



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LOS
COMPUESTOS MAYORITARIOS DE UNA
MUESTRA DE GEOPROPÓLEO
PRODUCIDO POR *MELIPONA BEECHEII*
EN COATEPEC, VERACRUZ**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGICO

PRESENTA

ALAN GERARDO HERNÁNDEZ MELGAR



México D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

VOCAL: M. EN C. JOSÉ MANUEL MÉNDEZ STIVALET

SECRETARIO: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

1er. SUPLENTE: DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

2° SUPLENTE: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, EDIFICIO E
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SUSTENTANTE (S):

ALAN GERARDO HERNÁNDEZ MELGAR

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

Al Laboratorio 111 del Edificio E.

A mis sinodales, la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y el M. en C. José Manuel Méndez Stivalet, por su disposición para la revisión de esta tesis.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz por su paciencia y apoyo.

A mi amigo y gran apoyo pese a todo, el Químico David Martínez Velázquez.

Agradecimientos (cont.):

Y es que al final del día solo nos queda agradecer a nuestra gente, a nuestra familia, a toda la gente que está ahí al lado para lo bueno y sobre todo lo malo...

Solo es el tiempo lo que vale, a todos los que tuvieron las llaves, abriendo puertas del sueño que perseguimos, siempre agradecido...

De corazón, gracias por todo Facultad, he sido valiente en la aventura que empecé, valió la pena decidir esto, perderse cosas, todas las broncas con mamá en la casa, mírala orgullosa ahora... Esto no hay quién lo mejore, esto no es una moda, 10 años ahí fuera en la escuela que devora, subidas y bajadas, planes que se tuercen, noches brillantes dando exposiciones todavía imberbe. Muchas gracias a la gente que vale (Ais, Anava, Deivid, Vicky y Amaro) os lo agradezco por aquí y no por redes sociales, me parto el corazón para hacer algo digno para ustedes, ¿Esfuerzo dicen? ¿Qué significa esfuerzo sin ustedes? Sufrí la fatiga, enfermo de los nervios, perdiendo la cordura por tantos trabajos.. Gracias a todos los compañeros que han sido serios al lado mío dando la cara sin buscar un premio, gracias a todos los amigos que vinieron cuando había poca gente en salas y menos dinero, a todos los que están cuando el ánimo está a cero, cuando las malas noticias son lo primero. Gracias de verdad a toda mi gente que me nutría de conocimiento cuando cumplía mis 20, ahora comprendo el juego, salto al ruedo contento y disfruto de este momento, tú contempla mi vuelo...

Cynthia gracias por enseñarme tanto y ayudarme en los momentos malos, siempre sabes qué decir cuando todo sabe amargo, ni el tiempo ni la distancia nunca podrán separarnos, aunque la vida se acabe, tú estarás siempre en mi corazón... Gracias a los que me insultan, me hacen superarme día a día, esto es una aventura.

Mucha duda, mucha pu** inculta insulta mi vida, ellos no saben cuánto amor y cuánto tiempo de dedicación pura. Pasión desbocada, gracias a la fe sigo en pie, gracias infinitas a JL amigo fiel, me estoy bebiendo un botellín en un volcán, mi vida es esto, gracias por existir y ser. La fuente de alegría que nunca me cansa, gracias a papá y mamá por la crianza, y la confianza, la gente como yo nunca busca una excusa, nos la jugamos como Simoncelli en esa curva. Estuve tan dentro del pozo del lamento que la alegría a la sonrisa le ponía un precio, pero muchas gracias a los compas de este gremio por matar al miedo y no tomarlo todo tan enserio. Gracias al amor, gracias a mi dios, gracias a ellos hoy no tenemos comparación, por eso somos lo que somos sin miedo ni compasión. Gracias a la lucha, muchas gracias...

Yo llegué hasta aquí por los que tengo detrás. Tanto que perder y mucho por ganar, nadie en este mundo me lo puede arrebatarse. Y hoy puedo decir, que sin toda esa gente no valdría para nada, miles de caminos y uno solo por andar...

Dedicatorias

Este trabajo a pesar de la sencillez es la culminación de uno de los objetivos fijados por mis padres para mí, es por eso que les quiero agradecer, a mi madre Mercedes Ivette Melgar Uresty por soportarme y su incondicional apoyo y a mi padre Juan Gerardo Hernández Parra por su tolerancia y la crianza.

A mis abuelas María Eugenia Parra y Mercedes Uresty Daniel por estar ahí conmigo consintiéndome y apoyando pese a las negativas de mis padres.

A mi tío Iván Hernández Parra por reivindicarme y por ser la prueba de que los impedimentos físicos no deben representar nunca la falta de éxito.

A los buenos amigos que me dio la facultad; Aislím Aracil Regalado, David Martínez Velázquez, Ana Martínez Laguna, Christian Parache Facio, Javier Rueda Luna, Victoria Jiménez Guevara y Leonardo Pérez Aguilar.

A Cynthia Hernández Garduño por ser pareja y amiga, por su paciencia y sobre todo su apoyo absoluto.

A José Luis Amaro Vargas por ser siempre mi hermano.

Finalmente un gran agradecimiento a todas las personas que estuvieron ahí conmigo a pesar de que muy probablemente ya no tengamos contacto, son demasiadas para nombrarlas pero entre estas se incluyen especialmente a Hugo Castillo, Brenda Sánchez y Claudia Torres.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE CUADROS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Las abejas en el mundo	3
2.2 México y las abejas	3
2.3 Generalidades	6
2.4 <i>Melipona beecheii</i>	8
2.5 Distribución	9
2.6 Propóleo	10
2.6.1 Geopropóleo.....	11
2.6.2 Composición química.....	12
2.6.3 Propiedades farmacológicas.....	16
2.6.3.1 Actividad antimicrobiana.....	16
2.6.3.2 Actividad antiinflamatoria.....	17
2.6.3.3 Actividad antioxidante.....	17
2.6.3.4 Actividad citotóxica.....	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	20
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
5.1 Procedimientos generales de análisis	21
5.1.1 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas.....	21
5.2 Geopropóleo y proceso de extracción	21
5.2.1 Fraccionamiento primario de la fracción soluble.....	22
5.2.2 Fraccionamiento secundario a partir de Fn-A.....	23
5.2.3 Fraccionamiento terciario a partir de FIV.....	24
5.2.4 Purificación de la β -amirenona a partir de la fracción FIVa.....	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1 Caracterización de la β-amirenona (C-1)	27
7. CONCLUSIONES	32
8. PERSPECTIVAS	33
9. REFERENCIAS	34

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
MHz	Megahercio
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
ppm	Partes por millón
EtOH	Etanol
AcOEt	Acetato de Etilo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
TMS	Tetrametilsilano

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Compuestos identificados en el geopropóleo de distintos orígenes.

Cuadro 2 Fraccionamiento primario del extracto metanólico del geopropóleo por CCA.

Cuadro 3 Fraccionamiento secundario por CCA a partir de Fn-A.

Cuadro 4 Fraccionamiento terciario por CCA a partir de FIV.

Cuadro 5 Constantes espectrométricas de ^{13}C para β -amirenona (Queiroz *et al.*, 2010).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustración de un fragmento del Códice Tro-Cortesiano (www.ucm.es/BUCM/blogs/otraslecturas/584. Museo de América).

Figura 2 Efigie incensario hallada en Cozumel con la forma del dios maya Ah Mucen Cab, con una cría de *M. beecheii*, en el museo arqueológico de Yucatán, Mérida, México (Tomado de Vit *et al.* 2013).

Figura 3 Cuadro taxonómico de la tribu Meliponini. (Tomado y modificado del NCBI).

Figura 4 Fotografía frontal a una *Melipona beecheii* (Xuna'an Kab; Kolel Kab).

Figura 5 Regiones de distribución de los meliponinos de México. (Tomado de Quezada *et al.* 2005)

Figura 6 Muestra de Geopropóleo.

Figura 7 Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃)

Figura 8 Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃)

Figura 9 Estructura química de la β-amirenona.

RESUMEN

La primera parte de la experimentación consistió en realizar un protocolo de trabajo. Una vez logrado este objetivo se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva a fin de conocer ampliamente los avances más recientes en la investigación referente a geopropóleos a nivel mundial.

Posteriormente, ya con la información recabada y teniendo una muestra de geopropóleo producida por las abejas del género *Melipona* recolectada manualmente en el mes de julio del 2011 en Coatepec, Veracruz, México, se procedió a dejarla macerar para obtener la fracción soluble en metanol del geopropóleo, con esta y mediante el empleo de sucesivas técnicas cromatográficas se logró la purificación del triterpeno β -amirenona como compuesto que se encuentra de manera mayoritaria en el extracto metanólico del geopropóleo.



1. INTRODUCCIÓN

Desde hace cerca de 100 mil años, con el desarrollo de las sociedades humanas, el hombre se ha dado la tarea de subsistir y hacer frente a las enfermedades, para lograr esto, se ha sustentado en el uso y consumo de los recursos naturales, que en forma diferencial en espacio y tiempo cada civilización encuentra, pudiendo así persistir en su entorno. El caso de la miel y derivados no es la excepción. Dentro de este contexto es importante señalar que la apicultura ha sido una actividad íntimamente relacionada con el surgimiento de la civilización, evidencias arqueológicas fechadas en el periodo Mesolítico, señalan que la miel bien pudo utilizarse como alimento desde ese periodo, y no solo se enfocan a su papel alimenticio, sino también al uso religioso en forma de ofrenda, en el embalsamiento de cadáveres o en aplicaciones medicas para la prevención de enfermedades y como antiséptico (Ortega y Ochoa, 2004).

