zona de inhibición se observó con la fracción 2, donde se encuentran los compuestos mayoritarios, en comparación a las fracciones F1 y F3 que contienen compuestos minoritarios. Estas diferencias son significativas entre las fracciones ($p < 0.001$)

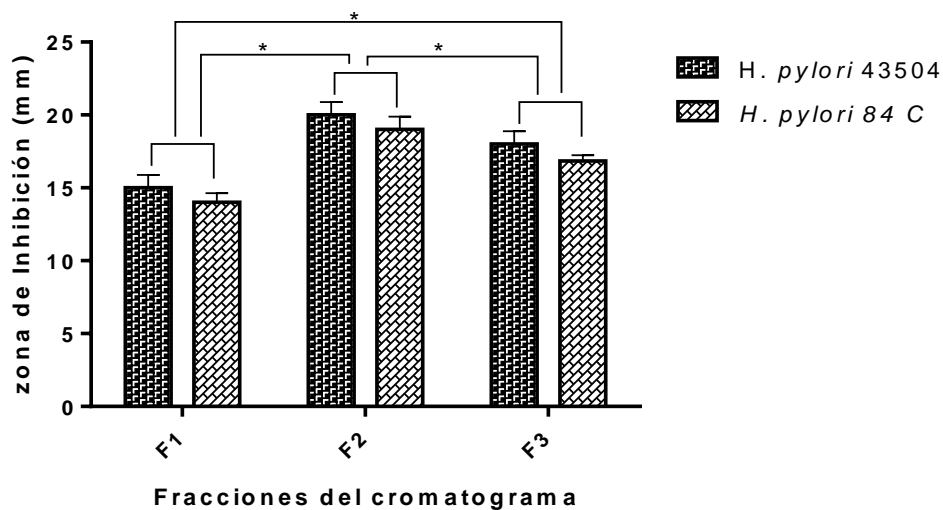


Figura 3.15. Actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas de la separación de compuestos polifenólicos de propóleos. F1: Fracción 1, F2: Fracción 2, F3: Fracción 3.

Fuente: elaboración propia.

Además que al comparar estadísticamente las fracciones por individual con el propóleos total (Figura 3.16) para ambas cepas ATCC y clínica se encontró que había diferencia significativa ($p < 0.001$).

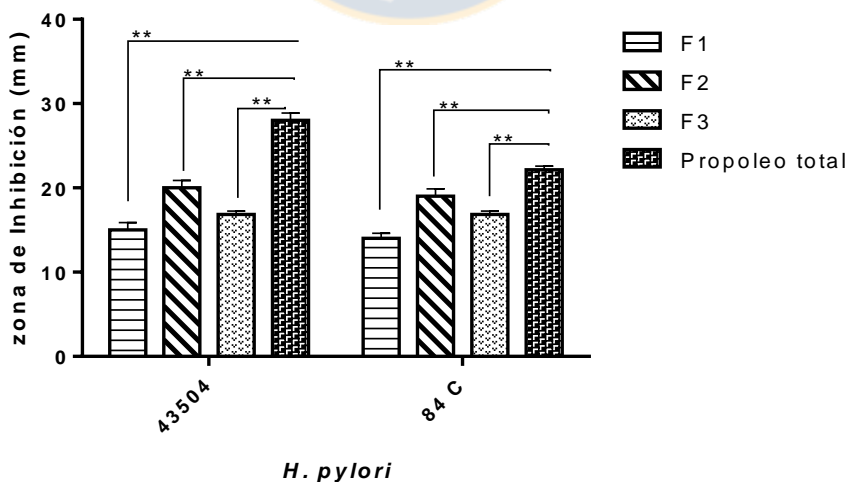


Figura 3.16 Comparación de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas con el propóleos total. F1: Fracción 1, F2: Fracción 2, F3: Fracción 3. Fuente: elaboración propia.

3.6 Determinación de la CMI para cada compuesto purificado.

Al determinar la concentración mínima a la cual cada compuesto mayoritario inhibe a *H. pylori* se encontró que el compuesto que necesitaba menor concentración para ejercer dicho efecto fue CAPE (64 µg/mL para la cepa 43504). Los compuestos que presentaron mayor CMI fueron canferol y pinobansina-3-o-acetato, ambos con CMI de 1024 µg/mL (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI µg/mL) de los Compuestos mayoritarios ensayo realizado por dilución en agar con la cepa ATCC.

Cepa	Compuesto mayoritario	Crecimiento bacteriano en									
		concentraciones del compuesto (µg/mL)							Crecimiento en		
		16	32	64	128	256	512	1024	Amoxicilina 2 µg/mL	DMSO 10%	
<i>H. pylori</i> 43504	CAPE	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Galangina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	Crisina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	Pinocembrina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	Canferol	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	Pinobanksin-3-o-acetato	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Los datos son representativos de dos experimentos independientes. -: no crecimiento,+: crecimiento.

CAPE: feniletil ester del ácido cafeico. Fuente: elaboración propia.

Cuando se comparó los valores de CMI obtenidos para la cepa clínica 84 C y la cepa ATCC 43504, se observó que todas las CMI frente a la cepa clínica eran el doble de la observada con la cepa de referencia. Por ejemplo, galangina inhibe a una

concentración de 128 µg/mL a la cepa 43504 y a una concentración de 256 µg/mL la cepa 84 C (Tabla 3.5 y Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI µg/mL) de los Compuestos mayoritarios presentes en el propóleo con la cepa clínica.

Cepa	Compuesto mayoritario	Crecimiento bacteriano en concentraciones								
		del compuesto (µg/mL)						Crecimiento en		
		32	64	128	256	512	1024	2048	Amoxicilina 2 µg/mL	DMSO 10%
<i>H. pylori</i> 84 C	CAPE	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	Galangina	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	Crisina	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	Pinocembrina	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	Canferol	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	Pinobanksin-3-o-acetato	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Los datos son representativos de dos experimentos independientes. -: no crecimiento, +: crecimiento. CAPE: feniletil ester del ácido cafeico. Fuente: elaboración propia.

La Figura 3.17 muestra el resultado de uno de los análisis utilizando la cepa 43504 de *H. pylori*. Hasta ese momento solo se sabía que los compuestos mayoritarios inhibían individualmente el crecimiento de las cepas de *H. pylori*, por lo que para determinar si existe interacción entre estos se prosiguió a analizar su CMI en mezclas.

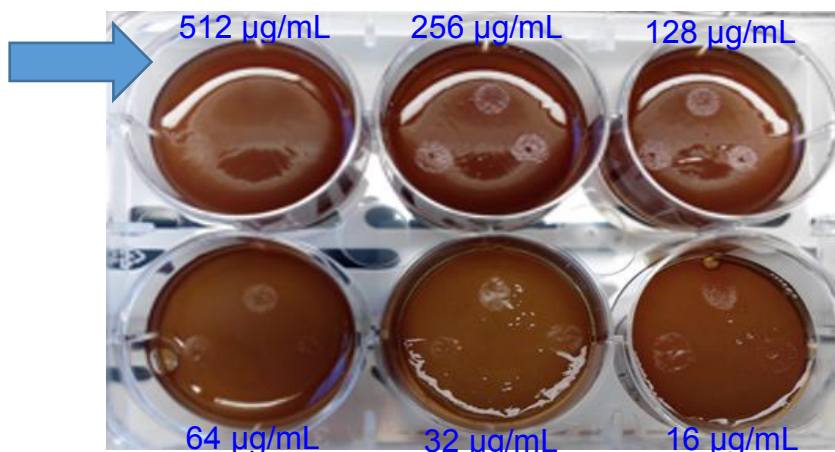


Figura 3.17. Ejemplo de la concentración mínima inhibitoria del compuesto mayoritario pinocembrina sobre la cepa de *H. pylori* ATCC 43504. La flecha indica la CMI del compuesto. Fuente: elaboración propia.

3.7 Determinación de la CMI en mezclas.

Utilizando la cepa *H. pylori* ATCC 43504 se determinó la CMI para cada uno de los compuestos mayoritarios en presencia de un segundo compuesto, en concentraciones variables entre 0 y 2 CMI. La Figura 3.18 y Figura 3.19 muestran un ejemplo del experimento, a partir del cual se calcula el FIC. Estos mismos resultados permitieron obtener los isobologramas, que representa en una escala aritmética (concentraciones µg/mL) el efecto antibacteriano que produjo la combinación de los dos compuestos. En la Figura 3.20 se muestra un efecto de sinergismo para la mezcla crisina/pinocembrina (figura 3.20 A) y un efecto de indiferencia para galangina/CAPE (figura 3.20 B).

