



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Determinación de los componentes
volátiles del geopropóleo
de *Scaptotrigona mexicana***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA

MARICELA GARIBAY RODRÍGUEZ



MÉXICO, CDMX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
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

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Fausto Rivero Cruz

SUSTENTANTE:

Maricela Garibay Rodríguez

ÍNDICE

CONTENIDO

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Cuadros	ii
Lista de Figuras	iii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 <i>Scaptotrigona mexicana</i>	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Características.....	4
2.1.3 Taxonomía.....	6
2.1.4 Distribución	7
2.2 Geopropóleo	8
2.2.1 Definición	8
2.2.2 Composición Química.....	9
2.2.3 Usos en la Medicina Tradicional	19
2.3 Microextracción en Fase Sólida (SPME)	20
2.3.1 Generalidades	20
2.3.2 Fundamento.....	22
2.3.3 Procedimiento del SPME	23
2.3.4 Variables que Afectan y/o Mejoran el Proceso de SPME	27
2.4 Tipos de Fibras Utilizadas en SPME	29
2.5 Aplicaciones de SPME	31
2.5.1 Aplicaciones Ambientales	31
2.5.2 Aplicaciones en la Química de Alimentos	31
2.5.3 Aplicaciones en Fluidos Biológicos	32
2.5.4 Otras Aplicaciones	32
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	34
4. PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1 Materia Vegetal.....	36
4.2 Microextracción en Fase Sólida.....	36

4.3 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.....	36
4.4 Identificación de los Compuestos Volátiles.....	38
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6. CONCLUSIONES	47
7. PERSPECTIVAS.....	48
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grado Centígrado
CAR	Carboxen
CG	Cromatografía de Gases
cm	Centímetro
CW	Carbowax
DB-5	5%-fenil-polimetilsiloxano
DEP	Dietilhexilftalato
DVB	Divinilbenceno
EM	Espectrometría de Masas
g	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HS	Head Space (Espacio de cabeza)
IE	Ionización Electrónica
IR	Índice de Retención
Km ²	Kilómetro Cuadrado
m	Metro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NIST	National Institute of Standards Technology
nm	Nanómetro
PA	Poliacrilato
PAH'S	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PFTBA	Perfluoroterbutilamina
PTFE	Politetrafluoroetileno
SPME	Microextracción en Fase Sólida
TOF	Tiempo de Vuelo
u	Unidad de Masa Atómica
µg	Microgramo
µm	Micrómetro

Lista de Cuadros

Cuadro	Nombre	Página
1	Compuestos químicos identificados en muestras de geopropóleos brasileños utilizando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	11
2	Principales compuestos volátiles identificados en muestras de propóleo y geopropóleo del estado de Yucatán	14
3	Principales compuestos volátiles identificados del propóleo de diferentes regiones geográficas	15
4	Condiciones de análisis	37
5	Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	41

Lista de Figuras

Figura	Nombre	Página
1	Dios de las abejas meliponas Ah-Mucen-Kab (Quezada-Euán <i>et al.</i> , 2001)	4
2	<i>Scaptotrigona mexicana</i> (Mueller <i>et al.</i> , 2012)	5
3	Clasificación taxonómica de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	6
4	Distribución de las abejas sin aguijón en México	7
5	Geopropóleo producido por abejas de la tribu <i>Meliponini</i> (Dutra <i>et al.</i> , 2014)	9
6	Esquema del dispositivo comercial de SPME (Microextracción en fase sólida)	22
7	Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa o headspace	25
8	Formas de desorción en SPME	26
9	Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se realiza por absorción o adsorción	30
10	Cromatograma del geopropóleo producido por <i>Scaptotrigona mexicana</i>	45

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son una fuente potencialmente importante para el desarrollo de nuevos fármacos. Debido a ello la búsqueda de nuevos agentes farmacológicamente activos obtenidos a partir de fuentes naturales, tales como extractos de plantas y/o de origen microbiano. Alrededor del 25% de los medicamentos prescritos en todo el mundo proceden de plantas. De aproximadamente 252 medicamentos considerados como básicos y esenciales por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 11% son exclusivamente de origen vegetal y un número significativo de fármacos sintéticos se obtuvieron a partir de precursores naturales (Yue-Zhong *et al.*, 1998).

Debido a la popularidad en la medicina tradicional, el geopropóleo se ha convertido en objeto de estudios farmacológicos y químicos en los últimos años, demostrando tener diversas actividades farmacológicas y biológicas: antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, antiviral, antioxidante, antitumoral, etc. (Bankova *et al.*, 2005).

El geopropóleo es una sustancia resinosa recogida por las abejas sin aguijón de diversas fuentes vegetales, que mezclan con cera y tierra para formar este producto natural. A causa de su composición química, el geopropóleo posee varias propiedades biológicas y farmacológicas (Bankova *et al.*, 1995). Los reportes en la literatura sobre la composición química de los compuestos volátiles del geopropóleo mexicano son escasos; sólo existe un estudio realizado por Pino y colaboradores (2006) en donde se analizó una muestra recolectada en Yucatán, México; reportando la presencia de compuestos tales como el α -pineno, β -cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno, β -bourboneno, β -pineno, α -copaeno y *trans*-verbenol, dentro de los más abundantes (Pino *et al.*, 2006).

Los componentes volátiles del geopropóleo difieren significativamente de acuerdo a sus orígenes geográficos y botánicos, debido a que las abejas recolectan las resinas y exudados vegetales procedentes de fuentes vegetales disponibles, que varían de una región a otra (Cheng *et al.*, 2013).

Es importante destacar que a pesar de que México es uno de los tres principales países exportadores de miel y que del 38% de la producción total proviene del sureste del país, sólo se han realizado estudios conducentes a determinar la composición volátil de la miel y de los propóleos producidos por *Apis mellifera* (Pino *et al.*, 2006).

Partiendo de este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que consiste en la identificación de los compuestos volátiles de una muestra de geopropóleo recolectada en el Estado de Veracruz de la abeja *Scaptotrigona mexicana*.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Scaptotrigona mexicana*

2.1.1 Generalidades

Desde la antigüedad, el hombre se ha sentido atraído sobre el estudio de las abejas, debido a que son los polinizadores más importantes tanto de la vegetación natural, como de los cultivos y ciertos tipos de abejas elaboran productos útiles, especialmente la miel y la cera. Por otra parte, son considerados de todos los animales, los más sociables (Michener, 2000). Existen aproximadamente 20,000 especies de abejas en el mundo. Las diversas especies varían de tamaño, forma y estilo de vida; la característica común en todas ellas es su dependencia de las flores para el abastecimiento de energía (néctar) y proteína (polen). Los meliponinos (tribu *Meliponini*) son abejas que, a diferencia de la mayoría de las especies que se conocen, viven en colonias permanentes con una reina y varias docenas o miles de obreras. Son las únicas abejas, junto con las abejas melíferas que son altamente sociables. La característica importante de los meliponinos es la carencia de aguijón funcional, pero tienen otros métodos efectivos para defenderse de sus enemigos (González-Acereto *et al.*, 2012).

Las abejas sin aguijón son posiblemente las más abundantes sobre la tierra y sin duda las más activas en los trópicos. Los melipónidos fueron las abejas cultivadas por los antiguos mexicanos, para obtener su miel y su cera, principalmente por los Mayas, pero la práctica de su cultivo casi se perdió con la introducción de la abeja europea (*Apis mellifera*) por los españoles (Ayala, 1999).

Mesoamérica es la única región a nivel mundial donde las abejas sin aguijón fueron cultivadas en forma sistemática; en el estado de Yucatán, el cultivo de las abejas sin aguijón (meliponicultura) data de los tiempos de la cultura maya. El cultivo de estas abejas entre los mayas se liga estrechamente a la tradición religiosa para la que existe un Dios guardián de las abejas meliponas llamado *Ah Mucen Kab* Figura 1. (González-Acereto *et al.*, 2012).



Figura 1. Dios de las abejas meliponas Ah-Mucen-Kab (Quezada-Euán *et al.*, 2001)

Un elemento clave para entender el éxito de la meliponicultura prehispánica es la diferencia en los ecosistemas predominantes en ese momento en comparación con la actualidad. En otras áreas de México, la meliponicultura alcanzó un desarrollo más modesto, en comparación con Yucatán, en particular en la sierra de Puebla y Veracruz. Grupos étnicos como los nahuas, totonacas y chontales, de estas regiones mantenían colonias de *Scaptotrigona mexicana*. En estas regiones, la arcilla es un producto muy extendido y que puede ser la razón por la que las colonias de abejas sin aguijón se mantienen en macetas en vez de troncos huecos (Quezada-Euán *et al.*, 2001).