Son muchos los productos que se pueden obtener de la apicultura además de la miel, que aunque es el principal, no por ello los otros son menos importantes, los propóleos junto con la jalea real y la cera, son algunos de los tantos productos obtenidos por esta actividad. El propóleo consiste en una mezcla compleja que producen las abejas a partir de exudados resinosos de hojas, ramas y cortezas presentes en las cercanías de la colmena, en dicho sitio desempeña una función como sellador de los huecos que pueden llegar a presentarse, permite embalsamar a los miembros muertos evitando su descomposición y la propagación de patógenos (Falcão *et al.*, 2013).

Asimismo presentan un amplia diversidad al igual que una variada actividad farmacológica, esto debido a oscilaciones en la composición química, relacionada con la fuente botánica, el origen geográfico, época de colecta y las subespecies de abejas. No obstante, la mayoría de los estudios publicados sobre propóleos pertenecen a una especie en particular, abeja europea (como comúnmente se le



conoce) o *Apis mellifera*; en América no se conoció este tipo de abeja sino hasta mediados del siglo XVIII y con su introducción al continente se dejó de lado a otros miembros de la familia.

La región Mesoamericana, desde sus orígenes ha contado invariablemente con una enorme riqueza en recursos naturales, lo que ofrece una vocación apícola por excelencia. Incluso antes de la llegada de los españoles al nuevo mundo ya diversas civilizaciones tenían entre una de sus actividades, la producción de miel, a través del cuidado y mantenimiento de la abeja endémica de la región, una abeja sin aguijón.

En México existen cerca de 46 especies de abejas sin aguijón, especies endémicas como la *Melipona beecheii*, la *Trigonisca maya* y la *Melipona yucatanica*. Estas producen una variante de propóleo conocido como geopropóleo.

El geopropóleo es un producto compuesto por una mezcla de resina, cera y suelo, el cual tiene la particularidad de que se le adiciona la secreción mandibular de las abejas; posee características fisicoquímicas muy distintivas, y es colectado por las abejas sin aguijón de diversas especies (Nates-Parra, 2001; Barth, 2006).

Estudios químicos previos demostraron la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica de los geopropóleos. La presencia de diversos polifenoles y flavonoides está íntimamente relacionada con su actividad antimicrobiana (Marucci, 1995). A pesar de su uso muy popular en la medicina tradicional yucateca y veracruzana, se sabe muy poco acerca de su composición química y actividad biológica, es debido a esto, que este proyecto de investigación tiene como objetivo general, aislar y caracterizar los compuestos químicos presentes en una muestra de geopropóleo.



2. ANTECEDENTES

2.1 Las abejas en el mundo

Probablemente uno de las mayores actividades de las abejas y otros insectos polinizadores, en términos de beneficios para los humanos, es que son necesarios sumamente necesarios para asegurar el éxito de la reproducción de la mayoría de las especies de plantas, incluidos muchos cultivos agrícolas (Tepedino, 1979).

2.2 México y las abejas

El estudio de la fauna de abejas en México constato que existen alrededor de 1,800 especies, la mayoría en los ambientes xéricos de los estados del norte como Chihuahua (396 especies), Sonora (359 especies) y la península de Baja California (445 especies) (Ayala *et al.*, 1996).

México es por tradición un buen productor de miel y se ubica entre los principales países exportadores y productores de miel a escala mundial, ocupando en el 2011 el 6° lugar como productor y 3° como exportador, debido a que cuenta con una amplia diversidad de flora (INAES, 2012).

Desde la etapa prehispánica México se inicia en la producción de la miel y otros insumos derivados a partir de la colmena, en ese tiempo, nuestros ancestros lograron cultivar diversas variedades de los géneros *Trigona* y *Melipona* (más pequeña y sin aguijón), de estas la que destaco fue la especie *Melipona beecheii bennett* que aún se utiliza en Yucatán y a la que los mayas denominaban como “*Xuna àn-kab*”, “*Kolel Kab*” ó “*Po`ol-Kab*” en su lengua (García *et al.*, 2012).



Uno de los escasos rastros palpables de la historia de las abejas y la miel en México es el Códice Tro-Cortesiano, mas ampliamente conocido como Códice de Madrid, es uno de los cuatro manuscritos mayas que se conocen en la actualidad y nos ha permitido conocer la importancia de las abejas en la sociedad Maya, pertenece al Museo de América de Madrid y fue llevado a España en dos partes, una por Hernán Cortes y otra por Juan de Tro (García, 2000). Este códice tiene una sección, de alrededor de 10 páginas, dedicada a la apicultura maya: abejas, miel y deidades relacionadas con ellas (Medina, 2010). Se cuentan cerca de medio centenar de imágenes de abejas, y hoy gracias el, sabemos que las abejas recibían trato de ídolo debido a que los mayas avistaban en ellas las virtudes cardinales de la vida social como: la paz, el orden y la justicia.



Figura 1 Ilustración de un fragmento del Códice Tro-Cortesiano
([www.ucm.es/BUCM/blogs/otraslecturas/584.Museo de América](http://www.ucm.es/BUCM/blogs/otraslecturas/584.Museo%20de%20Am%C3%A9rica)).

Debido a que los mayas gozaban de una basta y compleja variedad de dioses mayas, podemos destacar a una divinidad destinada a las abejas, *Ah Mucen Cab*, cuyo nombre significa: El Gran Guardián de la Miel o El Gran Señor de las Abejas; éste posee la facultad de adquirir diferentes formas por esta razón todas las colmenas eran orientadas hacia el *Bacab* del Este, ya que en ocasiones se caracteriza como *Yum Kaax*, *Bacab* del Este (Dios de la vegetación silvestre y guardián de sus animales) (Rivera y Cappas, 2000).



Figura 2 Efigie incensario hallada en Cozumel con la forma del dios maya Ah Mucen Cab, con una cría de *M. beecheii*, en el museo arqueológico de Yucatán, Mérida, México (Tomado de Vit et al. 2013).

La miel y sus derivados eran tan apreciados en la cultura maya que se usaban como moneda en el comercio, ya sea para el intercambio o trueque por otros productos.

Colón fue de los primeros cronistas sobre “la miel y sus derivados” posteriormente fueron muchos los que también señalaron la importancia de cría de abejas para la población. La península de Yucatán fue la cuna para el desarrollo de la meliponicultura, posteriormente esta práctica se extendió a lo que hoy conocemos como los estados de Tabasco, Campeche y Veracruz.

A finales del siglo XIX se lleva a cabo, primeramente la introducción de la abeja europea “*Apis mellifera*” en Yucatán por parte de los Estados Unidos, por lo que a esta se le conoce en la península como la “abeja americana”; y posterior a 1891 la abeja italiana “*Apis ligustica*” fue introducida a México, esto generó el



desplazamiento de la Melipona y con ello, comenzó a transformarse la actividad, sobre todo en la región central del país. De hecho, la apicultura moderna se basa casi en su totalidad en el cultivo de abeja europea, especialmente de la razas anteriormente mencionadas “*Apis mellifera*” y “*Apis ligustica*”.

2.3 Generalidades

En el mundo existen cerca de 20, 000 especies de abejas, tan solo en México se tiene un registro de 46 especies conocidas y a pesar de que todas estas especies varían tanto en tamaño, forma y estilo de vida, tienen como distintivo común su dependencia de las flores para abastecerse de néctar y de proteínas, que utilizan como fuente de energía y proteínas.

Los meliponinos, conocidos por la ausencia de un aguijón, a diferencia de la mayoría de las especies que se conocen, viven en colonias permanentes con una reina y miles de obreras. Y, junto con las abejas melíferas (*Apis mellifera*), son las únicas que poseen un comportamiento altamente social (eusocialidad).

La característica transcendental de los meliponinos es la carencia de un aguijón funcional, pero tienen otros métodos efectivos para defenderse de sus enemigos (Velthuis, 1997).

El tamaño de los meliponinos es variable, va desde los 2 mm de largo del cuerpo en el género *Trigona* y pueden alcanzar hasta los 2 cm en el género *Melipona*, estas últimas corporalmente presentan una gran pilosidad y son más robustas en comparación con las Trigonas.

La nidificación se da casi en cualquier cavidad aprovechable, abarcando desde orificios en troncos de árboles, incluyendo nidos abandonados de escarabajos o nidos vivos de termitas (Michener, 1990) y hormigas (Parra, 1990). La entrada a la colmena generalmente es un tubo de cera recto (como en *Scaptotrigona*, *Nannotrigona* o *Tetragonisca*) o en forma de trompeta (*Tetragona*, y algunas



especies de *Melipona*), o un orificio por donde solo cabe una abeja (algunas especies de *Melipona*) (Nates-Parra, 1996).

La jerarquía taxonómica de la tribu *Meliponini* las coloca como miembros de la subfamilia *Apinae* y a su vez esta tribu engloba a las especies de abejas conocidas como “abejas sin aguijón”.