De las 14 combinaciones ensayadas, 12 arrojaron efecto de indiferencia, una presentó efecto de antagonismo y una, efecto de sinergismo (Tabla 3.7).

Crisina ($\mu\text{g/mL}$)	512	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	256	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	128	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	64	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	32	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	16	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	8	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	C	8	16	32	64	128	256	512	+	-
	Pinocebrina ($\mu\text{g/mL}$)									

Figura 3.18 Representación de resultados de tablero de ajedrez con la mezcla de compuestos, sobre la cepa 43504. Marcado de color amarillo la combinación correspondientes al FIC de cada compuesto. -: no crecimiento, +: crecimiento.

Fuente: elaboración propia.

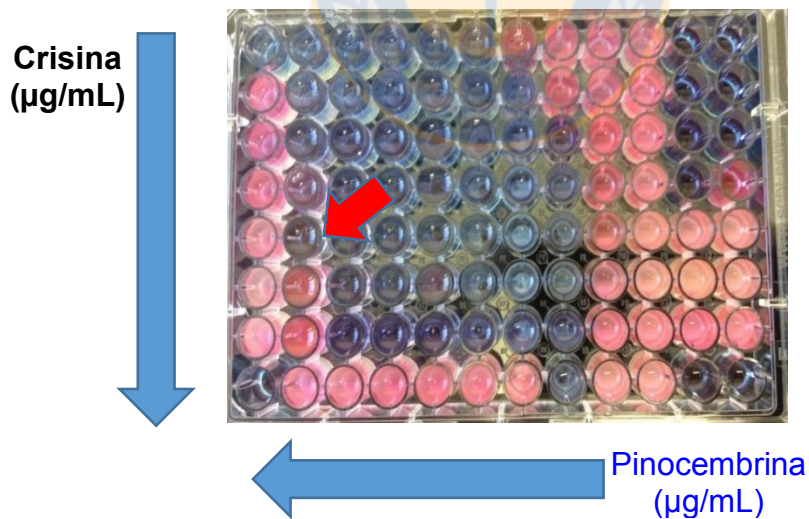


Figura 3.19 Fotografía de tablero de ajedrez para cálculo de índice FIC. La flecha roja corresponde a la combinación con menor concentración de ambos compuestos que logra inhibir el crecimiento bacteriano. Fuente: elaboración propia.

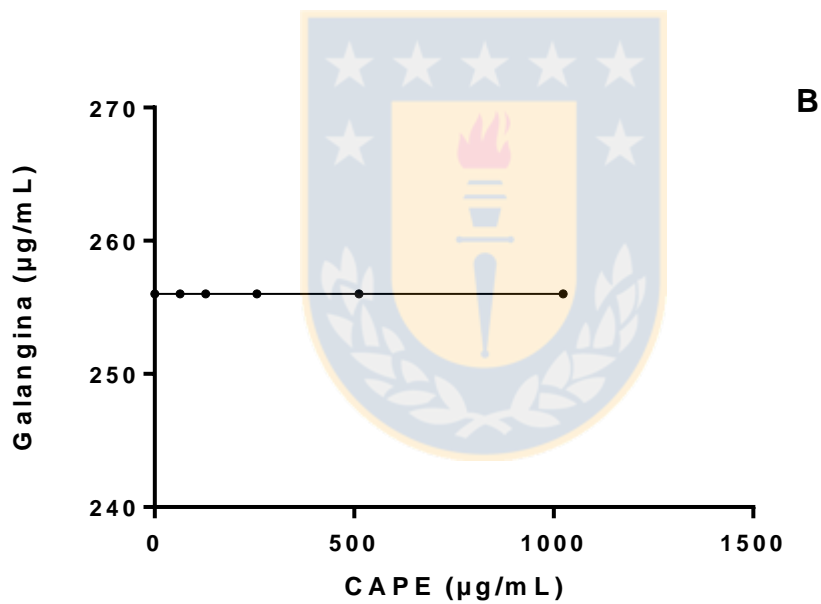
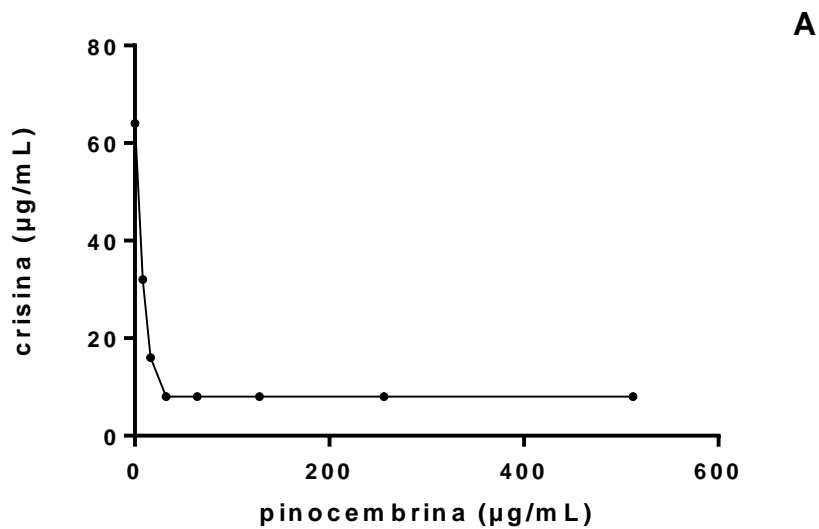


Figura 3.20 Isobologramas que representan el resultado del método de tablero de ajedrez. A: combinación de compuestos con efecto de sinergismo. B: combinación de compuestos con efecto de indiferencia. Fuente: elaboración propia.

Tabla 3.7 Efectos de la combinación de compuestos mayoritario del propóleos sobre la cepa *H. pylori* ATCC 43504.

Combinación de compuestos	Cepa de <i>H. pylori</i>	Interacción			
		Sinergia	Adición	Indiferencia	Antagonismo
Gala + Pino	43504			+	
Cry + Pino	43504	+			
CAPE +Cry	43504			+	
K + CAPE	43504			+	
Pinob+ K	43504			+	
Galan + Cry	43504			+	
Pino + CAPE	43504			+	
Pinob + CAPE	43504			+	
CAPE + Gala	43504			+	
K + Pino	43504			+	
Cry + Pinob	43504			+	
Gala + K	43504			+	
Pino + Pinob	43504				+
Pinob + Gala	43504			+	

Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Gala: galangina, Pino: pinocembrina, Cry: Crisina, CAPE: feniletil ester del ácido cafeico, K: canferol, Pinob: pinobanksin-3-o-acetato. +: Efecto en la mezcla de compuestos. Fuente: elaboración propia.

3.8 Cinética de muerte.

Utilizando la combinación de crisina/pinocembrina (mezcla sinérgica) y galangina/CAPE (mezcla con indiferencia), se analizó la cinética de muerte para la cepa 43504 (Figura 3.21). Pudo observarse que ambas mezclas presentan una velocidad de muerte, dada por el análisis de las pendientes de la curva (Figura 3.22) que permitió calcular el valor de D (tiempo de reducción decimal), el cual para la mezcla de crisina/pinocembrina ocurrió en 3.25 h, para galangina/CAPE en 4.04 h comparadas estas combinaciones con el control antibiótico amoxicilina que ocurrió en 3.15 h, lo que sugiere un efecto bactericida similar al del control antibiótico.

Se determinó que había diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento de la bacteria sin compuestos y con las combinaciones de compuestos, evaluados para el mismo tiempo (ver Figura 3.21). Los símbolos * en cada punto representan la diferencias significativas en cuanto a su crecimiento ($p \leq 0.05$) utilizando el análisis de varianzas seguido por el test de Tukey.