2.1.2 Características

Las abejas sin aguijón o meliponinos se pueden distinguir del resto de los Apidae porque presentan gran reducción de la venación de las alas anteriores, la falta de aguijón, tener uñas simples y por presentar una línea de pelos gruesos a modo de

peine en el margen distal (apical) de las tibias posteriores. *S. mexicana* (**Figura 2**) es fácilmente reconocible por ser la única en México con el integumento completamente negro; presenta una longitud del cuerpo de 5.0-5.3 mm, longitud de ala anterior de 5.1-5.4 mm; carena preoccipital continua sin muesca fuerte a nivel del extremo superior de los ojos; clípeo y área paraocular con integumento liso y brillante con poco punteado (Ayala, 1999).



Figura 2. *Scaptotrigona mexicana* (Mueller et al., 2012)

S. mexicana es denominada en la lengua nahua “*Pisil Nekmej*”, en la lengua totonaca “*Taxka*” y entre los meliponicultores de la huasteca recibe el nombre de *Yakeme* (González-Acereto et al., 2012).

La estructura y localización de los nidos de las meliponas varía de acuerdo con la especie; diversas especies de *Melipona*, *Scaptotrigona* y *Plebeya*, construyen sus nidos en huecos encontrados en troncos y gajos de árboles vivos. El nido de los melipónidos presenta una arquitectura compleja. La entrada al nido de la mayoría de las especies es revestida con resina pegajosa que dificulta el

acceso de hormigas y algunas especies cierran la entrada del nido cuando son atacadas por insectos (Barth, 2006).

2.1.3 Taxonomía

Las abejas sin aguijón fueron inicialmente reunidas en la subfamilia Meliponinae, de Apidae que contenía las tribus Meliponini y Trigonini. La primera con el género *Melipona* y alrededor de 40 especies y la segunda con 22 géneros y más de 200 especies (alrededor de 300 formas nominadas) (Quezada-Euan *et al.*, 2005).

S. mexicana, se ubica para su clasificación taxonómica dentro de la familia *Apidae*, subfamilia *Apinae*, tribu *Meliponini* y del género *Scaptotrigona* (Ayala, 1999; Quezada-Euan *et al.*, 2005). **Figura 3.**

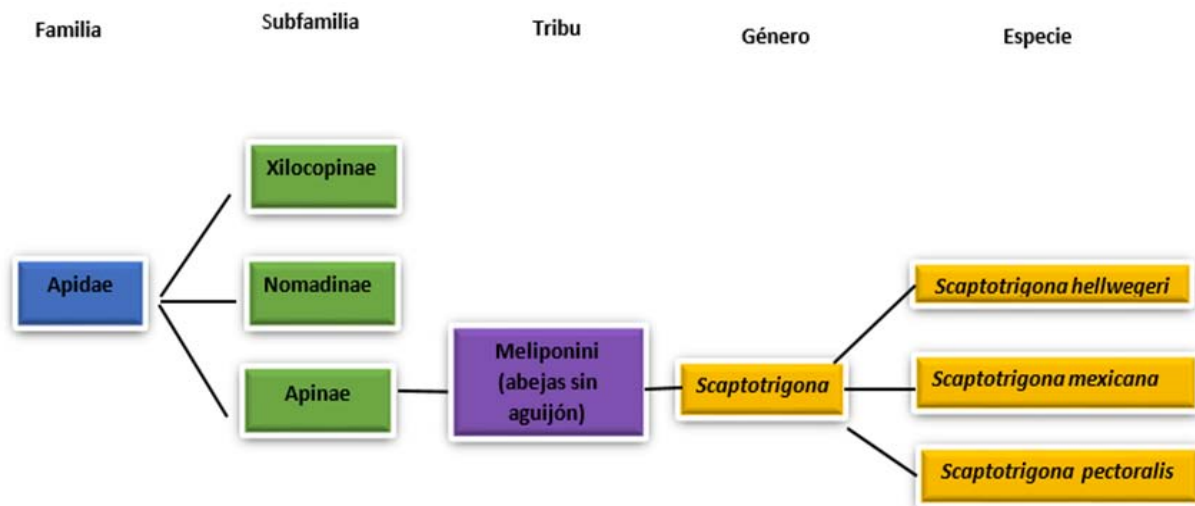


Figura 3. Clasificación taxonómica de *Scaptotrigona mexicana*

2.1.4 Distribución

Las abejas sin aguijón se encuentran extensamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales en el mundo (Reyes-González *et al.*, 2014). En México (**Figura 4**), están presentes 11 géneros y 46 especies de la Tribu *Meliponini* (González-Acereto *et al.*, 2012). Del total de especies, 12 (26% de la fauna) son endémicas de México, 7 (15%) están ampliamente distribuidas en el trópico y subtropico mexicano, 23 (50%) están asociadas al bosque tropical perennifolio y 3 (7%) se presentan únicamente a lo largo de la costa del Pacífico y en la Cuenca del Río Balsas (Ayala, 1999).



Figura 4. Distribución de las abejas sin aguijón en México

En particular, en la región centro-occidental de México una alta diversidad y endemismo de especies de abejas sin aguijón han sido registradas en tres zonas principales: la costa del Pacífico, la zona montañosa de la Sierra Madre del Sur y la cuenca del río Balsas (Reyes-González *et al.*, 2014).

El número de colonias de abejas sin aguijón en las selvas tropicales puede fluctuar entre 10 y 100 por Km², lo que demuestra su importancia numérica en

este tipo de ecosistemas. Muchas especies vegetales dependen de las visitas de los meliponinos para su polinización, siendo por tanto de vital importancia en el mantenimiento de las selvas (Roubik *et al.*, 1989).

S. mexicana se presenta desde Chiapas y por la costa del Golfo de México hasta Tamaulipas, tanto por tierras bajas con bosque tropical perennifolio como en las laderas de las montañas en bosques de pino y mesófilo de montaña, a una altitud que oscila alrededor de los 1000 m. Se presenta también en forma discontinua al sur del Estado de México, en los alrededores de Ixtapan de la Sal y las montañas cercanas a Zihuatanejo en el extremo más oeste de la Sierra Madre del sur en Guerrero (Ayala, 1999).

2.2 Geopropóleo

2.2.1 Definición

El término propóleo deriva del Griego *pro* (“en frente de”, “en la entrada de”) y *polis* (“comunidad” o “ciudad”) y su significado es “en defensa de la colmena”. El propóleo o pegamento de abeja, es un material resinoso marrón recogido por las abejas obreras a partir de los brotes de las hojas de numerosas especies de árboles como el abedul, el álamo, pino, sauce y la palma; también pueden utilizar el material secretado activamente por las plantas de especies como *Turbina corymbosa*, *Spondia tuberosa*, *Psidium guajava*, *Eugenia aquea*, *Eugenia uniflora*, *Talisia esculenta*, *Trifolium repens*, entre otras; utilizando el material lipofílico de las hojas, mucílago, gomas, resinas, celosías, etc. Una vez recolectado este material es enriquecido con secreciones enzimáticas y salivales y lo utilizan las abejas para cubrir las paredes de sus colmenas, rellenar grietas o huecos y embalsamar cadáveres de insectos muertos (Castaldo *et al.*, 2002).

Las abejas sin aguijón generalmente mezclan el material resinoso que recogen de las plantas con cera y tierra y almacenan grandes depósitos de este material llamado geopropóleo dentro de sus colmenas donde se utiliza para cerrar pequeñas grietas, para impedir la entrada de aire y como un agente

antimicrobiano (Liberio *et al.*, 2011). El geopropóleo se considera una importante fuente de compuestos bioactivos (Dutra *et al.*, 2014). Aunque muchas de las actividades farmacológicas de los propóleos ya se han reportado, poco se sabe acerca del geopropóleo, sobre todo en cuanto a su actividad antimicrobiana contra patógenos orales (Liberio *et al.*, 2011).



Figura 5. Geopropóleo producido por abejas de la tribu *Meliponini* (Dutra *et al.*, 2014)

2.2.2 Composición Química

La composición química del geopropóleo depende de la especificidad de la flora local en donde la abeja recoge los exudados. Estudios llevados a cabo en geopropóleos brasileños se han analizado y se ha reportado la presencia de compuestos tales como diterpenos, triterpenos y ácido gálico. Resultó interesante que estas muestras demostraron tener actividad contra *Staphylococcus aureus* y actividad citotóxica. El geopropóleo de *Melipona fasciculada* mostró actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, así como una acción inmunomoduladora, debido al aumento de citoquinas antiinflamatorias (Alves *et al.*, 2013).