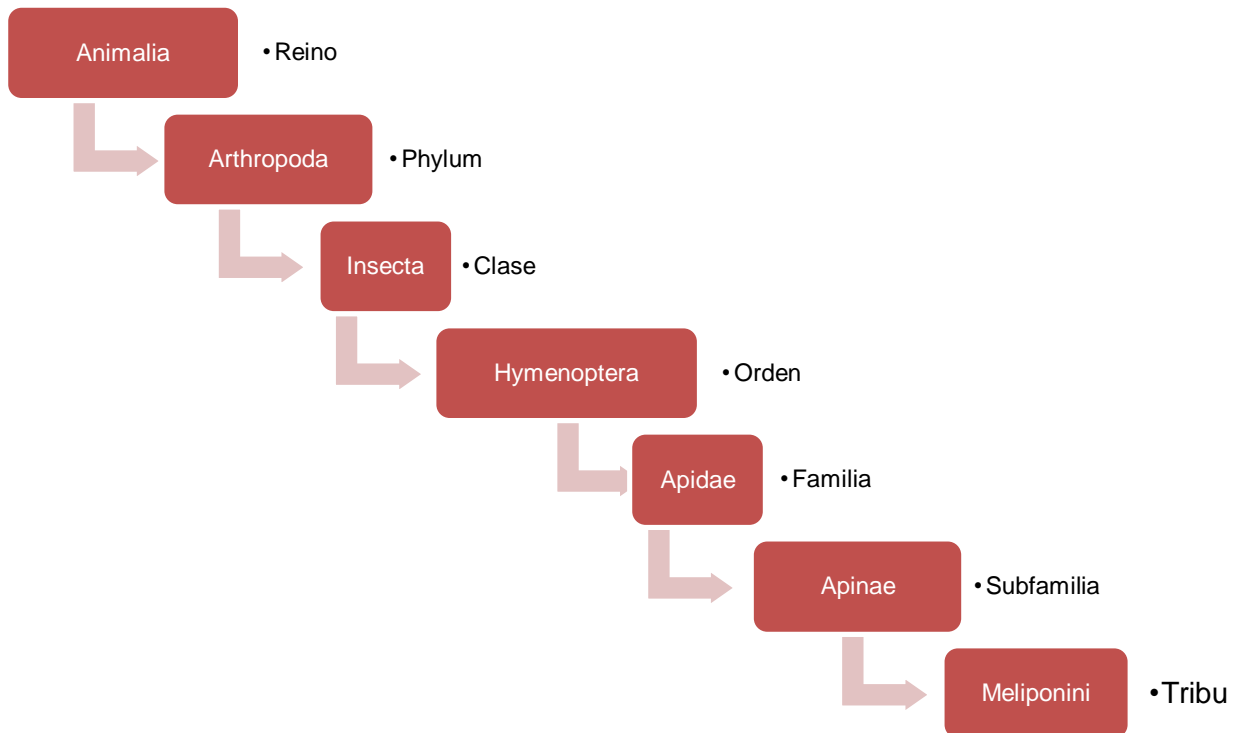


Figura 3 Cuadro taxonómico de la tribu Meliponini. (Tomado y modificado del NCBI).

Tanto la tribu *Meliponini*, conformada por más de 350 especies distribuidas en 36 géneros, así como la tribu *Apini*, de la que forma parte la abeja melífera y esta constituida por 11 especies que se agrupan en un único genero, son las únicas abejas que se considera, presentan un comportamiento verdaderamente social, ambas tribus se agrupan dentro de la familia *Apidae* (Quezada, 2005).

En general, la taxonomía de los Meliponinos no está resuelta. Se han encontrado diferencias morfológicas y genéticas entre poblaciones de *Melipona beecheii* y



poblaciones de Centroamérica (Quezada *et al.*, 2001). Existe una gran variedad de ecotipos que se han adaptado a sus regiones de origen dando lugar a poblaciones morfológica y genéticamente distintas, pero aún no se conoce si dentro de estos ecotipos existen especies diferentes (González y Quezada, 2010).

2.4 *Melipona beecheii*

La característica taxonómica principal de los meliponinos es la carencia de un aguijón funcional, el cual no puede ser usado en su defensa (Quezada *et al.*, 2001), sin embargo, como se aprecia en la Figura 4 poseen mandíbulas poderosas que permiten cortar secciones del invasor, atacan por la nariz, oídos y ojos de los mamíferos y suelen morder las comisuras de los labios (Márquez, 1994; López-Cárdenas, 2000). También poseen una estructura pilosa en forma de cepillo en el extremos más anchos de la tibia, conocida como *penicillium* (Quezada, 2005) y el tamaño promedio de cada abeja varía desde los 2 mm hasta 1.5 cm (Quezada *et al.*, 2001).



Figura 4 Fotografía frontal a una *Melipona beecheii* (Xuna'an Kab; Kolel Kab).



2.5 Distribución

En México se tiene conocimiento de la existencia de 11 géneros y 46 especies de la Tribu *Meliponini* que habitan principalmente las regiones tropicales y subtropicales del país y a su vez del mundo; en el continente americano su distribución abarca desde México hasta el centro-norte de Argentina (Michener, 2000; Ayala, 1999), su reducida capacidad para regular la temperatura de sus nidos ha restringido la colonización de áreas templadas (Nascimento et al., 2000).

Como se puede apreciar en la Figura 5 *M. beecheii* presenta una amplia distribución abarcando desde los estados de Veracruz, Campeche y Yucatán por el Golfo y Jalisco-Michoacán por el Pacífico mexicano y llegando hasta Centroamérica (noroeste de Costa Rica).

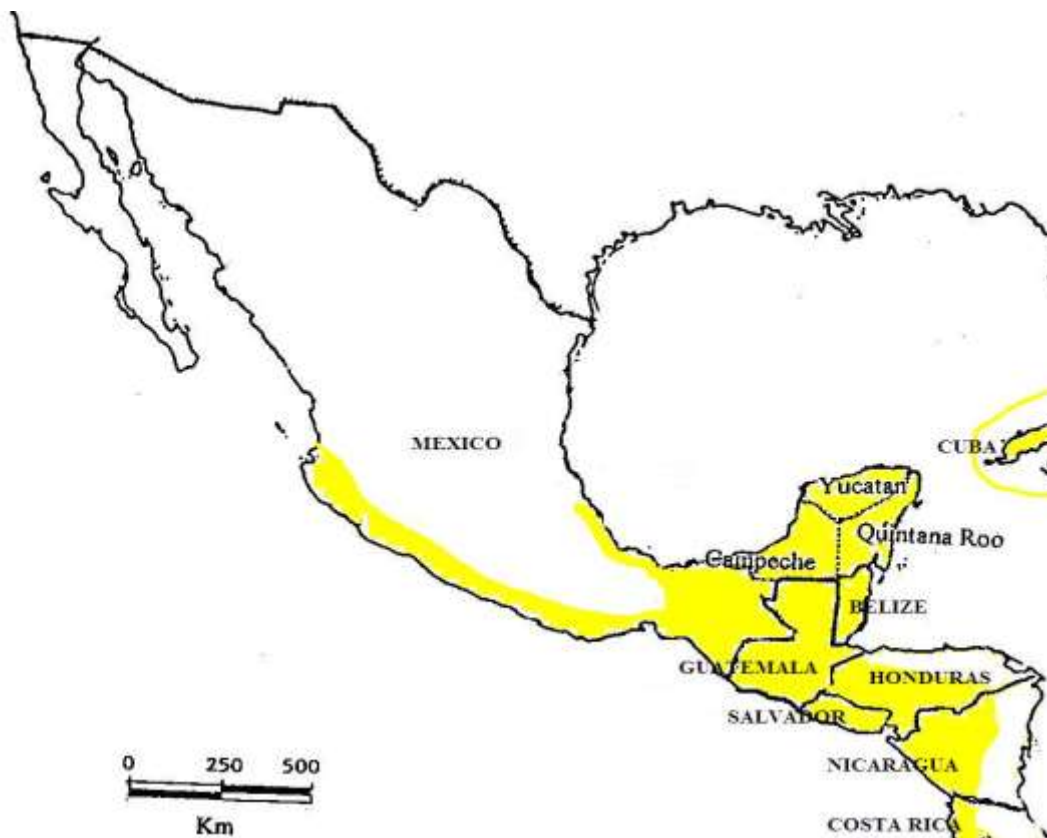


Figura 5 Regiones de distribución de los meliponinos de México. (Tomado de Quezada et al. 2005)



Debido a su extensa distribución son excelentes polinizadores de la flora nativa y cultivada en los ecosistemas en que habitan (Bawa, 1990; Roubik, 1989; Martínez *et al.*, 1993) es por ello que muchas especies de plantas son dependientes directos del trabajo de polinización de estos insectos siendo de vital importancia para el mantenimiento del ecosistema.

2.6 Propóleo

Uno de los tantos productos de la colmena además de la miel y la cera, es el propóleo. La etimología deriva del griego *propolis*, palabra utilizada por los griegos para referirse a las puertas de una ciudad, voz formada por el prefijo *pro-* (“frente de”, “en la entrada de”) y *polis* (“ciudad”), cabe señalar que polis proviene a su vez del sánscrito *pur* (“ciudad fortificada”), con base en lo anterior el significado de la palabra propóleo es “en defensa de la colmena”.