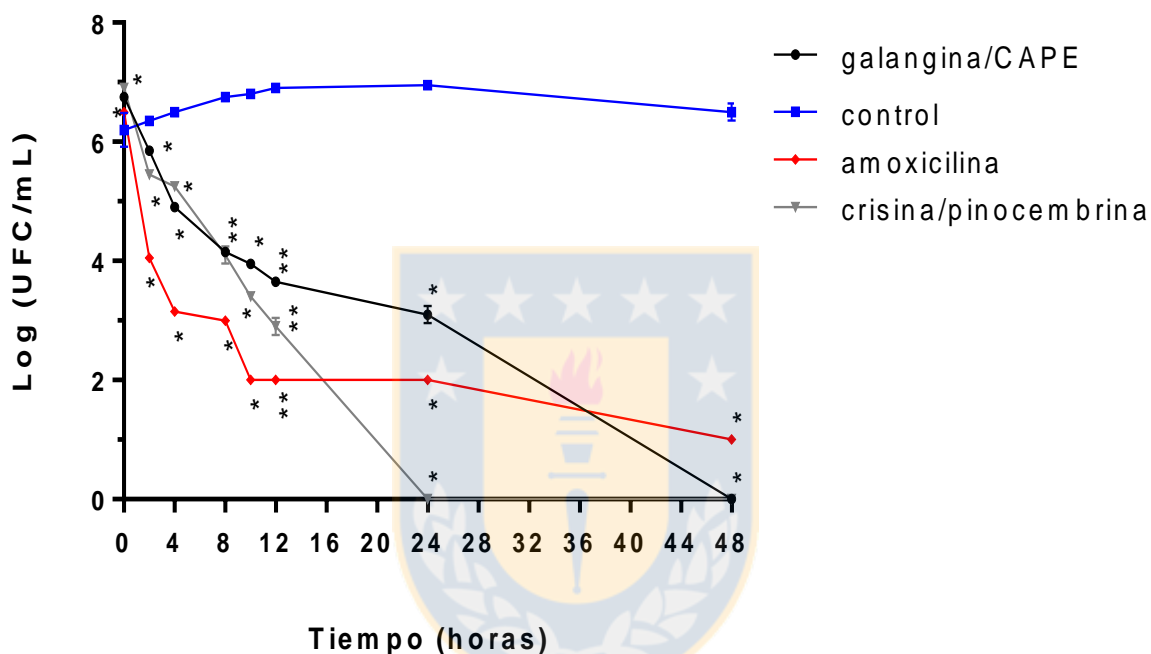


Figura 3.21 Cinética de muerte de *H. pylori* ATCC 43504. Se ensayaron las siguientes mezclas de compuestos: crisina/ pinocebrina (32/8 $\mu\text{g/mL}$) y galangina/CAPE (64/256 $\mu\text{g/mL}$). En rojo se muestra la curva de muerte para amoxicilina. Fuente: elaboración propia.

Utilizando el Criterio de Pearson (Tabla 3.8), la combinación de crisina/pinocebrina llega a tener un efecto letal sobre *H. pylori* cepa 43504 a las 10 h, la combinación galangina/CAPE presenta este efecto a las 12 h, mientras que amoxicilina lo logra a las 4 h.

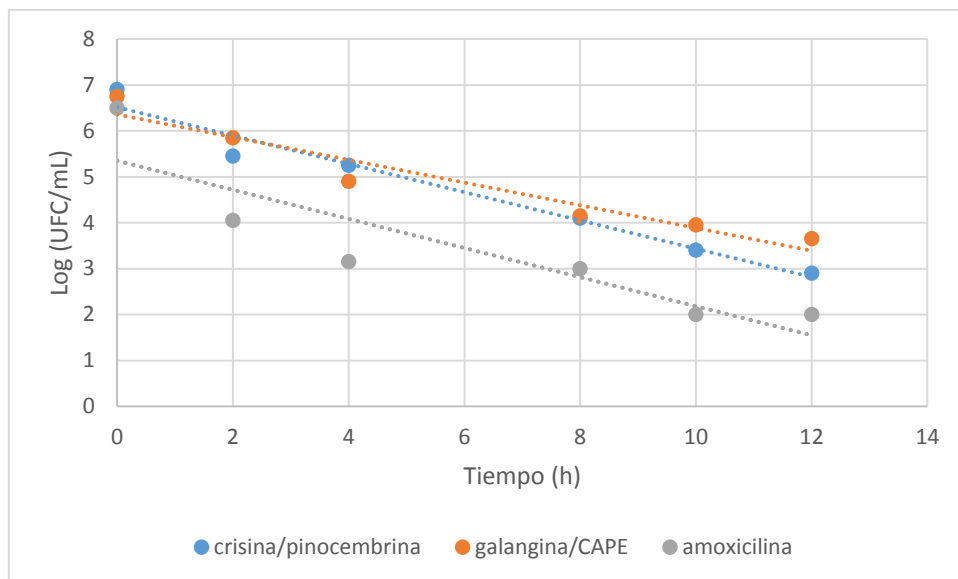


Figura 3.22 Análisis de las pendientes de la curva de muerte. Fuente: elaboración propia.

Tabla 3.8 Muerte bacteriana *H. pylori* ATCC 43504 (Criterio de Pearson)

Evaluación	Tiempo de reducción de 3 logaritmos (horas)
Crisina/Pinocembrina (sinergia)	10
Galangina/CAPE (indiferencia)	12
Control positivo	Sin efecto letal
Amoxicilina	4

Fuente: elaboración propia.

Después de determinar cuánto tardan los compuestos mayoritarios de propóleos en mezclas en actuar sobre *H. pylori* se buscó determinar si estos efectivamente estaban matando a la bacteria y si era así tratar de determinar cómo lo hacían. Para cumplir con esto se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el fin de

establecer si había algún cambio estructural en la bacteria con la interacción de los compuestos mayoritarios del propóleo.

3.9 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Con el propósito de evaluar los posibles efectos estructurales provocados por las mezclas de compuestos mayoritarios del propóleo purificados se expuso la cepa *H. pylori* 4350 a concentraciones inhibitorias de estos compuestos. La Figura 3.23 y Figura 3.24 muestran una alteración de la morfología de la bacteria, observándose daño en la membrana y lisis celular.

0 horas

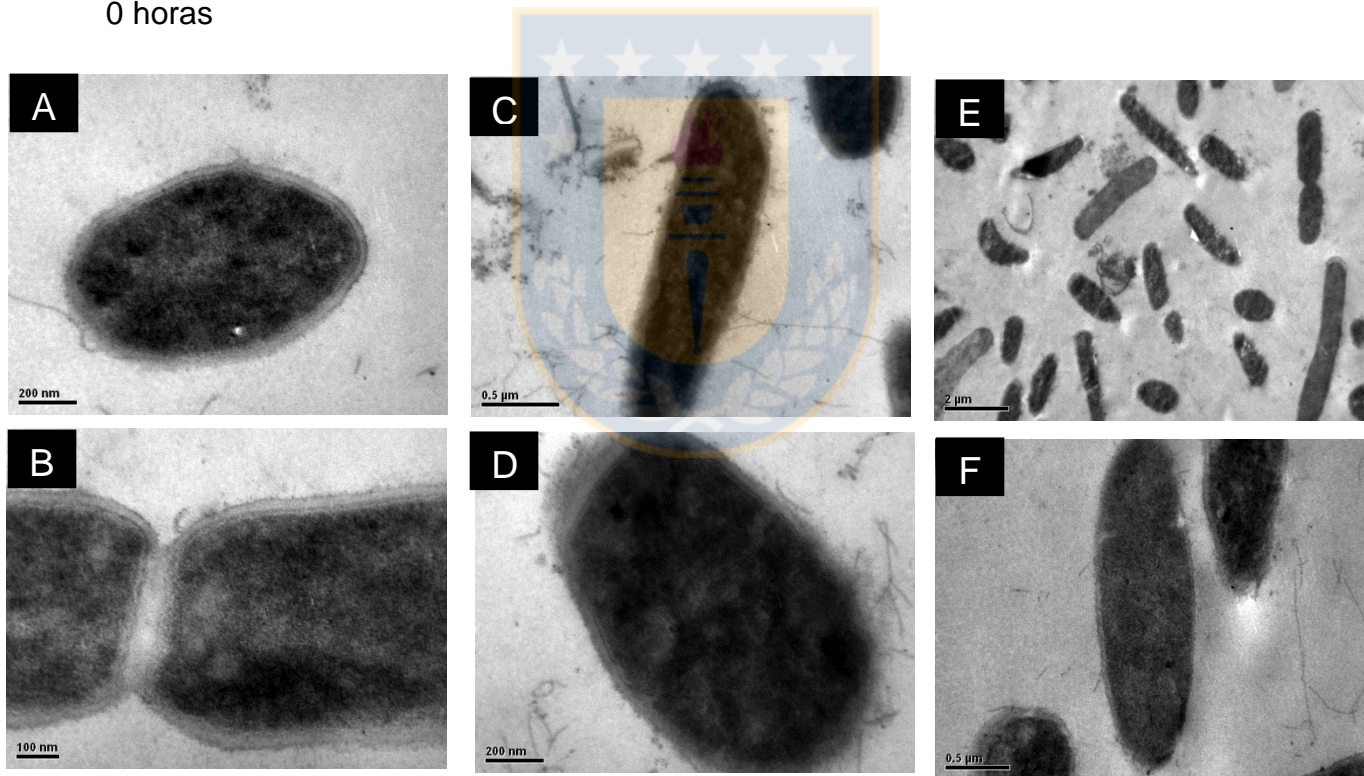


Figura 3.23 Microfotografías electrónicas de transmisión de *H. pylori* cepa ATCC 43504 con las mezclas de compuestos mayoritarios de propóleo al tiempo 0 horas. A y B: control, C y D: crisina/pinocebrina (32/8 μg/mL) efecto de sinergismo, E y F: galangina/CAPE (64/256 μg/mL) efecto de indiferencia. Fuente: elaboración propia.