Los extractos etanólicos de geopropóleos producidos por *Melipona compressipes* y *Melipona quadrifasciata* han demostrado su actividad antimicrobiana. Recientemente, los geopropóleos de *M. quadrifasciata* han demostrado tener actividad inhibidora contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. El geopropóleo al igual que el propóleo, también ha demostrado tener efectos inhibidores sobre algunos patógenos orales como *S. mutans* y *C. albicans*. Esta actividad inhibidora corresponde a la importancia clínica del geopropóleo sobre estos microorganismos en las enfermedades de cavidad oral (Liberio *et al.*, 2011).

Bankova y colaboradores (1998) realizaron estudios de muestras de geopropóleos brasileños resaltando que todas las muestras analizadas tienen una composición química compleja. El principal grupo identificado fue el de los ácidos carboxílicos alifáticos. También contienen cantidades significativas de ácido láctico, así como ácidos grasos de cadena larga (esteárico, palmítico, mirístico) que normalmente se encuentran en los propóleos. De manera análoga a todas las muestras de propóleos investigados, los geopropóleos contenían compuestos aromáticos: ácidos, aldehídos y alcoholes, aunque eran diferentes en las muestras analizadas y las concentraciones fueron relativamente bajas. Sólo el ácido cinámico fue común en todas las muestras y sorprendentemente el ácido dihidrocínámico, que pareció ser característico de los propóleos brasileños está ausente en los geopropóleos.

En todas las muestras estudiadas hay presencia de ácidos diterpénicos; en una muestra analizada se identificó β -amirina acompañada de otros alcoholes triterpénicos, probablemente isómeros de la amirina. Se identificaron algunos flavonoides, sin embargo, en dos de tres muestras analizadas prácticamente fueron ausentes. En el **Cuadro 1** se muestran los compuestos químicos identificados en geopropóleos brasileños.

Cuadro 1. Compuestos químicos identificados en muestras de geopropóleos brasileños utilizando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Compuestos identificados		Muestras		
		1. <i>Melipona compressipes</i>	2. <i>Tetragona clavipes</i>	3. <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>
Ácidos (alifáticos)	ácido láurico	/	0.1	0.2
	ácido mirístico	0.4	0.7	0.2
	ácido pentadecanoico	/	/	0.9
	ácido palmítico	2.5	3.2	3.8
	ácido palmitoleico	0.8	0.2	1
	ácido margárico	/	0.2	0.4
	ácido esteárico	0.8	0.9	1.4
	ácido oleico	1.8	1.3	1.9
	ácido araquidónico	/	0.2	/
	ácido láctico	0.9	0.7	2.2
Ácidos (aromáticos)	ácido benzoico	/	0.4	0.2
	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.1	0.3	/
	ácido gálico	0.1	/	/
	ácido vainillínico	/	/	0.4

Cuadro 1. Compuestos químicos identificados en muestras de geopropóleos brasileños utilizando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (continuación)

Compuestos identificados		Muestras		
	ácido cinámico	1.2	0.3	0.5
	ácido <i>cis-p</i> -cumarínico	0.8	/	/
	ácido <i>trans-p</i> -cumarínico	3	0.6	/
	ácido dihidroferulónico	/	/	0.1
Fenoles y alcoholes aromáticos	alcohol bencílico	0.1	/	/
	<i>p</i> -vinilfenol	/	0.2	/
	hidroquinona	0.2	/	/
	alcohol <i>p</i> -cumárico	/	/	1.1
	3-(2-hidroxifenil)-propanol	0.2	/	/
	3-(4-hidroxifenil)-propanol	0.3	/	/
Aldehídos aromáticos y cetonas	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	0.2	/	/
	vainillina	/	/	1.2
	coniferilaldehído	/	/	2
	δ <i>P</i> -hidroxiacetofenona	1.7	/	/
Azúcares	glucosa	0.8	/	/
	pentosa	/	0.2	/
Flavonoides	pinobanksina	5.2	/	/
	dihidroximetoxiflavanona	5	/	/

Cuadro 1. Compuestos químicos identificados en muestras de geopropóleos brasileños utilizando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (continuación)

Compuestos identificados		Muestras		
Diterpenos	kaur-16-eno	/	0.6	/
	ácido dehidroabiético	1.4	/	/
Triterpenos	β -amirina	/	2.5	/
	cetona triterpeno	/	3.8	/
Otros	ácido fosfórico	0.9	0.5	1.1
	metil <i>p</i> -cumarato	0.2	/	/
	coumaran (pesticida)	0.1	/	0.2
	benzotiazol (pesticida)	0.3	/	/

Otros estudios demuestran que las benzofenonas han sido identificadas como los principales compuestos del geopropóleo, pero hay ausencia de flavonoides. Estudios recientes de geopropóleos producidos por *M. fasciculata* de diferentes regiones de Brasil han demostrado tener altas concentraciones de polifenoles, triterpenos y saponinas. Este geopropóleo presenta actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *C. albicans* y *S. mutans*, así como presentar propiedades inmunomoduladoras. Los compuestos fenólicos exhiben una amplia variedad de propiedades biológicas tales como: antialérgico, antiaterogénico, antihepatotóxico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antitrombótico, cardioprotector, vasodilatador y actividad antioxidante (Dutra *et al.*, 2014).

En cuanto a la fracción volátil, Pino y colaboradores (2006) realizaron el análisis de muestras de geopropóleo producido por *Melipona beecheii* y propóleo

de *Apis mellifera*, en el Estado de Yucatán, México. Ciento veinte constituyentes fueron separados, 99 identificados del propóleo de *A. mellifera* y 92 compuestos del geopropóleo de abejas sin aguijón. Se estableció que los compuestos característicos de ambas muestras fueron similares; sin embargo, los compuestos que sólo estaban presentes en el propóleo de *A. mellifera* fueron el estireno, fenilacetaldehído, *trans*-sabineno, nonanal, decanal, 2-undecanona, cipereno, *cis*- α -bergamoteno, ar-curcumeno, *cis*-calameneno, cadina-1,4-dieno, α -cadineno, β -eudesmol, α -bisabolol, neril linalol, geranil linalol, óxido de malonilo, pentacosano y heptacosano; mientras que los compuestos que sólo se encontraron en el geopropóleo fueron la santonila trieno, 6-metil-5-hepten-2-ona, α -felandreno, δ -3-careno, *p*-ment-1-eno, *p*-cimeneno, óxido α -pineno, crisantenona, *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol, óxido *cis*-limoneno, éter etil verbenílico, germacreno A y epóxido l-humaleno. Cabe resaltar que los compuestos presentes en ambas muestras son el α -pineno y el *trans*-verbenol, a pesar de que la flora natural que existe en las zonas donde se hizo la recolección de las muestras es similar. En el **Cuadro 2** se muestran los principales compuestos volátiles identificados mediante cromatografía de gases acoplado a masas, del propóleo así como del geopropóleo.

Cuadro 2. Principales compuestos volátiles identificados en muestras de propóleo y geopropóleo del Estado de Yucatán

Compuestos identificados en el geopropóleo	Referencia
α -pineno β -cariofileno espatulenol óxido de cariofileno β -bourboneno β -pineno α -copaeno <i>trans</i> -verbenol	Pino <i>et al.</i> , 2006

Cuadro 2. Principales compuestos volátiles identificados en muestras de propóleo y geopropóleo del Estado de Yucatán (continuación)

Compuestos identificados en el propóleo	Referencia
α -pineno ácido hexadecanoico <i>trans</i> -verbenol	Pino <i>et al.</i> , 2006

En el **Cuadro 3** se muestran los principales componentes volátiles identificados en propóleos de diversas regiones geográficas, obtenidos a partir de diferentes métodos de identificación. Dentro de los compuestos volátiles identificados se encuentran el alcohol bencílico, alcohol cinámico, la vainillina, α -pineno, β -pineno, limoneno, eudesmol, benzoato de bencilo, entre otros (Xu *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la fracción volátil de estos propóleos posee actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas, como *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y contra bacterias Gram negativas, tales como *Klebsiella pneumonia* y contra tres hongos *C. albicans*, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* (Petri *et al.*, 1988).