Los propóleos son un tipo de resina recuperada por las abejas obreras a partir de exudados de algunas plantas además de arboles tales como álamos, castaños, pinos y palmas particularmente, una vez recuperado se mezcla con secreciones salivales que contienen enzimas y en la colmena se utilizan para guarnecer y mantener aséptico el interior de la colmena, tapa todos los intersticios que no son espacios de tránsito de las obreras.

Los propóleos son la base de diversos productos y mezclados con otros compuestos permiten producir (INAES, 2012):

- Pintura
- Pulidores
- Grasa
- Limpiadores
- Jarabes medicinales



2.6.1 Geopropóleo

Las abejas sin aguijón producen también un material resinoso que recogen de las plantas y lo mezclan con cera y componentes del suelo (tierra o arcilla), a este producto se le denomina geopropóleo (Kerr, 1987) y lo almacenan en grandes depósitos dentro de la colmena Figura 6. Este es utilizado de manera similar como los propóleos producidos por *A. mellifera* debido a que igualmente presenta una gran variedad de efectos farmacológicos descritos en la literatura .



Figura 6 Muestra de Geopropóleo.



2.6.2 Composición química

La composición química de los geopropóleos, al igual que con el propóleo, es cualitativamente y cuantitativamente variable, esto corresponde a factores como la estación y el lugar de recolecta, puesto que la composición química de los exudados de la planta determina la composición química del geopropóleo y ésta se modifica dependiendo la zona geográfica, y el tiempo de recolección, en cuyos casos la flora varía durante cada periodo estacional. (Ahn *et al.* 2004; Piccinelli *et al.* 2005; Lotti *et al.* 2010). Esto da como resultado una enorme riqueza de compuestos constituyentes.

En el caso de los propóleos, algunos de los compuestos mayoritarios son diversos tipos de flavonoides, aldehídos, cetonas, ácidos grasos, terpenos, esteroides, aminoácidos, polisacáridos, hidrocarburos, alcoholes, hidroxibencenos, además de diversos tipos de ácidos como lo son fenólicos, cinámicos y cafeicos y algunos de sus esteres y algunos otros compuestos en trazas (Sha *et al.*, 2009; Usia *et al.*, 2002; Marucci, 1995).

Sin embargo, el geopropóleo al ser un tipo diferente de propóleo, compuesto por resina, cera y con la singular característica de que presenta suelo en su composición, posee características únicas (Cunha, *et al.*, 2013; Guilherme *et al.*, 2013).

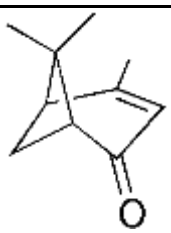
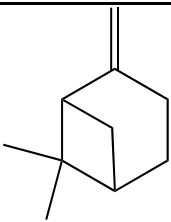
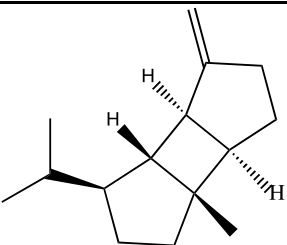
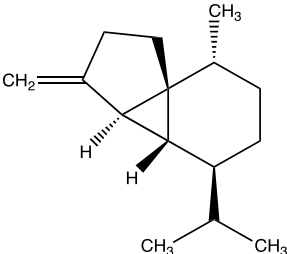
Actualmente, Brasil es el país con mayores estudios referentes al geopropóleo, muchos de estos reportan que en su composición presenta benzofenonas polipreniladas como principales compuestos en lugar de los flavonoides, mayormente encontrados en los propóleos de las abejas melíferas (Awale *et al.*, 2008; Barth, 2006; Cunha *et al.*, 2013), aunque otros grupos de investigadores también reportan la destacada presencia de distintas clases de terpenos como diterpenos y triterpenos además de ácido gálico y compuestos fenólicos como flavonoides y ácido fenólico (Velikova *et al.* 2000; Bankova *et al.* 2000).



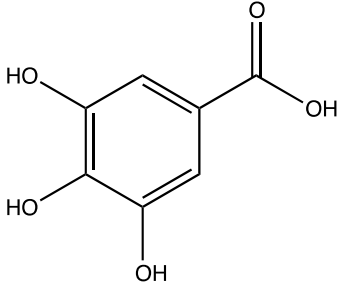
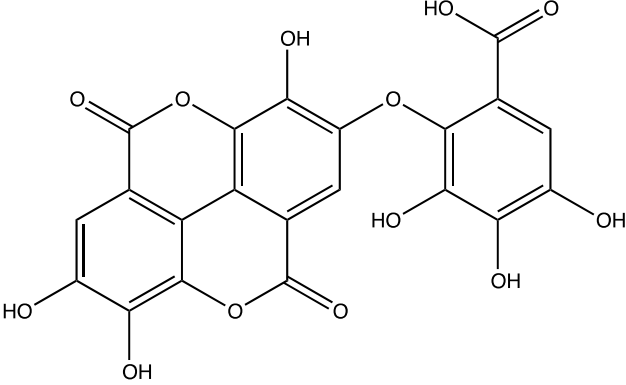
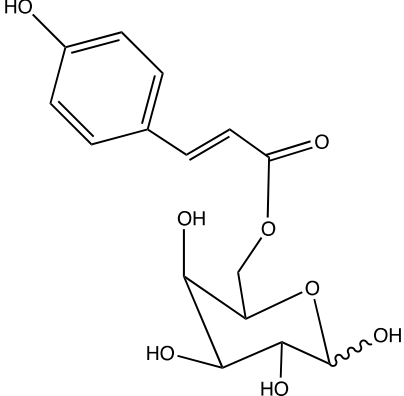
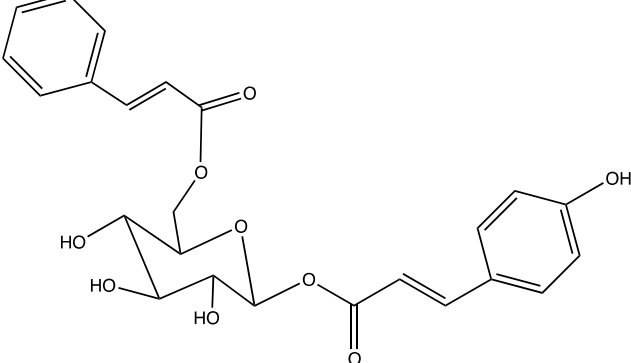
En México, en 2006 en el estado de Yucatán, Pino y colaboradores reportaron la presencia de diversos compuestos volátiles en una muestra de geopropóleo producida por *Melipona beecheii*.

En la Tabla 1 se resumen algunos compuestos aislados a partir de los geopropóleos.

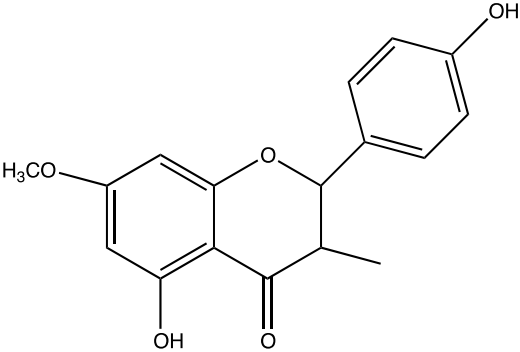
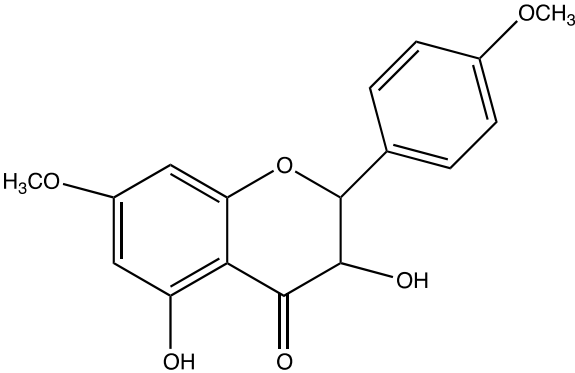
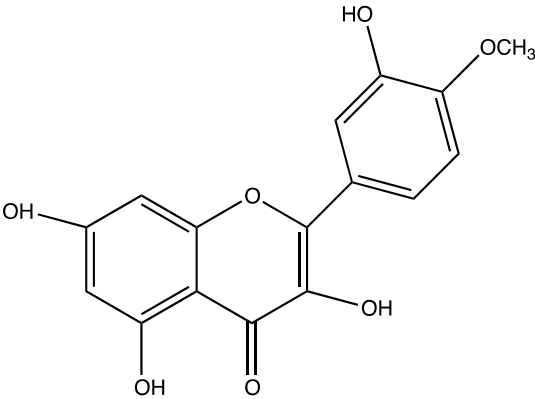
Cuadro 1 Compuestos identificados en el geopropóleo de distintos orígenes.

Nombre del compuesto	Estructura	Referencia
Terpenos		
Verbenona		Pino <i>et al.</i> , 2006
β -pineno		Pino <i>et al.</i> , 2006
β -bourboneno		Pino <i>et al.</i> , 2006
β -cubebeno		Pino <i>et al.</i> , 2006



Nombre del compuesto	Estructura	Referencia
Fenoles		
Ácido gálico		Pereira <i>et al.</i> , 2014
Dilactona del ácido valoneico		Pereira <i>et al.</i> , 2014
6-<i>O</i>-<i>p</i>-cumaroil-<i>D</i>-galactopiranososa		Alves de Souza & Amorim, 2013.
6-<i>O</i>-cinamoil-1-<i>O</i>-<i>p</i>-cumaroil-β-<i>D</i>-glucopiranososa		Alves de Souza & Amorim, 2013.