12 horas

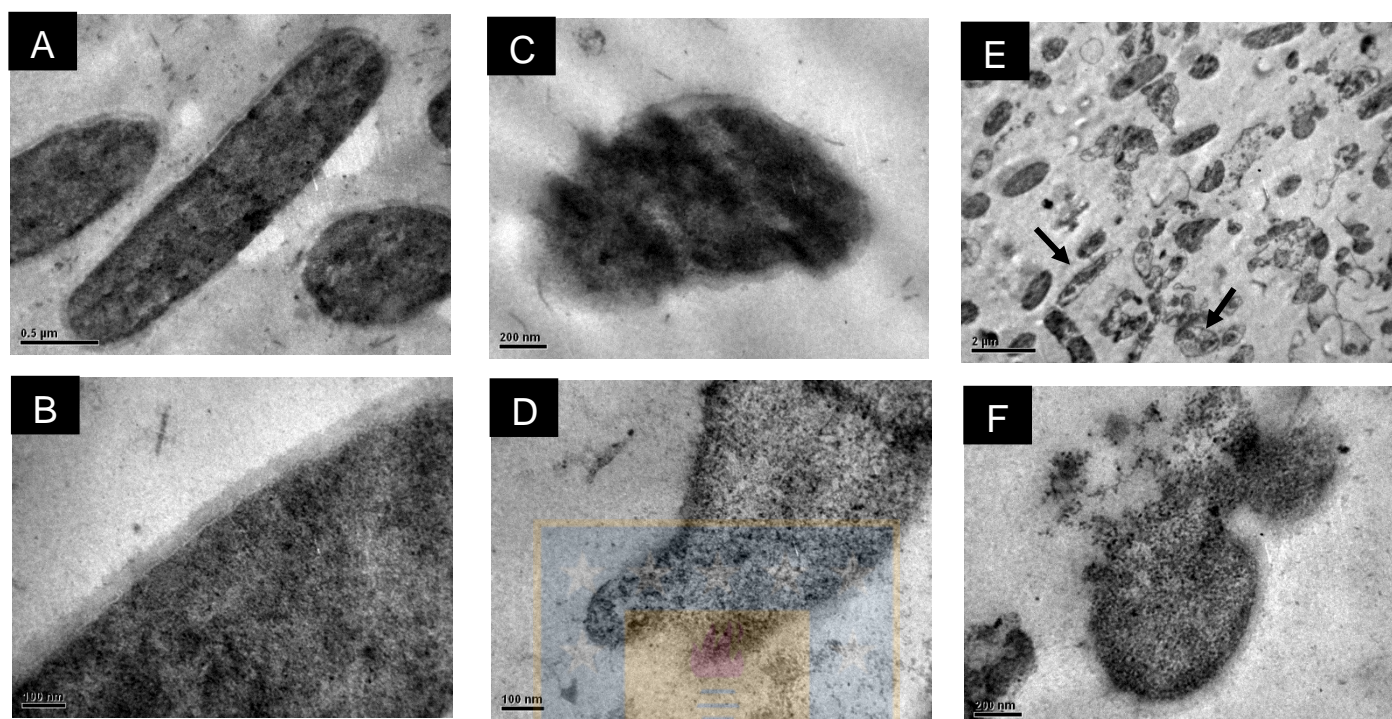


Figura 3.24 Microfotografías electrónicas de transmisión de *H. pylori* cepa ATCC 43504 con las mezclas de compuestos mayoritarios de propóleos a tiempo 12 horas. A y B: control, C y D: crisina/pinocembrina (32/8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) efecto de sinergismo, E y F: galangina/CAPE (64/256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) efecto de indiferencia. Fuente: elaboración propia.

Este efecto se visualiza después de 12 h de exposición a los compuestos (Figura 3.24 C-F). No se detectó un efecto inmediato, puesto que una vez mezclados, las células conservaron su estructura sin mostrar alteraciones visibles (Figura 3.23 A-F). Por el contrario, después de 12 h de exposición a la combinación de compuestos, se reveló que casi todas las células de *H. pylori* mostraron alteración en su morfología con zonas densas a los electrones, esto es presencia de agregados intracelulares y estructuras citoplasmáticas distorsionadas (Figura 3.24 C). También hubo evidencia de la separación y desprendimiento de la membrana interna de la membrana externa y un aumento del espacio periplásmico (flechas Figura 3.24 E), lo que sugiere que se está

produciendo lisis celular (Figura 3.25 D y F). El control de *H. pylori* 43504 sin exposición a compuestos del propóleo a las 12 h de incubación no presenta modificaciones después de 12 h de incubación (Figura 3.25 A y B).

La exposición de la cepa *H. pylori* 43504 a 32 $\mu\text{g/mL}$ de crisina (concentración sub inhibitoria) provocó alteraciones en la envoltura de la célula bacteriana, similares a las observadas con la mezcla crisina/pinocembrina, pero en este caso se observa mayor proporción de ruptura celular y la formación de vesículas de membrana así como lisis (Figura 3.25 A y B), pinocembrina 8 $\mu\text{g/mL}$ también presentó lisis (Figura 3.25 C y D).

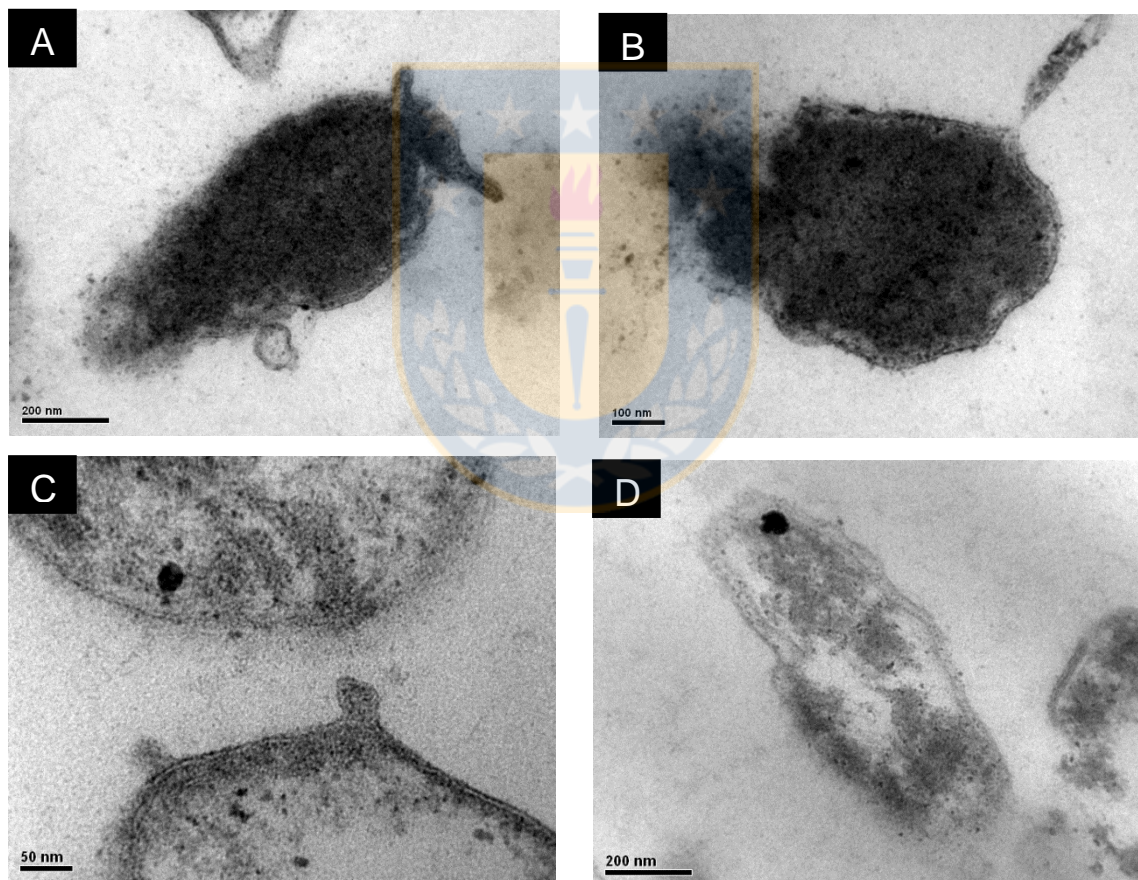


Figura 3.25 Microfotografías electrónicas de transmisión de *H. pylori* 43504 a 12 horas de incubación. A y B: crisina (32 $\mu\text{g/mL}$), C y D: pinocembrina (8 $\mu\text{g/mL}$).