Cuadro 3. Principales compuestos volátiles identificados del propóleo de diferentes regiones geográficas

Origen Geográfico	Constituyentes Principales	Método de Identificación	Referencia
Turquía	α -terpineno, α -terpineol, junipeno, alcohol cinámico, cariofileno	HS-SPME	Yildirim <i>et al.</i> , 2004; Valadares <i>et al.</i> , 2008; Hames-Kocabas <i>et al.</i> , 2013

HS-SPME microextracción en fase sólida en headspace; HD hidrodestilación; SHS headspace estático; HS headspace; DHS headspace dinámico; SD destilación con vapor; UAE extracción asistida con ultrasonido; MAE extracción asistida con microondas; DE destilación

Cuadro 3. Principales compuestos volátiles identificados del propóleo de diferentes regiones geográficas (continuación)

Origen Geográfico	Constituyentes Principales	Método de Identificación	Referencia
Brasil	propeno, espatulenol, alcohol bencílico, alcohol cinámico, α -pineno, acetofenona, β -linalol, cariofileno	HD	Bankova <i>et al.</i> , 1999; Atungulu <i>et al.</i> , 2007; Sforcin <i>et al.</i> , 2007
Grecia	α -pineno, trans- β -terpineol, junipeno, manool, manoyl oxide	HD	Melliou <i>et al.</i> , 2007
Croacia	Limoneno, alcohol bencílico, benzoato de bencilo	HD	Melliou <i>et.</i> , 2007
Hungría	β -eudesmol, benzoato de bencilo	HD	Petri <i>et al.</i> , 1988
República Checa	ácido benzoico, alcohol bencílico, eugenol	HD	Janas & Bumba, 1974
India	ácido palmítico, linalol, tricosano, metileugenol	HD	Naik <i>et al.</i> , 2013

HS-SPME microextracción en fase sólida en headspace; HD hidrodestilación; SHS headspace estático; HS headspace; DHS headspace dinámico; SD destilación con vapor; UAE extracción asistida con ultrasonido; MAE extracción asistida con microondas; DE destilación

Cuadro 3. Principales compuestos volátiles identificados del propóleo de diferentes regiones geográficas (continuación)

Origen Geográfico	Constituyentes Principales	Método de Identificación	Referencia
Etiopía	acoradieno, epicedrol, calamaneno, 4-terpiol, <i>epi</i> -biciclosesquifelandreno, 5,6,7,8-tetrametilbiciclo-[4,1,0]-hept-4-en-3-ona	HD	Haile <i>et al.</i> , 2012
China	3-metil-2-buten-1-ol, 2-metoxi-4-vinilfenol, alcohol fenietílico	HD	Fu <i>et al.</i> , 2009
Portugal	viridiflorol, <i>n</i> -tricosano, <i>n</i> -nonadecano	HD	Miguel <i>et al.</i> , 2013
Italia	ácido benzoico, β -eudesmol, benzoato de bencilo, α -cadinol, δ -cadineno	HS,HD	Pellati <i>et al.</i> , 2013
Estonia	eucaliptol, α -pineno, β -pineno, benzaldehído	SHS	Kaškonienė <i>et al.</i> , 2014
Uruguay	α -pineno, β -pineno, limoneno	SHS	Kaškonienė <i>et al.</i> , 2014

HS-SPME microextracción en fase sólida en headspace; HD hidrodestilación; SHS headspace estático; HS headspace; DHS headspace dinámico; SD destilación con vapor; UAE extracción asistida con ultrasonido; MAE extracción asistida con microondas; DE destilación

Cuadro 3. Principales compuestos volátiles identificados del propóleo de diferentes regiones geográficas (continuación)

Origen Geográfico	Principales Constituyentes	Método de Identificación	Referencia
China	2-buten-1-ol, acetato de 4-penten-1-ilo, α -longipineno	SHS	Kaškoniene <i>et al.</i> , 2014
Brasil	α -pineno, β -pineno	SHS	Kaškoniene <i>et al.</i> , 2014
Argentina	limoneno, <i>o</i> -cimeno,	HS	Agüero <i>et al.</i> , 2011
Reino Unido	6-metilheptil-5-en-2-ona, benzaldehído, alcohol bencílico	HS	Greenaway <i>et al.</i> , 1989
Italia	α -pineno, D-germacren-4-ol	HS	Pellati <i>et al.</i> , 2013
China	ácido acético, heptadecano, cedreno, fenantreno, alcohol bencílico, 3-metil-3-buten-1-ol	DHS	Fu <i>et al.</i> , 2009; Cheng <i>et al.</i> , 2013
Francia	β -eudesmol, guayol, benzoato de bencilo	Extracción	Clair & Peyron, 1981

HS-SPME microextracción en fase sólida en headspace; HD hidrodestilación; SHS headspace estático; HS headspace; DHS headspace dinámico; SD destilación con vapor; UAE extracción asistida con ultrasonido; MAE extracción asistida con microondas; DE destilación

Cuadro 3. Principales compuestos volátiles identificados del propóleo de diferentes regiones geográficas (continuación)

Origen Geográfico	Principales Constituyentes	Método de Identificación	Referencia
Polonia	guayol, dihidroeudesmol, farnesol	SD	Maciejewicz <i>et al.</i> , 1983
Brasil	Ácido bencenopropanoico, nerolidol	UAE	Huang <i>et al.</i> , 2013
Brasil	longipineno, α -eudesmol, β -eudesmol, β -cariofileno	MAE	Li <i>et al.</i> , 2012

HS-SPME microextracción en fase sólida en headspace; HD hidrodestilación; SHS headspace estático; HS headspace; DHS headspace dinámico; SD destilación con vapor; UAE extracción asistida con ultrasonido; MAE extracción asistida con microondas; DE destilación

2.2.3 Usos en la Medicina Tradicional

El propóleo es un remedio natural que se ha utilizado ampliamente desde la antigüedad. Los egipcios conocían muy bien las propiedades del propóleo para evitar la putrefacción y lo utilizaban para embalsamar sus cadáveres. Fue reconocido por su actividad antiséptica y cicatrizante por los médicos griegos y romanos. Los incas lo empleaban como agente antipirético y en las farmacopeas europeas de Londres del siglo XVII aparece como una droga oficial. En la actualidad se utiliza como un remedio tradicional y se encuentra disponible en el mercado sólo o en combinación con otros productos naturales (Sforcin *et al.*, 2011). Las actividades antibacterianas y antifúngicas son las acciones biológicas más populares y más ampliamente investigadas. Numerosos autores han demostrado estas propiedades utilizando propóleos de diversas regiones geográficas obteniendo diferencias en su composición química, debido a las

diferentes fuentes de obtención del propóleo por parte de las abejas (Kujumgiev *et al.*, 1999).

Por otra parte, en algunos países el geopropóleo se ha utilizado empíricamente por la población para la curación de heridas, para el tratamiento de la gastritis y como un agente antibacteriano (Liberio *et al.*, 2011). El geopropóleo producido por *Scaptotrigona postica* en Brasil es usado extensivamente en la medicina tradicional para curar heridas y tratar tumores. El extracto también se utiliza para el tratamiento de enfermedades respiratorias y algunos procesos inflamatorios (Araújo *et al.*, 2011). Estudios han demostrado que el geopropóleo de la especie *Mellipona scutellaris*, popularmente conocido como “uruçu” y que se encuentra en el noroeste de Brasil, muestra propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias; además de tener actividad antimicrobiana frente a diferentes tipos de bacterias (Franchin *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Ribeiro-Junior y colaboradores (2015) en Brasil, se demostró que el geopropóleo ejerce un efecto gastroprotector en ratas con daño en la mucosa gástrica inducida por etanol; los resultados sugieren que este efecto puede estar relacionado con el mecanismo gastroprotector en el que el óxido nítrico y las prostaglandinas están implicadas. Por otra parte, los estudios sobre el perfil químico revelaron la ausencia de ácidos fenólicos y flavonoides y que comúnmente es encontrado en el propóleo de *Apis mellifera* (Ribeiro-Junior *et al.*, 2015).

2.3 Microextracción en Fase Sólida (SPME)

2.3.1 Generalidades

La Microextracción en Fase Sólida (SPME, Solid Phase Microextraction), fue desarrollada para hacer frente a la necesidad de tecnologías de preparación rápida, sin disolventes y que fuera compatible con muestras complejas (Pawliszyn *et al.*, 2000). Esta técnica fue reportada por primera vez por Pawliszyn en 1990 y actualmente es ampliamente aceptada. Se introdujo para analizar compuestos relativamente volátiles en el ámbito del medio ambiente, pero ahora se ha extendido al análisis de una gran variedad de matrices: gas, líquido y sólido

(Alpendurada *et al.*, 2000). Es una técnica que integra el muestreo, extracción, concentración e introducción de la muestra en un único paso libre de disolvente. Los analitos en la muestra se extraen y concentran directamente en la fibra de extracción (Pawliszyn *et al.*, 2000).