Nombre del compuesto	Estructura	Referencia
Flavonoides		
7-O-metil naringenina		Alves de Souza & Amorim, 2013.
7,4'-di-O-metil aromadrendina		Alves de Souza & Amorim, 2013.
4-O-metil kaempferol		Alves de Souza & Amorim, 2013.



2.6.3 Propiedades farmacológicas

Aunque existe una amplia variedad de estudios publicados sobre propóleos, la mayoría de ellos son de *Apis mellifera*. Por el contrario, las investigaciones sobre los geopropóleos se han estudiado poco.

En estudios recientes se señalan las propiedades biológicas de los geopropóleos, tales como antimicrobianas, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antiúlcera y antitumorales, sin embargo, aún se sabe poco acerca de su composición química y actividad biológica (Guilherme *et al.*, 2013).

2.6.3.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana es una de las propiedades biológicas más estudiadas en el geopropóleo (Marcucci, 1995; Guilherme da Cunha *et al.*, 2013). Son muchos los estudios previos que han demostrado la eficacia del geopropóleo en contra de bacterias Gram positivo (*Staphylococcus aureus*; *Streptococcus mutans*) como contra Gram negativo (*Escherichia coli*) (Liberio *et al.*, 2011). Velikova y colaboradores, fueron los primeros en describir la actividad antimicrobiana de distintas muestras de geopropóleo recolectadas en Brasil y sugirieron la posibilidad de que se encuentren presentes compuestos no polares, lo que explicaría esta propiedad.

Otro estudio realizado por Liberio y colaboradores, demostró que una muestra de geopropóleo, exponía actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, así como también contra el hongo *Candida albicans*, además de efectos bactericidas contra la biopelícula producida por *Streptococcus mutans*.



2.6.3.2 Actividad antiinflamatoria

La detención del desarrollo de procesos inflamatorios, es otra de las propiedades características en los preparados que contienen geopropóleo. Franchin y colaboradores, han realizado la mayor cantidad de estudios al respecto, concluyendo que, distintos extractos (etanólicos y acuosos) de éste, pueden reducir la hipernocicepción inflamatoria que podría estar relacionada con la inhibición de las citocinas, IL-1 β y TNF- α , y la consiguiente inhibición de la liberación de prostanoïdes y con eso la interacción con los neutrófilos y las células endoteliales, además de que, también es capaz de disminuir la migración de los neutrófilos en el proceso inflamatorio, dependiente de la vía del óxido nítrico.

2.6.3.3 Actividad antioxidante

La presencia de polifenoles en el geopropóleo, está íntimamente relacionada con su capacidad como antioxidante, basada en la propiedad para neutralizar radicales libres. Algunos de los compuestos con actividad antioxidante que se han identificado son el ácido caféico y ácido cinámico. En cuanto a propiedades antioxidantes se refiere y con base en diversos autores, se considera que posee una actividad mayor que el resto de los productos apícolas (Nagai *et al.*, 2001).

2.6.3.4 Actividad citotóxica

Las propiedades en contra de las células cancerígenas es uno de los puntos más importantes en las investigaciones sobre los extractos de geopropóleo. Diversos estudios con distintos propóleos han demostrado tener un efecto positivo en contra de diversas líneas de células tumorales, como el de colon (Banskota *et al.*, 2002, Ishihara *et al.*, 2009; USIA *et al.*, 2002), el renal (Valente *et al.*, 2011), de páncreas (Li *et al.*, 2010; Awale *et al.*, 2008), de cuello uterino (Sha *et al.*, 2009), de la piel (Chen *et al.*, 2004) y el de pulmón (Li *et al.*, 2008; Weng *et al.*, 2007), entre otros.



Son diversos los mecanismos a través de los cuales los extractos pueden lograr su actividad, estas pueden abarcar, la detención del ciclo celular, inducción de apoptosis y la inhibición de la proliferación de células cancerígenas evitando así el crecimiento tumoral (Orsolíc *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004; Bufalo *et al.*, 2010; Fresco *et al.*, 2006).



3. JUSTIFICACIÓN

Numerosos pueblos del planeta, encuentran en la medicina tradicional un recurso fundamental para su salud, a su vez, es un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad. La creencia de que los medicamentos obtenidos a partir de síntesis química pueden resultar más perjudiciales que benéficos, aunado a la automedicación, al uso indiscriminado de algunos medicamentos, la mayor prevalencia de patógenos a los antibióticos existentes actualmente y los elevados costos de los nuevos tratamientos han orillado a la búsqueda de nuevas alternativas, encontrando la respuesta en la medicina tradicional, es por eso que hoy en día es reconocida como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos.

En México el geopropóleo es un producto natural ampliamente utilizado como alternativa terapéutica en diversos padecimientos y en él encontramos una opción viable para el desarrollo de nuevos tratamientos contra diversas enfermedades debido a posee diversos componentes que le confieren propiedades biológicas sumamente importantes, es por eso que surge la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la composición química de los geopropóleos mexicanos y correlacionarla con las actividades biológicas específicas que aportan los mismos.

Las abejas sin aguijón (meliponinos) son las responsables de generar este tipo de propóleo, que es una compleja mezcla de exudados de plantas, cera de abeja y suelo. Lamentablemente en México no existen estudios relacionados a este tipo de propóleos, centrándose la mayoría solo en los producidos por la especie *Apis mellifera*.



4. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en la caracterización de los compuestos mayoritarios de una muestra de geopropóleo de abejas meliponas recolectada en Coatepec en el Estado de Veracruz.

Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Realizar la revisión bibliográfica exhaustiva de las diferentes publicaciones relacionadas con los geopropóleos.
- Preparar el extracto metanólico utilizando un método de maceración.
- Realizar el fraccionamiento del extracto derivado del geopropóleo utilizando métodos cromatográficos convencionales.
- Determinar la estructura química de los componentes aislados mediante la utilización de métodos espectroscópicos y espectrométricos.



5. DESAROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Procedimientos generales de análisis

Se realizó la cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice 60 (Merck ®) y Sephadex LH-20 (Fluka). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas sobre placas de aluminio cubiertas con gel sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063 – 0.200 mm) en diversos tamaños y sistemas de elución. Estos se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254$ nm (onda corta) y 315 nm (onda larga), posteriormente se revelaron con anisaldehído sulfúrico seguido de calentamiento hasta la visualización de marcas violetas.

5.1.1 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Se utilizaron los equipos Agilent 6890L y el analizador másico de tiempo de vuelo (TOF) para generar los espectros de masas por impacto electrónico (IE) a 70 eV. Se empleó un equipo Varian modelo VNMRS400 para registrar los espectros de RMN de ¹H y ¹³C, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Para disolver las muestras se empleó CDCl₃, DMSO-*d*₆, MeOH-*d*₄ y acetona-*d*₆, según lo requerido. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al TMS.

5.2 Geopropóleo y proceso de extracción

La muestra de geopropóleo producida por las abejas del género *Melipona* fue recolectada manualmente en el mes de julio del 2011 en Coatepec, Veracruz, México. El geopropóleo se deseco y conservó a -20 °C, posteriormente este se molió con ayuda de un mortero (Melipona: 50.4635 g) y se extrajo utilizando un



método de maceración con 500 mL de etanol como disolvente durante un periodo de 72 horas con agitación. Al término de las extracciones, los extractos se filtraron, se combinaron, se concentraron a presión reducida con ayuda de un rotaevaporador y se obtuvieron 4.293 g de un sólido color ocre oscuro. El extracto obtenido se resuspendió en metanol (250 mL) y se utilizó un baño ultrasónico para disolver la muestra.

Después de disolver en metanol se procedió a realizar una cromatografía en capa fina de la fracción soluble utilizando como fase móvil metanol-acetato de etilo (80:20) y como agente cromógeno anisaldehído sulfúrico.

5.2.1 Fraccionamiento primario de la fracción soluble

El extracto metanólico se sometió a un proceso de fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando una porción del extracto total metanólico (2 g), gel de sílice Kieselgel 60 Merck (250 g) como adsorbente y una fase móvil compuesta por mezclas de hexano:acetona en gradiente de polaridad. Como resultado de este proceso se obtuvieron 34 fracciones de 250 mL cada una, las cuales se concentraron al vacío por separado. El fraccionamiento fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina (CCF) y las fracciones que presentaban similitud cromatográfica se agruparon y se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador para finalmente obtener 8 fracciones combinadas. En el Cuadro 2 se resume el proceso de fraccionamiento primario.



Cuadro 2. Fraccionamiento primario del extracto metanólico del geopropóleo por CCA.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones Obtenidas	Fracciones Combinadas
Hexano	100	1-4	Fn-A
Hexano:acetona	95:5	5-8	Fn-B
	90:10	9-13	Fn-C
	80:20	14-18	Fn-D
	70:30	19-24	Fn-E
	1:1	25-28	Fn-F
	30:70	28-30	Fn-G
Acetona	100	31-34	Fn-H

5.2.2 Fraccionamiento secundario a partir de Fn-A.

La fracción Fn-A (5.7752) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante un proceso de columna abierta utilizando gel de sílice como adsorbente y se eluyó utilizando como fase móvil hexano:diclorometano:acetato de etilo en polaridad creciente.