Fuente: elaboración propia.

En cambio la exposición de la cepa *H. pylori* 43504 a 256 $\mu\text{g/mL}$ de CAPE provocó daños en la estructura de la bacteria, similares a los observados con la mezcla galangina/CAPE, en este caso se observa vesículas cuyo contenido es expulsado por la lisis que este provoca (Figura 3. 26 G), además de comprobar la separación de la membrana interna de la membrana externa (flechas Figura 3.26 H), galangina 64 $\mu\text{g/mL}$ también presentó lisis solo que en menor intensidad (Figura 3.26 E y F).

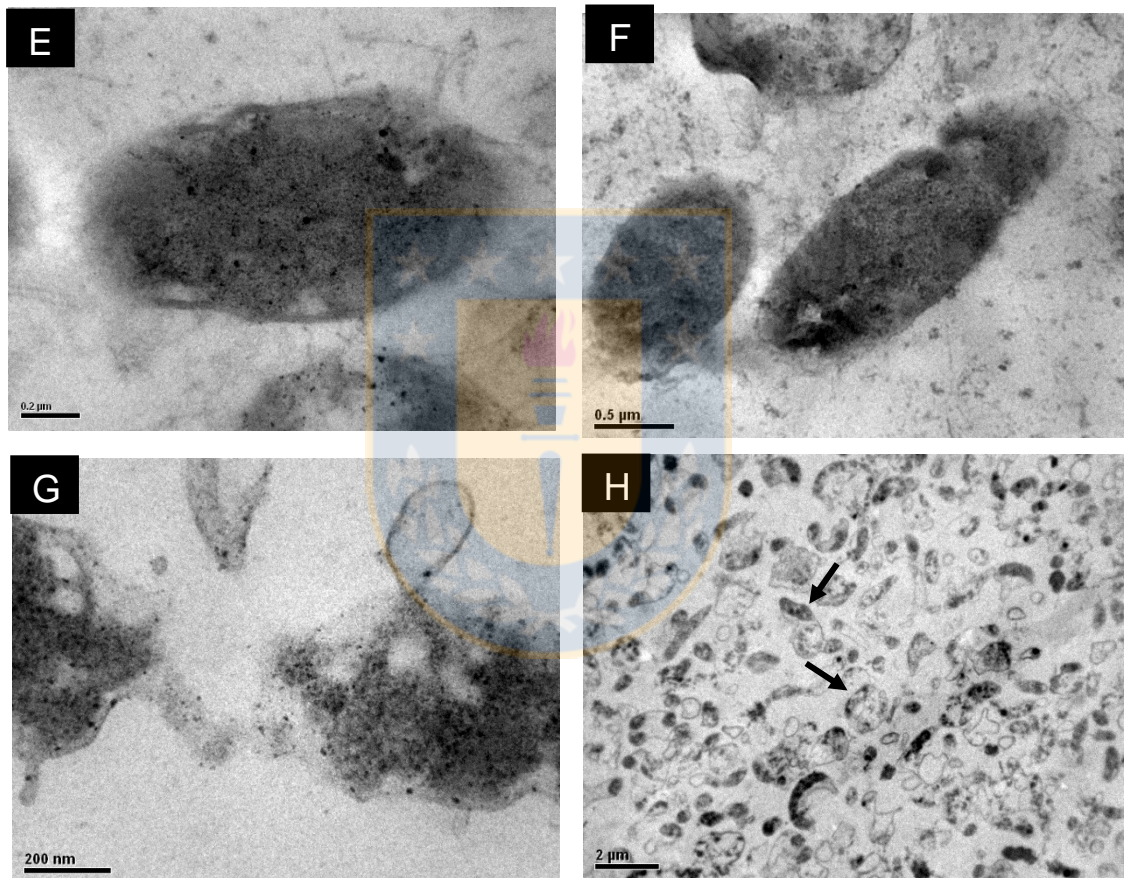


Figura 3.26 Microfotografías electrónicas de transmisión de *H. pylori* 43504 a 12 horas de incubación. E y F: galangina (64 $\mu\text{g/mL}$), G y H: CAPE (256 $\mu\text{g/mL}$).

Fuente: elaboración propia.

4. DISCUSION

Debido a su diversidad química, el propóleo es un producto natural muy complejo. Dicha complejidad, no sólo está dada por la miríada de estructuras químicas reportadas en literatura, sino que también por la complejidad residual que acompaña a los componentes mayoritarios. Todo lo anterior es una problemática que lo hace difícil de estandarizar, tal como reportó en su tesis doctoral Venegas (2016), donde se recurrió al uso de técnicas no destructivas como la espectroscopia NIR para tener una visión global de su composición.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que los compuestos mayoritarios del propóleo tienen actividad anti-*H. pylori*. Hasta la fecha solo se había demostrado el efecto inhibitorio que tiene el extracto total de propóleos de diferentes zonas de Chile sobre *H. pylori* (Villanueva *et al.*, 2015; Freire, 2015), sin embargo, en esta tesis se demostró que la actividad antibacteriana del propóleo está dada por diversos compuestos, incluidos canferol, crisina y CAPE reportado por Cui *et al.* (2013). Además, se demostró que existen efectos sinérgicos, de indiferencia y antagónicos entre algunos de los compuestos presentes de los propóleos cuando se analizan en mezclas, lo que no había sido informado. Otro aspecto reportado en este trabajo se refiere a la intensidad de la acción antibacteriana de los compuestos en mezcla que se observa similar al que presenta el antibiótico amoxicilina. Finalmente, los estudios morfológicos utilizando microscopía de transmisión permitieron establecer diversos efectos de estos compuestos sobre la estructura celular bacteriana, que incluyen lisis, formación de vesículas de membrana y alteraciones a nivel de membrana; ello, dependiente del compuesto al que se expone la bacteria.

En 1989, Alarcón reportó que una muestra de propóleos originaria de Valdivia tenía un contenido químico rico en flavonoides (crisina, galangina); desde entonces varios estudios atribuyen la actividad biológica a la presencia de polifenoles del tipo flavanonas, flavonas y flavanol (Astudillo *et al.*, 2000), así como ácidos fenólicos y sus derivados (Russo *et al.*, 2004), canferol y apigenina (Herrera *et al.*, 2010),

pinocembrina, CAPE y quercetina (Dalepranet *et al.*, 2012), y pinobansina (Cuevas *et al.*, 2014). Todos estos compuestos excepto apigenina, fueron encontrados en la muestra de propóleos de estudio en esta investigación, pero a diferencia de los resultados presentados los autores no informaron actividad sobre *H. pylori*.

Mediante HPLC-DAD e Interfase TLC-MS se caracterizó cualitativamente cuáles y cuántos compuestos estaban presentes en la muestra de propóleos en estudio. Resultados similares fueron informados por Valenzuela-Barra *et al.* (2015) y Castro *et al.* (2014), quienes observaron en seis propóleos de la zona central de Chile (región metropolitana de Santiago) la presencia de 37 polifenoles, entre los que se destacan compuestos del tipo flavonoides y ácidos fenólicos como crisina, galangina, pinocembrina, canferol, CAPE y pinobansina-3-o-acetato utilizando HPLC-UV-ESI-MS /MS. Estos mismos compuestos son los encontrados en propóleos de la región del Biobío.