La SPME es un método de extracción que elimina el uso de disolventes orgánicos, permite la cuantificación de un gran número de moléculas, requiere poca manipulación (preparación de la muestra), se acorta considerablemente el tiempo de análisis y es muy simple (Seisonen *et al.*, 2015). La técnica ha demostrado ser rápida y fiable además de que permite el funcionamiento simultáneo de las etapas de extracción y concentración (Castro *et al.*, 2015).

Las aplicaciones de esta técnica incluyen desde el monitoreo ambiental, monitoreo de procesos, análisis de medicamentos, determinación de compuestos volátiles en vinos, cervezas y quesos; hasta el área clínica y forense (Pawliszyn *et al.*, 2000).

El dispositivo SPME es muy simple, consta de una fibra de soporte y de una fibra retráctil de sílice fundida, recubierta de un material adsorbente (polímero como polidimetilsiloxano (PDMS)), que se utiliza convencionalmente como material de recubrimiento en la cromatografía convencional (Vas *et al.*, 2004). Esta película polimérica actúa como una esponja concentrando los analitos orgánicos en su superficie durante la adsorción de la matriz de la muestra. Debido al tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación, al mismo tiempo de que se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa (Kataoka *et al.*, 2000). **Figura 6.**

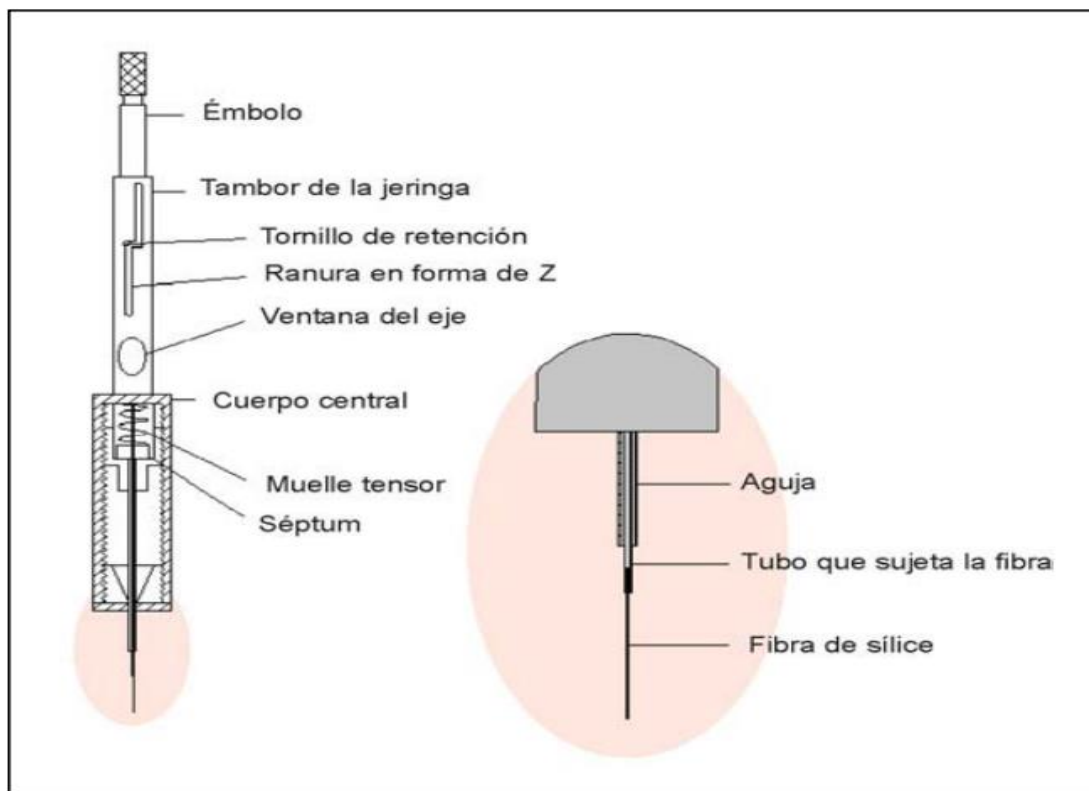


Figura 6. Esquema del dispositivo comercial de SPME (Microextracción en fase sólida)

2.3.2 Fundamento

El principio en el que se basa la SPME es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra (Pauli *et al.*, 2010). El transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra, comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra (Pe. alver-Hernando *et al.*, 2002). A continuación, el analito se desorbe de la fibra a una temperatura alta en un inyector de cromatógrafo de gases y subsecuentemente es analizado por CG (Prosen *et al.*, 1999) o bien puede analizarse mediante HPLC (Alpendurada *et al.*, 2000).

Esencialmente la técnica consta de dos etapas: la adsorción del soluto desde la matriz de una muestra a algún material adsorbente y la transferencia de los analitos en un sistema de cromatografía, ya sea de líquidos o gases (Hinshaw

et al., 2003). El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de adsorción y en el que se confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra, es la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

Donde n son los moles de analito absorbidos por la fibra, V_f es el volumen de la película de la fibra, V_s es el volumen de la disolución que se extrae, K_{fs} es el coeficiente de reparto del soluto entre la película y la disolución; y C_0 es la concentración inicial de la disolución que se extrae ($\mu\text{g/mL}$). La ecuación supone que el volumen de la muestra es mucho mayor que el volumen de la capa de SPME (Harris, 1999; Peñalver- Hernando *et al.*, 2002).

2.3.3 Procedimiento del SPME

En el proceso se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra recubierta del adsorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra (Vas *et al.*, 2004).

a) Extracción

Etapas en donde se produce la migración de los analitos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza el equilibrio; este proceso se puede producir por adsorción o absorción en función del tipo de fibra utilizado. La muestra se coloca en un vial herméticamente cerrado con un septum de silicona-teflón; a continuación se perfora el septum y se introduce la jeringa en el vial. Empujando el embolo se

expone la fibra a la muestra el tiempo previamente establecido; una vez finalizado el tiempo de extracción, se devuelve la fibra al interior de la jeringa (Lord *et al.*, 2000).

Existen tres formas de realizar la extracción en SPME:

1) Extracción Directa

La fibra se sumerge directamente en la muestra y los analitos son transportados desde la matriz de la muestra hacia el recubrimiento de la fibra. Para hacer la extracción más rápida a veces se requiere de un sistema de agitación. Sin embargo, para muestras gaseosas, la convección natural del aire es suficiente para facilitar un equilibrio rápido (Alpendurada *et al.*, 2000). Es útil para poder determinar analitos semivolátiles o poco volátiles; sin embargo, presenta la desventaja que disminuye mucho la vida media de la fibra y dificulta la reproducibilidad de la extracción (Pillonel *et al.*, 2002).

2) Extracción Espacio de Cabeza o Headspace (HS)

Los analitos son transportados a la fibra a través del espacio que existe por encima de la muestra, debido a la presión de vapor de la fase gaseosa a la cual se expone la fibra (Alpendurada *et al.*, 2000). La principal ventaja del análisis HS es que se lleva a cabo con una muestra no tratada y el perfil de los compuestos volátiles aislados están estrechamente asociados con la percepción sensorial (Seisonen *et al.*, 2015). Por ello, es el tipo de extracción más utilizado para analitos volátiles y semivolátiles (Pillonel *et al.*, 2002). En general, se puede decir que el volumen del espacio de cabeza tiene que ser lo más pequeño posible, ya que el rendimiento de la extracción disminuye cuando aumenta el volumen del espacio de cabeza por efecto de la dilución (Yang *et al.*, 1994).

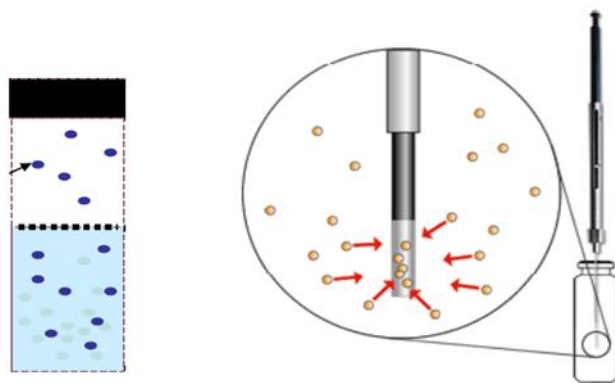


Figura 7. Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa o headspace. Izquierda: Vial para la Microextracción en Fase Sólida donde se puede distinguir la fase gaseosa (headspace), que es el espacio entre la muestra (azul) y el tapón del vial (blanco). Los puntos azules representan los componentes volátiles que difunden de la muestra hacia la fase gaseosa. Derecha: Adsorción de los analitos en el recubrimiento de la fibra.