Se colectaron 35 fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatografía, obteniéndose un total de 5 fracciones combinadas. En el Cuadro 3 se resume el proceso de fraccionamiento secundario que se aplicó al extracto metanólico del propóleo a partir de la fracción Fn-A.



Cuadro 3. Fraccionamiento secundario por CCA a partir de Fn-A.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones reunidas	Fracciones combinadas
hexano: diclorometano: acetato de etilo	80:10:10	1-10	FI
	70:10:20	11-15	FII
	70:10:20	16-20	FIII
	60:10:30	20-25	FIV
	40:10:50	26-35	FV

5.2.3 Fraccionamiento terciario a partir de FIV

La fracción FIV (2.2084 g) fue sometida a un fraccionamiento en CCA utilizando gel de sílice. La elución de la columna se realizó de forma isocrática utilizando como fase móvil hexano: diclorometano: acetato de etilo (8: 1: 1). Durante el proceso se colectaron 10 fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica obteniéndose 3 fracciones combinadas. En el Cuadro 4 se ilustra el proceso de fraccionamiento al que fue sometida la fracción FIV.

Cuadro 4. Fraccionamiento terciario por CCA a partir de FIV

Sistema de elución	Proporción	Fracciones reunidas	Fracciones combinadas
hexano: diclorometano: acetato de etilo	100	1-4	FIVa
		5-8	FIVb
		8-10	FIVc



5.2.4 Purificación de la β -amirenona a partir de la fracción FIVa

La fracción FIVa fue sometida a un proceso de recristalización con diclorometano. Este proceso permitió la obtención de cristales de color blanco, los cuales se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de las plantas medicinales y productos naturales se ha mantenido a lo largo de muchas generaciones y se encuentra en auge en los últimos tiempos. Entre los productos que se utilizan con mayor frecuencia encontramos a los productos producidos por las abejas. El geopropóleo representa una clase de propóleo que ha sido utilizado como parte de los remedios tradicionales para tratar diversos padecimientos. Sin embargo, existen pocos estudios que validen los usos reportados en la medicina tradicional para esta resina y su composición química. Por esta razón se seleccionó al geopropóleo para estudiar su composición química.

El estudio fitoquímico del geopropóleo de la región de Coatepec en el Estado de Veracruz se realizó utilizando 50.4635 g. El geopropóleo se sometió a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente durante 72 horas, utilizando 500 ml de etanol. El extracto obtenido se filtró al vacío y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo 4.293g de extracto.

El fraccionamiento primario del extracto etanólico, se realizó utilizando CCA, gel de sílice como adsorbente y mezclas de hexano-acetona en un gradiente de polaridad como eluyente. Este proceso permitió la obtención de 34 fracciones primarias que fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en ocho fracciones combinadas.

El estudio se continuó con la fracción Fn-A, la cual se seleccionó por ser la más abundante y de menor complejidad. La fracción se recromatografió en una columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice y como eluyente mezclas de hexano:CH₂Cl₂:AcOEt en un gradiente de concentración. Este proceso permitió la obtención de 35 fracciones que fueron agrupadas en cinco fracciones con base en su similitud cromatográfica.



La fracción FIV se sometió a otro proceso de cromatografía en columna abierta realizando la elución en forma isocrática utilizando como fase móvil hexano:CH₂Cl₂:AcOEt. Este proceso permitió la obtención de 10 fracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en tres fracciones combinadas.

A partir de la fracción FIVa se obtuvieron, mediante la recristalización con diclorometano, cristales de color blanco solubles en diclorometano en caliente, en acetona e insolubles en metanol.

6.1 Caracterización de la β-amirenona (C-1).

La identificación de **C-1** se realizó utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los datos obtenidos se compararon con los reportados en la literatura. Los datos de RMN del compuesto aislado y los descritos en la literatura por Marques y colaboradores (2010) para la β-amirenona se muestran en la Tabla 5. Los espectros de RMN¹H y RMN¹³C se ilustran en las Figuras 7 y 8, respectivamente.

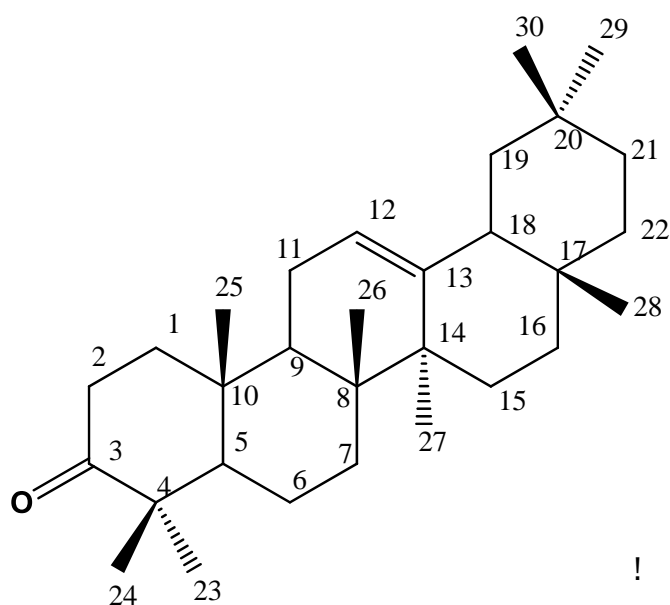


Ilustración 7 Estructura química de la β -Amirenona donde se muestra la numeración de los carbonos correspondientes a la Tabla 5

Cuadro 5 Constantes espectrométricas de ^{13}C para β -amirenona (Marques *et al.*, 2010).

Posición	RMN ($\delta^{13}\text{C}$) Experimental	RMN ($\delta^{13}\text{C}$) Teórico	Posición	RMN ($\delta^{13}\text{C}$) Experimental	RMN ($\delta^{13}\text{C}$) Teórico
1	39.28	39.3	16	23.63	23.6
2	34.19	34.2	17	46.84	46.8
3	217.87	217.9	18	41.4	41.4
4	47.46	47.5	19	45.8	45.8
5	55.28	55.3	20	31.07	31.1
6	19.64	19.6	21	33.8	33.8
7	32.15	32.2	22	32.50	32.5
8	39.76	39.8	23	26.11	26.1
9	46.76	46.8	24	21.49	21.5
10	36.65	36.7	25	15.21	15.2
11	23.1	23.1	26	16.71	16.7
12	121.48	121.5	27	25.86	25.9
13	145.25	145.3	28	28.40	28.4
14	41.84	41.8	29	33.31	33.3
15	27.41	27.4	30	23.66	23.7

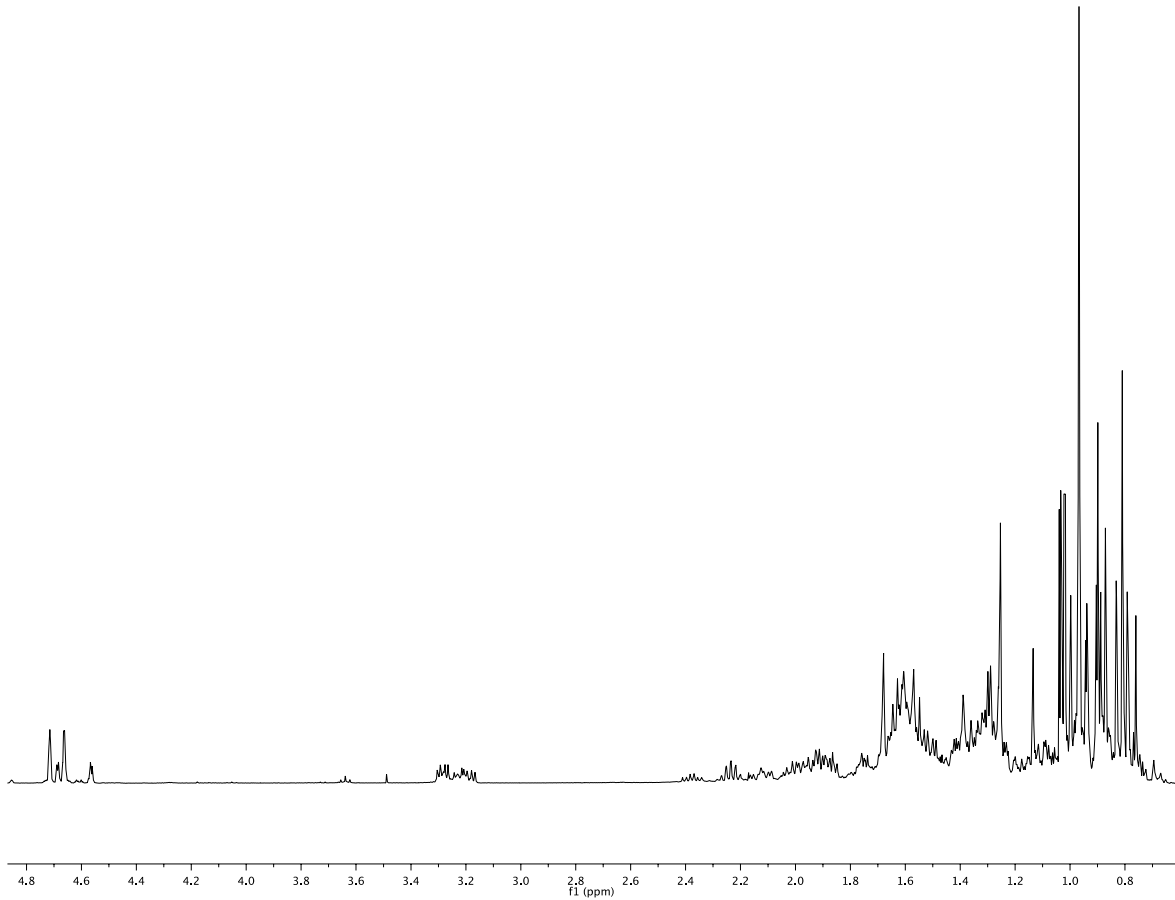


Figura 8 Espectro de RMN- ^1H de C1 (400 MHz).