Una situación que llamó la atención es que utilizando propóleos obtenidos en Italia, Pellati *et al.* (2011) lograron identificar 40 compuestos a diferencia de los 20 compuestos que se identificaron en esta tesis. Esto puede deberse a que los propóleos chilenos presentan una complejidad de composición mayor, lo que dificulta su separación y aislamiento con las técnicas utilizadas en este trabajo. Así mismo, la menor resolución de los cromatogramas observada con los propóleos chilenos también avala una mayor complejidad de las muestras.

En un estudio previo de nuestro laboratorio, Freire (2015) estableció que el extracto total de propóleos originarios de diferentes zonas geomorfológicas de la región del Biobío presentaba actividad anti-*H. pylori*, pero sólo planteó una identificación tentativa de que compuestos podrían estar siendo los causantes de dicho efecto. Tampoco se logró purificarlos, debido a que en el análisis de CPC que el planteó el sistema de solventes (n-hexano / acetato de etilo / Etanol / agua 1:8:2:7, v/v/v/v) presentó una polaridad menor que los solventes aquí empleados (hexano/acetato de etilo/metanol/agua 5:4:5:4.5 v/v/v/v) y sólo permitió agruparlos en forma global (clúster de polaridades). Los solventes seleccionados en esta tesis para realizar la CPC

permitieron realizar sustracción química de algunos compuestos. Además, la separación permitió realizar un estudio más detallado de cada compuesto desde su identificación cualitativa a través de TLC y HPLC-DAD hasta la confirmación de su masa experimental (peso molecular), mediante Interfase TLC-MS. Mediante HPLC analítica se realizó la cuantificación y en su modalidad preparativa se logró la purificación. La TLC-MS es una tecnología hifenada que posibilitó la identificación y confirmación de los compuestos mayoritarios del propóleo.

En relación a la actividad bacteriana del propóleo y sus extractos, los datos de literatura muestran resultados similares a los observados en esta tesis con propóleos obtenidos de distintas regiones geográficas (Brasil, Bulgaria, Polonia y países del Medio Oriente (Hashimoto *et al.*, 1998; Boyanova *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2011; Skiba *et al.*, 2011), así como Turquía Baltas *et al.* (2016). Este último autor utilizó la cepa de *H. pylori* J99.

Con respecto a la CMI, Wang (2014) propuso una clasificación de la actividad anti-*H. pylori* de numerosas plantas medicinales que reportan dicha actividad gracias a su contenido polifenólico. De acuerdo con esta clasificación CAPE presentó una actividad fuerte-moderada con CMI en el rango 10 a 100 µg/mL. Galangina, crisina y pinocembrina presentaron actividad débil-moderada (rango de 100 a 1000 µg/mL), canferol y pinobansina-3-o-acetato una actividad débil (mayor a 1000 µg/mL) con la cepa *H. Pylori* 43504. Igual comportamiento presentó para la cepa clínica 84 C con la única diferencia que CAPE mostró una actividad débil-moderada.

Los resultados observados con los extractos de propóleos chilenos, sugieren que estos serían más activos con respecto a los propóleos de otra zona geográfica, ya que, utilizando la misma cepa indicadora *H. pylori* ATCC 43504 Hashimoto *et al.* (1998), detectó una CMI de 62.5 µg/mL mientras que Freire (2015) encontró una CMI menor a 32 µg/mL. Así mismo, Nostro *et al.* (2005), encontraron que 12 cepas de *H. pylori*, presentaron CMI entre 0,075 y 0,3 mg/mL con un extracto etanólico de propóleos y, entre 0,6 y 2,5 mg/ml, con extracto acuoso.

En relación con la CMI en mezclas de compuestos, la combinación de crisina/pinocembrina fue sinérgica, observándose que el efecto de crisina potencia el efecto de pinocembrina e inhiben la bacteria a una concentración 1/3 CMI de pinocembrina y 1/4 CMI de crisina en la mezcla. El resto de combinaciones presentó efecto de indiferencia, interacción que se postulaba estuviese ocurriendo en los compuestos mayoritarios del propóleo. El mecanismo de acción de estos compuestos no se conoce, por lo que no es posible dar una explicación al fenómeno descrito.

Los compuestos en mezclas actuaron de manera similar al antibiótico amoxicilina, lo que sumado a los estudios por microscopía electrónica los cuales muestran lisis celular, sugiere que crisina/pinocembrina y galangina/CAPE estarían ejerciendo un efecto inhibitorio en la síntesis de peptidoglicán por evidenciarse daño en la pared celular. Se requieren mayores estudios utilizando, por ejemplo compuestos de propóleo marcados para dilucidar el o los mecanismos de acción de estos compuestos en forma individual sobre *H. pylori*.

Un resultado similar se obtuvo en un estudio realizado por nuestro laboratorio Hebel (2015) con el extracto de nalca otro producto natural, donde este extracto afectó a la bacteria por la disrupción y separación de la pared celular con la membrana citoplasmática, formación de protrusiones (Blebbs) y lisis celular. Al igual que nuestros resultados los compuestos polifenólicos son responsables de estar provocando dicho efecto en *H. pylori*.

Solo existe un trabajo Cui *et al.* (2013), que propone un posible mecanismo por el cual el compuesto CAPE y el propóleo estarían atacando a *H. pylori*, que es inhibir la enzima deformilasa de *H. pylori* el cual es esencial para el crecimiento bacteriano, es por ello que se sugiere que los resultados aquí reportados serían una alternativa para dilucidar y comprender el potencial mecanismo anti-*H. pylori* del propóleo y sus compuestos polifenólicos mayoritarios.

5. CONCLUSIONES

- Se identificaron seis compuestos polifenólicos mayoritarios que corresponden a crisina, pinocembrina, galangina, CAPE, canferol y pinobansina-3-o-acetato en propóleos de la región del Biobío.
- El principal compuesto es CAPE que se encuentra a una concentración de 8.00 %; en tanto el compuesto de menor concentración es canferol q una concentración de 1.00 %.
- Todos los extractos del propóleos (compuestos mayoritarios y minoritarios) presentan actividad antibacteriana sobre *H. pylori*. Sin embargo, CAPE demuestra mayor intensidad de acción mientras que canferol y pinobansin-3-o-acetato, menor intensidad.
- En mezclas los compuestos mayoritarios presentan alta proporción de efecto de indiferencia y en baja proporción, efecto de sinergia o antagonismo.
- Los compuestos mayoritarios del propóleos inducen alteraciones de la estructura celular bacteriana, que incluyen formación de vesículas de membrana, alteraciones a nivel de membrana y lisis celular; ello, dependiente del compuesto al que se expone la bacteria.
- Las mezclas de compuestos mayoritarios del propóleos presentan efecto de indiferencia, excepto crisina/pinocembrina (efecto sinérgico) y pinocembrina/pinobansina-3-o-actetato (efecto antagónico).
- Crisina induce producción de vesículas en la membrana de *H. pylori* a concentración subinhibitoria y en mezcla con pinocembrina, lisis celular.

Los resultados presentados como conclusión general de esta investigación se tiene que se acepta la hipótesis planteada para esta tesis: “Los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en el propóleo tienen actividad anti-*H. pylori* y, entre sí, presentan preferentemente efecto de indiferencia en su acción”.

6. PROYECCIONES

- Examinar la capacidad permeabilizante de la membrana externa de *H. pylori* por acción de los diferentes compuestos polifenólicos mayoritarios del propóleo con la ayuda de un electrodo selectivo de potasio (K⁺).
- Evaluar cada molécula por individual con el análisis de cinética de muerte para conocer el tiempo en que tarda el compuesto solo, en ejercer el efecto bactericida.
- Ensayar en modelo celular (células de adenocarcinoma gástrico u otras afines) y posterior modelo *in vivo* (gerbos de Mongolia u otro pertinente) cada uno de los compuestos mayoritarios del propóleo, para conocer cómo se comportaría en el estómago humano su acción y su eficacia.
- Si los resultados *in vitro*, línea celular y modelo *in vivo* son favorables desarrollar ensayos clínicos con una formulación de un prototipo de fitofármaco o nutracéutico que permita ser una terapia complementaria para prevenir o erradicar la infección con *H. pylori*.
- Utilizar técnicas analíticas con mayor precisión y sensibilidad, para el estudio analítico de los compuestos minoritarios del propóleo como por ejemplo HPLC-UV-ESI-MS /MS y espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR).