En general la extracción de los compuestos volátiles se logra mejor cuando la polaridad de la fibra coincide con la polaridad del analito, este principio también se aplica en la cromatografía de gases cuando los analitos polares y no polares requieren de columnas con la misma polaridad para el análisis (Mani *et al.*, 1999).

3) Extracción con Protección de la Membrana

Se utiliza para la extracción de analitos en muestras muy contaminadas. La cinética de extracción de la membrana es más lenta, debido a que los analitos deben difundirse a través de la membrana antes de que puedan alcanzar el recubrimiento. El propósito de la protección de la membrana es proteger la fibra contra daños y de los compuestos de elevado peso molecular. Si el material de la membrana es el apropiado puede facilitar la selectividad del proceso de extracción. Para disminuir el tiempo de extracción se pueden usar membranas delgadas e incrementar la temperatura del proceso (Lord *et al.*, 2000).

b) Desorción

Etapa en donde se liberan los analitos retenidos por la fibra. Con el fin de cuantificar la cantidad de analito extraído de la fibra, SPME puede utilizar diferentes sistemas de instrumentación como CG o HPLC, para lograr una mayor separación y detección (Aranda *et al.*, 2000).

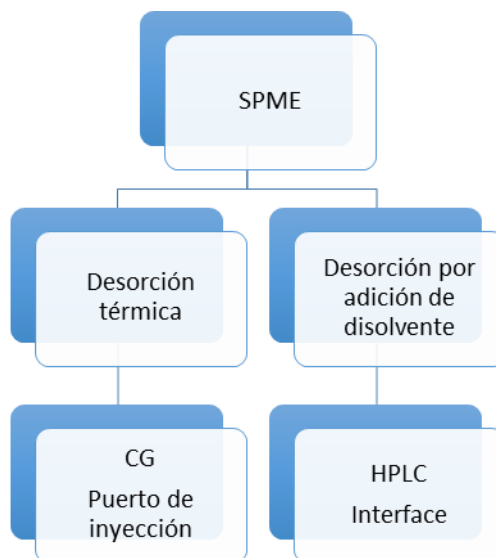


Figura 8. Formas de desorción en SPME

La desorción se puede realizar de dos formas:

1) Desorción Térmica

La desorción térmica es el modo más sencillo de desorber los analitos de la fibra, pero hay compuestos que son térmicamente inestables o poco volátiles y por lo tanto no se pueden determinar directamente mediante CG. Los analitos son desorbidos a una alta temperatura en el puerto de inyección y son analizados mediante cromatografía de gases. Con el fin de obtener una desorción rápida y cuantitativa, la temperatura del inyector debe ser más alta para el analito (Simplício *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2000). Una limitación es la inestabilidad de la fibra a la alta temperatura, por ejemplo la fibra de PDMS comienza a “sangrar” (degradación del polímero de la fase estacionaria) a una temperatura de 200°C (Chong *et al.*, 1997).

2) Por Adición de un Disolvente Orgánico

La desorción se alcanza mediante el uso de disolventes orgánicos. Es un sistema útil para compuestos térmicamente inestables o poco volátiles. Durante el proceso, la afinidad del analito hacia el disolvente debe ser mayor que la afinidad hacia el recubrimiento de la fibra, por lo que la elección del disolvente es de suma importancia. Una desventaja del método es el uso limitado de fibras que son compatibles con los disolventes orgánicos (PDMS/DVB, CW/TR y PA) solamente disponibles para este método (Aranda *et al.*, 2000). Si la técnica se combina con HPLC se utiliza una interfase que permite realizar la desorción con la propia fase móvil o bien introduciendo un disolvente orgánico adecuado en la cámara de la interfase. Así pues, compuestos como tensoactivos alquilfenoletoxilados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), fenoles y algunos ftalatos, como el dietilhexilftalato (DEP) han sido determinados mediante SPME-HPLC (Negrao *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000).

2.3.4 Variables que Afectan y/o Mejoran el Proceso de SPME

Durante el proceso de SPME pueden existir una serie de variables experimentales que pueden influir tanto en el proceso de extracción del analito o bien en la desorción del mismo; sin embargo, estas variables pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso.

a) Etapa de Extracción

Los parámetros que pueden afectar de alguna u otra forma el proceso de absorción/adsorción son: el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación de la muestra, el volumen de muestra así como las condiciones de la muestra (pH, adición de sales o disolventes orgánicos). El tiempo de extracción es determinado principalmente por la velocidad de agitación y el coeficiente de partición de la sustancia analizada entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra (Kataoka *et al.*, 2000). La temperatura de extracción contribuye a que los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumenten al incrementar la temperatura, por lo que la cantidad de analito extraído aumenta. En HS-SPME,

además, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza por lo que la extracción es también más rápida (Peñalver-Hernado *et al.*, 2002). La agitación acelera la transferencia del analito a partir de la matriz de la muestra a la fibra. La eficiencia de la extracción también se ve mejorada mediante la adición de sales solubles tales como cloruro de sodio, carbonato de potasio o sulfato de amonio a la muestra; en principio, la sobresaturación de la muestra con sales es más efectivo para la extracción de los analitos, debido al efecto salting-out, debido a que aumenta el coeficiente de distribución de los analitos que están en forma no ionizada por lo que la cantidad de analito extraído generalmente aumenta (Pawliszyn *et al.*, 1997). La forma de los analitos presente en la muestra depende principalmente del pH de la matriz en relación con el analito y su influencia en la extracción, ya que los analitos deben estar siempre presentes en la muestra en su forma neutra para su extracción (Cuevas-Glory *et al.*, 2007).

b) Etapa de Desorción

Los parámetros que afectan la etapa de desorción dependen del tipo de desorción utilizado (térmica o por adición de disolvente orgánico). Si ésta se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases, los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción. La temperatura se recomienda fijarla a la máxima temperatura de uso de la fibra recomendada por el fabricante y el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no haya efecto memoria. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos (Eisert *et al.*, 1997; Pawliszyn *et al.*, 1997). Cuando la desorción se realiza mediante el uso de un disolvente orgánico y fuera de línea con el cromatógrafo de líquidos (Popp *et al.*, 2000; Sarrión *et al.*, 2002), los parámetros a optimizar son el tipo de disolvente orgánico (que debe ser compatible con la fibra y con la técnica analítica posterior) y el volumen de disolvente. En general, debe utilizarse el menor volumen de disolvente orgánico posible sin que se produzca efecto

memoria de forma que el factor de pre-concentración sea mayor (Pawliszyn *et al.*, 1997).

2.4 Tipos de Fibras Utilizadas en SPME

En la actualidad existen fibras con diferentes recubrimientos de manera que la SPME puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos. Polidimetilsiloxano (PDMS) y Poliacrilato (PA) fueron los primeros recubrimientos comercializados, pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones. Generalmente, la naturaleza del analito determina la fibra a utilizar en cada caso. En general, se utilizan recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para analitos polares como fenoles y recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares como PAHs (Pawliszyn *et al.*, 1997; Pawliszyn *et al.*, 2000).

Las fibras de PDMS, que es un polímero líquido, son las más utilizadas ya que fueron las primeras fibras introducidas para SPME. Estas fibras son las más adecuadas para los analitos apolares. La afinidad de los analitos por el PDMS puede ser estimada a partir de los tiempos de retención de los compuestos en las columnas de PDMS ya que el polímero que compone las fibras y estas columnas capilares es básicamente el mismo. La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción, aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunos analitos pueden realizarse vía adsorción ya que existe una cierta competitividad entre ambos efectos (**Figura 9**) (Pawliszyn *et al.*, 1997).

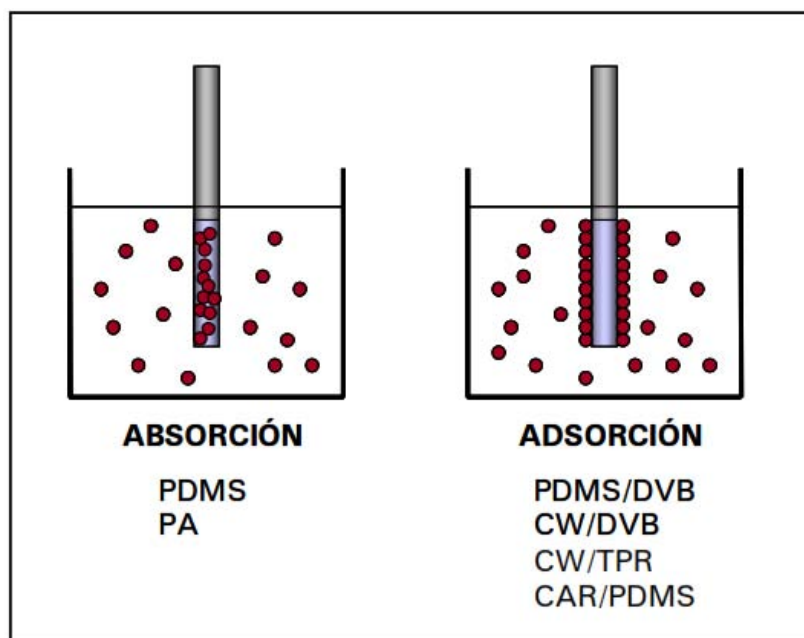


Figura 9. Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se realiza por absorción o adsorción

Las fibras de PA son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos por la fibra al igual que en las fibras de PDMS. Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que poseen los analitos en las fibras de PDMS por lo que en general los tiempos de extracción son mayores para los compuestos volátiles en el espacio de cabeza (Pawliszyn *et al.*, 1997).