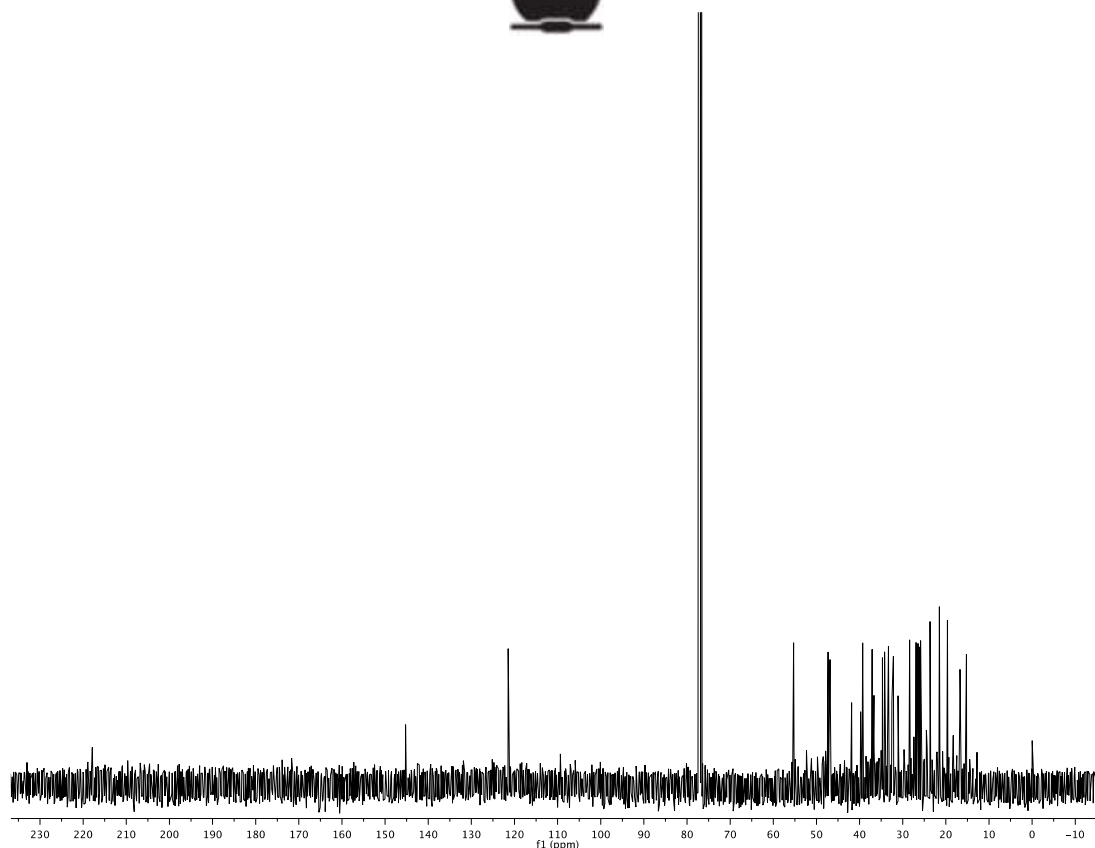


Figura 9 Espectro de RMN-¹³C de C1 (100MHz).

La β -amirenona es un triterpeno, de tipo oleanano y junto con el lupeol, el epilupeol, el epiglutinol, la β y α -amirina y la α -amirenona forma parte de la resina generada por arboles del genero *Bursera* (Robles *et al.*, 2005). La importancia biotecnológica de los árboles y arbustos de esta familia se debe a las oleorresinas exudadas de sus troncos, a menudo conocido por las fragancias que dan el nombre a algunas de sus especies, como la mirra, incienso, elemí, copal, y Breu (Rüdiger & Veiga-Junior, 2013).

Existen ocho especies de burseras en el continente americano pero solo una, *Bursera simaruba*, se encuentra en el estado de Veracruz (Cuatrecasas, 1957). La *Bursera simaruba* es un árbol medicinal muy arraigado en la cultura popular por su potencial curativo, atribuyéndosele al menos 47 usos posibles, destacando por su eventual efecto en el tratamiento de afecciones de la piel, así como contra diversos tipos de infecciones e incluso se le atribuyen posibles efectos positivos en enfermedades importantes como la hipertensión (Quintão *et al.*, 2014).



Los estudios previos realizados, utilizando extractos orgánicos de la familia Burserasea, han demostrado que la β -amirenona tiene una actividad sinérgica como antiinflamatorio (Sosa *et al.*, 2002), antitumoral (Wickramaratne *et al.*, 1995; Aranya *et al.*, 2005) y antimicrobiana (Robles, 2005).

La β -amirenona es uno de los principios amargos de las hojas del romero (*Rosmarinus officinalis*) y posee múltiples actividades farmacológicas; como carminativo, digestivo y antiespasmódico, además de propiedades hepatoprotectoras. Los estudios sobre la actividad farmacológica de los componentes del romero que se están realizando actualmente tienen como candidatos a los terpenos, debido a las propiedades antioxidantes de algunos de ellos, las cuales se sabe, inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el envejecimiento de la piel causado por fenómenos de oxidación (Tránsito, 2008).

Además de la resina de *Bursera simaruba* y de las hojas de romero, la β -amirenona también se encuentra presente en las semillas, la corteza del tallo y las hojas de *Mangifera indica* (mango), y se le atribuye una actividad sinérgica en actividades antiparasitarias y antiinflamatorias-analgésicas (Sergent, 2013; Alonso, 2004; Duke *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2010).

Es de destacar que todas estas especies vegetales se encuentran de manera abundante en el estado de Veracruz por lo que no es de extrañarse que la β -amirenona esté presente como uno de los componentes terapéuticos principales y mayoritarios en el geopropóleo producido por abejas pertenecientes a esta región, así como el amplio rango de actividades biológicas presentes en dicho triterpeno.



7. CONCLUSIONES

La información generada representa a nuestro entender el primer estudio sobre la composición química de un geopropóleo mexicano.

El estudio fitoquímico del geopropóleo producido por la abeja sin aguijón *Melipona becheii* y recolectado en Coatepec, Veracruz, permitió el aislamiento del triterpeno β -amirenona.

La presencia del triterpeno β -amirenona puede explicar de manera parcial algunas de las propiedades biológicas descritas para el geopropóleo, no obstante algunos estudios señalan que la combinación de distintos componentes es fundamental para que se observen las actividades biológicas descritas a los propóleos (Kujumgiev *et al.*, 1999; Bankova, 2005b; Seidel *et al.*, 2008;).



8. PERSPECTIVAS

Identificar los componentes minoritarios del extracto metanólico del geopropóleo.

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos y compuestos derivados de geopropóleos recolectados en Coatepec, Veracruz.



9. REFERENCIAS

1. Ahn, M.R., S. Kumazawa, T. Hamasaka, K. S. Bang and T. Nakayama. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7286-7292.
2. Alonso, J. 2004, Tratado de fitofármacos y nutraceuticos, Rosario: Corpus.
3. Alves de Souza, S. & Amorim, C.. (2013). Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 5. 2014, mayo, De Hindawi Publishing Corporation Base de datos.
4. Aranya, J., Z. Hongjie, T.T. Ghee, M.Cuiying, V.H. Nguyen, M.C. Nguyen, B. Nutavan, S. Doel, 2005, Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*, *Phytochemistry*, 66:2745-2751.
5. Awale, S., Li, F., Onozuka, H., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 181–189.
6. Ayala, R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana* , 123.
7. Ayala B., R., T. L. Griswold and D. Yanega. 1996. Apoidea, pp. 423-464 in J. Llorente B., A. N. García A., and E. González S., eds., *Biodiversidad Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.



8. Barth, O. M. (2006). Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. *APIACTA* , 71-85.
9. Bankova, V., De Castro, S. & Marucci, M.. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
10. Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 80, 67– 73.
11. Bufalo, M.C., Candeias, J.M., Sousa, J.P., Bastos, J.K., Sforcin, J.M., 2010. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Nat. Prod. Res.* 24,1710-1718.
12. Castillo, N.. (junio 09, 2012). Mieles nativas de los mayas, usos de ayer y hoy. julio 2014, de UNAM Sitio web: http://ciencia.unam.mx/leer/102/Mieles_nativas_de_los_mayas_usos_de_ayer_y_hoy
13. Chen, C., Weng, M., Wu, C., Lin, J., 2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 1, 175–185.
14. Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R., Araújo, M. J., Búfalo, M. C., & Sforcin, J. M. (2013). Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma Cells In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* , 1-6.