7. REFERENCIAS

- Alarcón R. 1989. Estudio Químico de Propóleos. Tesis de Grado Pedagogía en Biología, Química y Ciencias Naturales. Universidad Austral de Chile. Facultad de Filosofía y Humanidades.
- Ayala G, Escobedo-Hinojosa W, de la Cruz-Herrera C, Romero I. 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. **20**(6): 450-469.
- Astudillo L, Avila F, Morrison R, Gutierrez M, Bastida J, Codina C y Schmeda-Hirschmann G. 2000. Biologically active compounds from chilean propolis. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. **45**(4): 577-581.
- Baltas N, Sengul K, Cemre T y Sevgi K. 2016. Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **31**(S2): 46–50.
- Bankova V, De Castro S y Marcucci M. 2000. Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **31**: 3-15.
- Banskota H, Tezuka Y y Kadota S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. **15**(7): 561-571.
- Barrientos L, Herrera C, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N y Salazar L. 2013. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Braz J Microbiol*. **44**(2): 577–585.
- Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, Mitov I y Krastev Z. 2005. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains *in vitro* by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J Med Microbiol*. **54**(Pt 5): 481 –483.

- Breckan RK, Paulssen EJ, Asfeldt AM, Mortensen L, Straume B, Florholmen J. 2009. The impact of body mass index and *Helicobacter pylori* infection on gastro-oesophageal reflux symptoms: A population-based study in Northern Norway. *Scand. J. Gastroenterol.* **44**(9):1060–1066.
- Burdock G. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* **36**(4): 347–363.
- Camargo M. C, García A, Riquelme A, *et al.* 2014. The Problem of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Systematic Review in Latin America. *Am J Gastroenterol.* **109**(4): 485–495.
- Campos JF, dos Santos UP, Macorini LFB, *et al.* 2014. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem Toxicol.* **65**: 374–380.
- Can Z, Yildiz O, Sahin H, *et al.* 2015. An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem.* **180**:133–141.
- Cassel-Beraud AM, Le Jan J, Mouden JC, Andriantsoa M, Andriantsiferana R. 1991. Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity in vitro of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* **59**(1):9–23.
- Castro C, Mura F, Valenzuela G, Figueroa C, Salinas R, Zuñiga C, Torres J, Fuguet E, Carla Delporte. 2014. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Res Int.* **64**: 873–879.
- Castaldo, S y Capasso F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* **73**: S1-S6.
- Catchpole O, Mitchell K, Bloor S, *et al.* 2015. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia.* **106**:167–174.

Cheung KW, Sze DM, Chan WK, *et al.* 2011. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. *J Ethnopharmacol.* **138**(2): 463–471.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. 30: M45-A2. CLSI, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22- (ISBN 1 -56238-785-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.

Crowe SE. 2012. Bacteriology and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Gastroenterol Rep.* **14**: 489-496.

Cuevas A, Saavedra N, Cavalcante MF, Salazar LA, Abdalla DS. 2014. Identification of microRNAs involved in the modulation of pro-angiogenic factors in atherosclerosis by a polyphenols-rich extract from propolis, *Arch Biochem Biophys.* **557**: 28-35.

Cui K, Lu W, Zhu L, Shen X, Huang J. 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis, inhibits *Helicobacter pylori* peptide deformylase activity. *Biochem biophys res Commun.* **435**(2):289-294.

Daleprane J, Silva V, Pacheco A *et al.* 2012. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *Journal of nutritional biochemistry.* **23**: 557-566.

Drago L, Mombelli B, De Vecchi E, Fassina C, Tocalli L y Gismondo R. 2000. *In vitro* antimicrobial activity of propolis dry extract. *J Chemother.* **12**: 390–395.

Fariña N, Kasamatsu E, Samudio M, Morán M, Sanabria R y Laspina F. 2007. Susceptibilidad a antibióticos de cepas paraguayas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastro-duodenal. *Rev Méd Chile.* **135** (8): 1009-1014.

Fernández-Bolaños JG, López O, López-García MA, *et al.* 2012. Biological properties of hydroxytyrosol and its derivatives, olive oil constituents, quality, health properties and bioconversions. *ChemInform*.**44**(29): 375-396.

Ferreccio C, Rollán A, Harris PR, Serrano C, Gederlini A, Margozzini P, *et al.* 2007. Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence country. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **16**(4):662–667.

Focht J, Hansen S, Nielsen J, van den Berg A y Riezler R. 1993. Bactericidal effect of propolis *in vitro* against agents causing upper respiratory tract infections. *Arz-Forsch*.**43**: 921-923.

Freire A. 2015. Actividad profiláctica *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* de propóleos de la región del Bio Bío. Tesis Magister en Ciencias Mención Microbiología, Universidad de Concepción Facultad de Ciencias Biológicas. Dirección de postgrado.

Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. **48**(4):251-261.

González C, García A, Daroch F, Kawaguchi F, Solar H, Rivera N y Vega E. 2001. Susceptibilidad *in vitro* de cepas de *Helicobacter pylori*: aislamiento de cepas resistentes a claritromicina. *Rev Méd Chile*. **129**: 643 -646.

González CG, Serrano C, Harris PR. 2007. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños mediante la detección de antígenos en deposiciones. *Rev Méd Chile*. **135**:182–188.

Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. **48**(1): 125-129.

Hashimoto T, Aga H, Tabuchi A, Shibuya T, Chaen H, Fukuda S, *et al.* 1998. Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. *Nat Med*. **52**:518–520.

Hebel S. 2015. Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Gunnera tinctoria* (nalca). Tesis Magister en Ciencias Mención Microbiología, Universidad de Concepción Facultad de Ciencias Biológicas. Dirección de postgrado.

Hernández E, Couto Ramos J, Ferrer F, Rojas N. 2003. Resistencia a antimicrobianos y evaluación del tratamiento combinado en la septicemia neonatal. Rev Panam Salud Pública. **13**(4): 214-221.

Herrera L, Fritz O, Montenegro G, Alvear M, del Sol M. y Salazar A. 2010. El propóleo reduce la esteatosis hepática inducida por dieta en ratones. Int. J. Morphol. **28**(1):75-84.

Ibrahim A y Turab M. 2011. The effect of propolis on growth inhibition of *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patient. Kufa J Vet Med Sci. **2**: 44-58.

Jackson L. C. y Machado Reyes L. 1998. Combinaciones de antimicrobianos. Acta Médica. **8**(1):101 -104.

Jafri W, Yakoob J, Abid S, Siddiqui S, Awan S, Nizami SQ. 2010. *Helicobacter pylori* infection in children : population-based age-specific prevalence and risk factors in a developing country. Acta paediatrica. **99**(2):279–282.

Kobayashi Y. 2005. Study of the synergism between carbapenems and vancomycin or teicoplanin against MRSA, focusing on S-4661, a carbapenem newly developed in Japan. J Infect Chemother. **11**:259–261.

Kohler N y Winterhalter P. 2005. Large-scale isolation of flavan-3-ol phloroglucinol adducts by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr. **1072**: 217–222.

Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G y Czuba Z. 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. Arznei-forschung. **43**: 607–609.

Kumar N, Ahmad K., Raman Dang y Ahmed Husain. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. *J. Med. Plants Res.* **2**(12): 361-364.

Kuo CH, Kuo FC, Hu HM, Liu CJ, Wang S, Chen YH, *et al.* 2012. The optimal First Line Therapy of *Helicobacter pylori* Infection in Year 2012. *Gastroenterology Research and Practice.* **2012**: 1-8.

Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2013**:149-164.

Lee YY, Derakhshan MH. 2013. Environmental and Lifestyle Risk Factors of Gastric Cancer. *Arch Iran Med.* **16**(6): 358 – 365.

Liu Y, Chen S, McAlpine J *et al.* 2014. Quantification of a Botanical Negative Marker without an Identical Standard: Ginkgotoxin in *Ginkgo biloba*. *J. Nat. Prod.* **77** (3): 611–617.

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, *et al.* 2016. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut.* **0**:1 –25.

Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **79**:727–747.

Marchal L, Legrand J y Foucault A. 2003. Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *Chem Rec.* **3**:133–143.

Martínez JD, Henao SC, Lizarazo JI. 2014. Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Latin America and the Caribbean. *Rev Col Gastroenterol.* **29**(3):218-227.

Megraud F, Lehours. 2007. *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Clinical microbiology reviews.* **20**(2): 280-322.

Mirzoeva O, Grishanin R y Calder P. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res.* **152**: 239-246.