Las fibras en las que se combina más de un polímero (PDMS/DVB o CW/DVB), son más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que son polímeros sólidos y en general en este tipo de fibras, los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan las fibras de PDMS (Arthur *et al.*, 1990; Pawliszyn *et al.*, 1997).

2.5 Aplicaciones de SPME

2.5.1 Aplicaciones Ambientales

Desde su invención SPME se ha evidenciado por el creciente número de trabajos publicados. A principios de su desarrollo, la mayoría de las aplicaciones estaban enfocados en la química ambiental; parcialmente se han ido estudiado compuestos orgánicos, pesticidas, herbicidas y otros compuestos biológicamente activos en muestras acuosas. Para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles en muestras sólidas (suelos con sedimento y lodo), a menudo se ha utilizado HS-SPME. Hasta el momento, HS-SPME se ha utilizado para determinar compuestos aromáticos y PAH's en matrices de arena y arcilla; compuestos orgánicos volátiles en suelos de basureros; compuestos organometálicos en sedimentos del suelo; mercurio inorgánico en muestras del suelo y plasma. También se ha utilizado para la determinación de odorantes como clorobenzenos y nitrobenzenos, cloroanilinas y nitroanilinas en una amplia variedad de suelos. Generalmente, la sensibilidad del procedimiento de HS-SPME se puede mejorar, manipulando la matriz (adición de acetona-agua) u optimizando las condiciones de la extracción (tipo de material del recubrimiento de la fibra, temperatura, tiempo de extracción) (Vas *et al.*, 2004).

2.5.2 Aplicaciones en la Química de los Alimentos

El análisis de alimentos es importante para la evaluación del valor nutricional, para el control de calidad de los productos frescos y procesados; y el seguimiento de los aditivos alimentarios y otros contaminantes tóxicos. En general, el sabor es sensible a una alteración composicional. En el caso de los alimentos (frutas, vinos, etc.) los compuestos aromáticos volátiles se producen a través de vías metabólicas durante la maduración, cosecha, post-cosecha y el almacenamiento, y su producción depende de muchos factores relacionados con la especie, variedad y tipos de tratamientos tecnológicos aplicados. Por lo tanto, es indispensable conocer el patrón cromatográfico de un determinado producto alimenticio (fruta fresca, muestra autentica de vino, etc.) y el patrón modificado

durante el procesamiento o almacenamiento con el fin de identificar los cambios en la composición volátil (Vas *et al.*, 1998).

2.5.3 Aplicaciones en Fluidos Biológicos

La preparación de la muestra es uno de los pasos más críticos en el análisis de fluidos biológicos y compuestos en matrices biológicas. La orina es un fluido biológico relativamente simple para recoger y se utiliza con frecuencia para la detección de drogas, en la medicina forense, monitoreo de sustancias químicas y otras investigaciones, ya que contiene los analitos diana junto con los metabolitos de diagnóstico. Las primeras aplicaciones se centraron en compuestos muy volátiles tales como el etanol y disolventes en orina. Hoy en día una gran variedad de drogas (anfetaminas, antihistamínicos, antidepresivos tricíclicos, corticoesteroides, entre otros) son identificados mediante HS-SPME, ya que es adecuado para la medición de estas drogas y la preparación de la muestra es muy sencilla (Yashiki *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2001).

2.5.4 Otras Aplicaciones

a. Análisis del Cabello

Este tipo de análisis se utiliza con frecuencia para el monitoreo a largo plazo de personas que consumen drogas y alcohol. HS-SPME ofrece la ventaja de producir un extracto de alta pureza sin interferencias. Es un método conveniente de un solo paso para la medición de fármacos lipófilicos como la nicotina, las anfetaminas y compuestos relacionados como anestésicos locales como la fenciclidina, la ketamina, metadona, antidepresivos y fenotiazidas (Wennig *et al.*, 2000).

b. Análisis de Metabolitos Volátiles en el Aliento

El muestreo no invasivo y el análisis químico de los gases respiratorios podría proporcionar información valiosa relacionada con la salud; además de ser una herramienta para el diagnóstico de enfermedades. Los gases respiratorios son indicadores del final de una ruta metabólica. Además, el análisis de los gases de la respiración es relativamente sencillo ya que la matriz es menos compleja que en el

caso de la orina o la sangre. Sin embargo, a pesar de estas ventajas y de los buenos resultados obtenidos, el análisis del aire exhalado no se utiliza con frecuencia, probablemente debido a la falta de un sistema de muestreo estandarizado, el cual hace difícil la interpretación (Boyle *et al.*, 2002). HS-SPME también se puede aplicar para la extracción de metabolitos volátiles emitidos por diferentes microorganismos (algas, hongos, bacterias, etc.) (Jelen *et al.*, 2003). Sin embargo, es interesante resaltar que alrededor del 90% de los compuestos volátiles del aroma del vino y la cerveza también son producto del metabolismo de diferentes levaduras (Begala *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido a que muchos patógenos han desarrollado resistencia a los antibióticos y estos últimos pueden causar efectos secundarios en los seres humanos, existe una creciente necesidad de buscar nuevos agentes antimicrobianos. Mezclas naturales, como los geopropóleos que debido a sus componentes químicos y sus propiedades farmacológicamente activas, se han utilizado ampliamente en la medicina popular para el tratamiento de alguna afección.

El uso del geopropóleo en la medicina tradicional es amplio, pues se utiliza en el tratamiento de diversas patologías como en la curación de heridas, como agente antibacteriano, en enfermedades respiratorias, entre otros; sin embargo, al ser un producto natural variable debido a las fuentes botánicas, el origen geográfico y las especies de abejas que lo recolectan en las diferentes regiones tropicales, resulta una tarea difícil estandarizarlo. Por otra parte, el estudio de la composición química del geopropóleo, así como de su fracción volátil, ha sido relativamente escasa en comparación con el propóleo.

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo principal del presente proyecto de investigación consiste en determinar los compuestos volátiles de una muestra de geopropóleo producida por las abejas *Scaptotrigona mexicana* recolectada en el Estado de Veracruz. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos generales:

- Realizar la búsqueda bibliográfica en diferentes publicaciones sobre geopropóleos.
- Utilizar las condiciones óptimas de extracción reportadas en trabajos previos para la muestra de geopropóleo utilizando la técnica MEFS-EC-CG-EM-TV (HS-SPME-GC-MS-TOF).

— Determinación de los componentes volátiles del geopropóleo de *Scaptotrigona mexicana* —

- Realizar la determinación de los componentes volátiles del geopropóleo utilizando la técnica MEFS-EC-CG-EM-TV (HS-SPME-GC-MS-TOF).
- Realizar la identificación de los componentes presentes en la muestra mediante el análisis de sus espectros de masas, el uso de estándares y la determinación de sus índices de Kovats.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material Vegetal

La muestra de geopropóleo producida por la abeja *Scaptotrigona mexicana* fue recolectada manualmente en el mes de julio del 2011 en Coatepec, Veracruz, México. La recolección estuvo a cargo del MVZ. Ángel López Ramírez del Departamento de Conejos, Abejas y Especies Pequeñas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

4.2 Microextracción en Fase Sólida

Para realizar la microextracción se empleó la fibra de Divinilbencen-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 2 cm 50/30 μm); la cual fue activada siguiendo las instrucciones del fabricante (Supelco). Previo a cada proceso de microextracción se realizó una corrida blanco. Posteriormente, para realizar cada microextracción se emplearon aproximadamente 5 g de la muestra de geopropóleo, 5 mL de agua y 20 mg de NaCl, los cuales fueron colocados en un vial de 40 mL con septum de politetrafluoroetileno (PTFE). El vial cerrado herméticamente fue sometido a agitación, a una temperatura de entre 45-50°C y la fibra elegida se expuso en el espacio de la cabeza del vial para la adsorción de los analitos durante 90 minutos. Después de ello, se retiró la fibra del vial para introducirla dentro del inyector del cromatógrafo por 3 minutos para su desorción y análisis. Este proceso se realizó por triplicado.