15. Cuatrecasas J., 1957, Burseraceae, En prima flor Colombiana, *Webbia*, 12:357-441.
16. Cunha, M. G., Franchin, M., Galvão, L. C., Bueno-Silva, B., Ikegaki, M., Alencar, S. M., y otros. (2013). Apolar Bioactive Fraction of *Melipona scutellaris* Geopropolis on *Streptococcus mutans* Biofilm. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* , 1-7.
17. Cunha, M. G., Franchin, M., Galvão, L. C., Ruiz, A. L., Carvalho, J. E., Ikegaki, M., y otros. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *Complementary and Alternative Medicine* , 13 (23), 1-9.
18. Duke, J., M. Bogenschutz, P. Duke, 2012, Handbook of Medical Herbs, California.
19. Falcão, S. I., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products* (49), 805-812.
20. Franchin, M., M. G. da Cunha, C. Denny *et al.*, "Bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis decreases neutrophils migration in inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (13), 1–7.
21. Franchin, M., M. G. da Cunha, C. Denny *et al.*, "Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α ," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 143, no. 2, 709–715.



22. Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M.P., 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med. Res. Rev.* 26, 747–766.
23. García, A.. (2000). El Códice Tro-Cortesiano del Museo de América de Madrid. *Revista Española de Antropología Americana*, 30, 9-25. junio, 2014, De Revistas Científicas Complutenses Base de datos.
24. García, O., Saldaña, T. & Santana P. (2012). HISTORIA DE LA APICULTURA EN MÉXICO. NOTIABEJA, 6, 9. 2014, junio 20, De SAGARPA Base de datos.
25. Guilherme da Cunha, Marcos, Franchin, Marcelo, Câmara de Carvalho, Lívia, Tasca Góis de Ruiz, Ana, Ernesto de Carvalho, João, Ikegaki, Masarahu, Matias de Alencar, Severino, Koo, Hyun, 2013, Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis, *Bio. Med. Central*, (2), 1-9.
26. INAES, Centro de Vinculación con el Sector Productivo de la UNAM. (2012). Guía empresarial: Miel. julio 5, 2014, de Secretaría de Economía Sitio web: http://www.inaes.gob.mx/doctos/pdf/guia_empresarial/miel.pdf
27. Ishihara, M., Naoi, K., Hashita, M., Itoh, Y., Suzui, M., 2009. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncol. Rep.* 22, 349–354.
28. Kerr W., Abelhas indigenas brasileiras (meliponineos) na polinizcao e na producao de mel, polen, geopropolis e cera, *Inf. Agropec.* Belo Horizonte, 13 (1987), 15–27.



29. Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H., Kadota, S., 2010. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *J. Nat. Prod.* 73, 623–627.
30. Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5434–5440.
31. Liberio, S. A., Pereira, A. L., Dutra, R. P., Reis, A. S., Araújo, M. J., Mattar, N. S., y otros. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine* , 11 (108), 10.
32. López-Cardenas, D.G., 2000, Influencia de Fórmulas Alimenticias y Suministro de Cerumen en la propagación de colonias de abejas “Congo” (*Scaptotrigona mexicana*), Facultad de Ciencias Químicas, UNACH.
33. Lotti, C., M. C. Fernandez, A. L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, I. M. Hernandez and L. Rastrelli. 2010. Chemical constituents of red mexican propolis. *J. Agric. Food Chem.* 58: 2209-2213.
34. Márquez, L.J., 1994, Meliponicultura en México, Dugesiana, 3-13.
35. Marques, D.D., Graebner, I.B., de Lemos, T.L., Machado, L.L., Assunção, J.C. & Monte, F.J.. (2010, agosto). Triterpenes from *Protium hebetatum* resin.. *Nat Prod Commun.*, 8, 1181-2.
36. Marucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* (26), 83-99.



37. Medina, L.. (2010). Meliponas in Yucatan, México. mayo 19, 2014, de THE UH HONEYBEE PROJECT Sitio web: http://www.uhbeeproject.com/materials/meliponas_in_yucatan_hawaii_2010.pdf
38. Michener C.D. (1990) Classification of the Apidae (Hymenoptera) The University of Kansas; *Science Bulletin* 54(4):75-164
39. Michener, C. D. (2000). The Bees of the World. *JHU Press* , 913.
40. Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry* 75:237-240
41. Nascimento, V. A., Matusita, S. H., Kerr, W. E., 2000, Evidence of hybridization between two species of Melipona bees, *Genet. Mol. Biol.*, 79–81.
42. Nates-Parra G. (1996) Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponinae) de Colombia. 181-268 pp. En: G.D. Amat, G. Andrade, F. Fernández (eds). *Insectos de Colombia: Estudios escogidos*, Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y Centro Editorial Javeriano, Bogotá. D.C.
43. Nates Parra, G. (2001). Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana* , 2 (3), 233-248.
44. Orsolić, N., Saranović, A.B., Basić, I., 2006. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med.* 72, 20–27.



45. Ortega, C., & Ochoa, R. (2004). La Producción de Miel en México Modernidad y Tradición. *Claridades Agropecuarias* , 3 (128), 13
46. Parra G. (1990) Bionomía de las abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) del Occidente Colombiano *Cespedesia*; 57/58:77-116
47. Pereira, R., Vinicius, B., Soares, M., Aranha, M., Brandaõ, L., Fernandes, F., Sousa, N. & Meireles, R.. (2014). Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2549-2557.
48. Pino, J., Marbot, R., Delgado, A., Zumárraga, C. & Sauri, E.. (2006). Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. *Journal of Essential Oil Research*, 18:1, 53-56.
49. Quezada-Euán, J.J., May- Itzá, W.J., Gonzalez-Acereto, J.A., 2001, Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development, *Bee World*, pp.160-167.
50. Quezada-Euán, J.J., 2005. Biología y Uso de las Abejas sin Aguijón de la Península de Yucatán, México (Hymenoptera: Meliponini). Universidad Autónoma de Yucatán, 15-23.
51. Quezada, J., Palmer, K., Oldroyd, B., Paxton, R., & Vazquez, R.. (diciembre, 2005). EVIDENCIA MOLECULAR DE LA EXISTENCIA DE SUBESPECIES EN *M. beecheii* B. (Hymenoptera: Meliponini). junio, 2014, de Universiteit Utrecht Sitio web: www.bio.uu.nl/promabos/seminar/presentations/08QuesadaEuan.ppt



52. Quintão, N., Rocha, L., da Silva, G., Reichert, S., Claudino, V., *et al.* (2014). Contribution of α,β -amyrenone to the anti-inflammatory and anti-hypersensitivity effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd.. *BioMed Research International*, 1-29.
53. Piccinelli, A. L., M. C. Fernandez, O. Cuesta-Rubio, I. M. Hernandez, F. De Simone and L. Rastrelli. 2005. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9010-9016.
54. Rivera, A. & Cappas, J.. (2000). Las Abejas y la Miel en los Códices Mayas (Códice Madrid o Tro-Cortertesiano).. junio 2, 2014, de *La Colmena* Sitio web:
http://cuijasp.com/yalal/pdf_lib/codices/abejas%20y%20miel%20en%20los%20mayas.pdf
55. Robles, J., R. Torrenegra, I. Gray, C. Piñeiros, L. Ortiz, M. Sierra, 2005, Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileña de Farmacognosia*, 154:283-286.
56. Rüdiger, A. & Veiga-Junior, Valdir. (2013). Chemodiversity of Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 10, 1142-1153. 2014, De Wiley Online Library Base de datos.
57. Sergent, E., 2013, El cultivo del mango ("Mangifera indica" L): *Botánica, manejo y comercialización*. Universidad de Venezuela. Consejo de desarrollo científico y humanístico. pp 310



58. Sha, N., Guan, S., Lu, Z., Chen, G., Huang, H., Xie, F., Yue, Q., Liu, X., Guo, D., 2009. Cytotoxic constituents of Chinese propolis. *Journal of Natural Products*, 72, 799–801.
59. Sosa S., Balick M.J., Arvigo R., Esposito, R.G., Pizza C., Altiner G., Tubaro A., 2002, Screening of the tropical anti-inflammatory activity of some Central American plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 81:211-215.
60. Torres, J., B. Caballero, J. Burgos, J. Fernandez, 2010, Análisis del aprovechamiento de subproductos del mango (*Mangifera indica* L.) para la obtención de compuestos farmacológicos y nutricionales, 417: 95-98
61. Tránsito M. López, 2008, El romero, Planta aromática con efectos antioxidantes, *Fitoterapia*, 60-63.
62. Usia, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., 2002. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of Natural Products*. 65, 673–676.
63. Valente, M., Baltazar, A., Henrique, R., Estevinho, L. & Carvalho, M.. (2011, enero). Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 86-92.
64. Velthuis, H. H. (1997). The biology of stingless bees. *Dept. of Ethology, Utrecht University* , 1-33.
65. Vit, P., Silvia, R. & Roubik, D.. (2013). Pot-Honey A legacy of stingless bees. New York: Springer Science & Business Media.



66. Tepedino, V. (1979). The importance of bees and other insect pollinators in maintaining floral species composition. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 3, 139-150.
67. Weng, M., Liao, C., Chen, C., Wu, C., Lin, J., 2007. Propolin H from Taiwanese propolis induces G1 arrest in human lung carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5289–5298.
68. Wickramaratne, D.B.M., Mar W., Chai H., Castillo J.J., Frarnsworth N.R., Soejarto D.D., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., 1995, Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*, *Planta Medica* 61:80-81.
69. Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, P.T., 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65:261-291.