- Mishra S, Singh V, Rao GRK, Dixit VK, Gulati K, Nath G. 2008. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic subjects—a nested PCR based study. *Infection, Genetics and Evolution*. **8**(6):815–819.
- Moreira R, Kanashiro A, Kabeya M, Polizello C, *et al.* 2007. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. *Life Sci*. **81**(4): 317-326.
- Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. **26**: 2231-2234.
- Muhammad JS, Zaidi SF, Sugiyama T. 2012. Epidemiological Ins and Outs of *Helicobacter pylori*: a review. *J Pak Med Assoc*. **62**(9):955–959.
- Muñoz O, Ureta E, Peña R y Montenegro G. 2001. Propolis of matorral of Central Chile hives. *Z Naturforsch*. **56**: 269-272.
- Murali M, Naveen S, Son C, Balaji H. 2014. Current knowledge on alleviating *Helicobacter pylori* infections through the use of some commonly known natural products: bench to bedside. *Integr Med Res*. **3**: 111–118.
- Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R, Cannatelli MA, *et al.* 2005. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res*. **19**(3): 198–202.
- Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Cannatelli MA, Di Campli E, Procopio F, *et al.* 2006. Effects of combining extracts (from propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytother Res*. **20**(3):187–190.
- Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. 2005. Synergy tests by E-Test and checkerboard method of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol*. **43**(1): 140-143.

Oth L, Wilson M, Fernández H, Oth C, Toledo C, Cárcamo V, Rivera P y Ruiz L. 2011. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and susceptibility to five antimicrobial drugs in southern Chile. *Braz J Microbiol.* **42**: 442- 447.

Pastene E, Speisky H, Troncoso M, Alarcon J y Figueroa G. 2009. *In Vitro* Inhibitory Effect of Apple Peel Extract on the Growth of *Helicobacter pylori* and Respiratory Burst Induced on Human Neutrophils. *J Agric Food Chem.* **57**: 7743-7749.

Park Y, Koo M, Abreu J, Ikegaki M, Cury J y Rosalen P. 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol.* **36**: 24-28.

Parreira P, Duarte M, Reis C y Martins M. 2014. *Helicobacter pylori* infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. *Crit Rev Microbiol.* **42** (1): 1–12.

Pearson R, Steigbigel R.T, Davis H.T, Chapman S.W. 1980. Method for reliable determination of minimal lethal concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**(5):2065-2072.

Pellati F, Orlandini G, Pinetti D, Benvenuti S. 2011. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *J Pharm Biomed. Anal.* **55**: 934–948.

Pereira A, Seixas S, Silva M y Aquino F. 2002. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova.* **25**: 321-326.

Pillai K, Moellering Jr C, Eliopoulos G. Antimicrobial Combinations. 2005. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine 5th Edition*. V. Lorian (ed). Williams & Wilkins. Philadelphia, PA USA. 365-440.

Ramos R, Friesen J, Pauli G *et al.* 2014. K- Targeted Metabolomic Analysis Extends Chemical Subtraction to DESIGNER Extracts: Selective Depletion of Extracts of Hops (*Humulus lupulus*). *J. Nat. Prod.* **77**: 2595 –2604.

Rand Kenneth H., Houck Herbert J., Brown Prince y Bennett Diane. 1993. Reproducibility of the Microdilution Checkerboard Method for Antibiotic Synergy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **37**: 613-615.

Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A y Garbarino A. 2004 Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*. **76**: 545- 558.

Sachs G y Scott D. 2012. *Helicobacter pylori*: Eradication or Preservation. *F1000 Med Rep*. **4**:1-5.

Salatino A, Weinstein É, Negri G y Message D. 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Complement Alternat Med*. **2**: 33–38.

Santos F, Bastos E, Maia A, Uzeda M, Carvalho M, Farias M y Moreira E. 2003. Brazilian Propolis: Physicochemical Properties, Plant Origin and Antibacterial Activity on Periodontopathogens. *Phytother Res*. **17**: 285–289.

Santos IS, Boccio J, Davidsson L, Hernandez-Triana M, Huanca-Sardinas E, Janjetic M, *et al*. 2009. *Helicobacter pylori* is not associated with anaemia in Latin America: results from Argentina, Brazil, Bolivia, Cuba, Mexico and Venezuela. *Public Health Nutrition*. **12**(10):1862–1870.

Shields K, Kwak J, Potoski A, Doi Y, Adams-Haduch M, *et al*. 2011. High mortality rates among solid organ transplant recipients infected with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: using in vitro antibiotic combination testing to identify the combination of a carbapenem and colistin as an effective treatment regimen. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **70**(2): 246–252.

Shin J-E, Kim J-M, Bae E-A, Hyun Y-J, Kim D-H. 2005. *In vitro* inhibitory effect of the flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med*. **71**(3): 197-201.

Skiba M., Szliszka E., Kunicka M. y Król W. 2011. Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on interleukin 8 release by human gastric adenocarcinoma cells (AGS) infected with *Helicobacter pylori*. Cent Eur J Immunol .**36**: 65-69.

Steinberg D, Kaine G y Gedalia I. 1996. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. Am J Dent. **9**: 236-239.

Stepanovic S, Antic N, Dakic I y Svabic M. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiol Res. **158**: 353–357.

Suzuki RB, Almeida CM, Speranca MA. 2012. Absence of *Helicobacter pylori* high tetracycline resistant 16S rDNA AGA929-928TT genotype in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients in the interior of city Sao Paulo, Brazil. BMC Gastroenterology.**12**: 49-54.

Sýkora J, Siala K, Varvarovská J, Pazdiora P, Pomahacová R, Huml M. 2009. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children: a prospective population-based study from the Czech Republic. Application of a monoclonal-based antigen-in-stool enzyme immunoassay. Helicobacter. **14**(4):286–297.

Takaisi N y Schilcher H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta Med. **60**: 222-227.

Tacconelli E y Magrini N. 2017. Global Priority list of Antibiotic- Resistant Bacteria. WHO.

Tang T, Guo W, Xu Y, Zhang S, Xu X, Wang D, Zhao Z, Zhu L, y Yang D. 2014. Thin-layer Chromatographic Identification of Chinese Propolis Using Chemometric Fingerprinting. Phytochem Analysis.**25**:266–272.

Tanaka M, Isogai E, Isogai H, Hayashi J, *et al.* 2002. Synergistic effect of quinolone antibacterial agents and proton pump inhibitors on *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother. **49**: 1039–1040.

Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, *et al.* 2016. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther.* **43**:514–533.

Trespalacios A, Otero W y Mercado M. 2010. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol.* **25**: 31-38.

Ustün O, Ozcelik B, Akyon Y, Abbasoglu U, Yesilada E. 2006. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J Ethnopharmacol.* **108**(3): 457-461.

Uzel A, Kadri'ye Sorkun , O'zant O'nc-ag' , Dils-ah C-og'ulu , O'mu'r Genc-ay , Beki'r Sali'h. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research.* **160**: 189—195.

Valenzuela-Barra G, Castro C, Figueroa C, Barriga A *et al.* 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *J Ethnopharmacol* **168**: 37–44.

Valgas C, Souza S, Smania E y Smania A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol.* **38**:369-380.

Vallejos C, Garrido L, Cáceres D, Madrid A, Defilippi C, Defilippi C y Toledo H. 2007. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana. *Rev Méd Chile.* **135**: 287-293.

Venegas Y. 2016. Desarrollo de modelos quimiométricos para determinar la correlación entre bio-actividad y características químicas y espectroscópicas de propóleos provenientes de distintas zonas apícolas del sur de Chile. Tesis Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica. Universidad de Concepción. Facultad de Farmacia.

Villanueva M, González M, Fernández H, Myra W, Manquían N, Otthy C, Otth L. 2015. Actividad antibacteriana *in vitro* de propóleos chilenos sobre *Helicobacter pylori*. Rev Chilena Infectol. **32** (5): 536-539.

Vogelman B, Craig WA. 1986. Kinetics of antimicrobial activity. J Pediatr. **108**:835-40.

Wang Y. 2014. "Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases." World J Gastroenterol. **20** (30): 10368–82.

Wenming W, Yunsheng Y y Gang S. 2012. Recent Insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Eradication. Gastroenterol Res Pract. **2012**:1-8.

Yoshiyama H y Nakazawa T. 2000. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. Microb Infect. **2**: 55-60.

Zhang L, Liu W, Hu T, Du L, Luo C, Chen K, Shen X, Jiang H. 2008. Structural basis for catalytic and inhibitory mechanisms of beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ). J Biol Chem. **283**:5370-5379.