4.3 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

Para la realización del análisis se empleó el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo (TOF), marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5%fenil-polimetilsiloxano) con dimensiones de 10 m \times 0.18 mm \times 0.18 μm . La temperatura del inyector se mantuvo a 300°C; utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó a 40°C (durante 1 minuto) y se incrementó a 20°C/min hasta los 300°C durante 5 minutos. Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo

de inyección “split” (división de flujo) 1:20. En el **Cuadro 4** se muestran las condiciones de análisis.

Cuadro 4. Condiciones de análisis

Técnica de preparación de la muestra	Microextracción en Fase Sólida en la Fase Gaseosa (HS-SPME)
Microfibra utilizada	2 cm 50/30 µm DVB/CAR/PDMS Marca Supleco Lote P340030 No. Cat. 573-48-U
Tiempo de exposición de la fibra	90 minutos
Temperatura de la muestra	45-50 °C (baño de agua)
Posición de la fibra en la extracción	En fase gaseosa (Headspace)
Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos
Marca y modelo del equipo	LECO Pegasus 4D
Técnica analítica	CG-EM-TOF
Temperatura del inyector	300 °C
Cromatógrafo de gases	Agilent 6890N
Columna capilar (fase)	DB5 10 m x 0,18 mm di x 0,18 µm
Programación de la temperatura del horno	40°C (1 minuto), 20°C/minuto hasta 300°C (5 minutos)
Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
Marca y modelo del equipo	LECO Pegasus 4D
Flujo del gas acarreador	1mL/minuto
Temperatura de la línea de transferencia	250 °C

Cuadro 4. Condiciones de análisis (continuación)

Técnica de preparación de la muestra	Microextracción en Fase Sólida en la Fase Gaseosa (HS-SPME)
Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)
Adquisición espectral	20 espectros/segundo
Retraso/encendido del filamento	0 minutos
Intervalo masas	33-400 u
Temperatura de la cámara de ionización	200 °C
Compuesto de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)

En el espectrómetro de masas se utilizó ionización electrónica a 70eV, la temperatura de la cámara de ionización fue de 200°C y de la línea de transferencia, 250°C. Se programó una velocidad espectral de 20 espectros/seg. El barrido de masas fue de 33-400 u (unidad de masa atómica).

4.4 Identificación de los Compuestos Volátiles

La identificación de los compuestos volátiles se realizó por medio de la comparación de sus espectros de masas obtenidos con los encontrados en la base de datos NIST (National Institute of Standards Technology). Por otra parte, se implementó la metodología de Kovats para determinar los índices con los descritos en la biblioteca NIST y en Adams (2007).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de los componentes volátiles es un asunto delicado ya que la extracción y concentración de los compuestos antes de su análisis depende de la eficacia del método de extracción utilizado. Recientemente varios métodos analíticos basados en técnicas cromatográficas, como el HPLC, el TLC y MS-EASI han sido utilizados para determinar tanto el origen geográfico, así como los componentes volátiles de los propóleos (Zhou *et al.*, 2008; Sawaya *et al.*, 2010). Sin embargo, estos métodos analíticos presentan algunos inconvenientes (gran cantidad de tiempo y la mayor parte del tiempo se gasta en el muestreo y en los pasos siguientes como la extracción, concentración, fraccionamiento y aislamiento de los analitos). Otra desventaja de estos métodos es que no se puede utilizar muestras íntegras (Cheng *et al.*, 2013).

Debido a esto la microextracción representa una técnica rápida en cuanto al procesamiento de la muestra que hacen posible desarrollar el análisis en el laboratorio en un lapso de tiempo relativamente corto. SPME-HS resulta aún más conveniente para trabajar con compuestos volátiles a partir de matrices de alta complejidad (alimentos), ya que los analitos difunden a partir de la matriz en el aire y luego desde el aire hacia el recubrimiento de la fibra. Entre las ventajas de este sistema es que el análisis de toda una gama de compuestos puede llevarse a cabo con una sola inyección, el ahorro de tiempo, el cero uso de disolvente y sin la pérdida de analitos que debido a la temperatura conlleva un proceso de extracción (Pillonel *et al.*, 2001).

Los compuestos identificados que predominan en las muestras analizadas son los terpenos, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos (desde el acético hasta el ácido esteárico), alcanos acompañados de bencenos aromáticos y naftaleno (Bankova *et al.*, 1994). Recientemente, se ha reportado que los compuestos encontrados en la fracción volátil como el alcohol bencílico, acetato de bencilo, alcohol cinámico, vainillina, eudesmol, benzoato de ciclohexilo y

benzoato de bencilo son los responsables de las propiedades biológicas (Xu *et al.*, 2009).

La primera fase del estudio consistió en obtener las condiciones óptimas para llevar a cabo el análisis de la muestra de geopropóleo. En esta fase se realizaron pruebas para determinar la temperatura y el tiempo de extracción óptimos.

Los compuestos volátiles del geopropóleo se determinaron utilizando HS-SPME-GC-MS-TOF utilizando una fibra gris (DVB/CAR/PDMS). Se utilizó la cromatografía de gases (CG) acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM), ya que es la herramienta de separación e identificación de analitos volátiles más adecuada y por ende la más utilizada para el análisis de aceites esenciales y compuestos volátiles de manera confiable.

Un total de 64 compuestos fueron separados a partir de la muestra del geopropóleo de *S. mexicana* (**Cuadro 5**). Los compuestos mayoritarios presentes en la muestra fueron: compuestos aromáticos como el estireno (7.9955%); terpenos como (*Z*)-ocimenona (6.8223%), α -pineno (5.4532%), *m*-cimeno (4.1247%), *trans*-pulegol (3.7478%), *m*-cimeno (3.6674%), verbanol (3.5145%), verbenona (3.2880%), limoneno (2.9254%), *p*-cimeno (2.7573%), tujona (2.7366%), α -fencheno (2.7132%), *trans*-verbenol (2.6964%), canfeno (2.6914%), *trans*-pinocanfona (2.4888%), dihidrocarveol (2.4647%), *trans*-isocarveol (1.4891%), *cis*-crisantenol (1.1462%); aldehídos como el *trans*-3-fenilpropanal (3.9908%), 2-octenal (1.8691%) y octanal (1.6912%); cetonas como la 2-decanona (3.4417%); ácidos grasos como el ácido octanoico (2.6964%); e hidrocarburos como el 2,6-dimetil-octa-2,4,6-trieno (1.0715%).

Cuadro 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Scaptotrigona mexicana*

Pico	Nombre	Área	T.R. (s)	Ik _E	Ik _T	Método Ident.	Peso	Fórmula
1	hexanal	0.6327	105.459	804	805	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
2	estireno	7.9955	205.459	900	895	EM/IR	104	C ₈ H ₈
3	2-decanona	3.4417	207.409	902		EM	156	C ₁₀ H ₂₀ O
4	heptanal	0.0252	218.959	915	902	EM/IR	114	C ₇ H ₁₄ O
5	α-pineno	5.4532	241.659	941	939	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
6	α-fencheno	2.7132	255.759	956	952	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
7	canfeno	2.6914	256.059	957	954	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
8	artemisol	0.6384	259.859	961	970	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
9	ter-butilbenceno	0.2684	288.609	993	992	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
10	(1-metilpropil)-benceno	0.2374	299.409	1009	1009	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
11	octanal	1.6912	301.759	1014	1012	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
12	α-terpineno	0.0477	307.159	1024	1017	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
13	o-cimeno	0.2484	308.659	1026	1026	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
14	m-cimeno	4.1247	314.059	1036	1037	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
15	limoneno	2.9254	316.159	1040	1039	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
16	alcohol santonila	0.3225	317.359	1042	1040	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
17	trans-ocimeno	0.0743	320.459	1048	1050	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
18	3-metilfenol	0.0594	331.709	1069	1070	EM/IR	108	C ₇ H ₈ O
19	4-metil-1-(1-metiletetil)-ciclohexeno	0.2916	332.459	1070	1072	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
20	2-octenal	0.4389	335.859	1076	1072	EM/IR	126	C ₈ H ₁₄ O
21	4-metibenzaldehido	0.5831	340.509	1085	1081	EM/IR	120	C ₈ H ₈ O

Cuadro 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Scaptotrigona mexicana* (continuación)

Pico	Nombre	Área	T.R. (s)	I _{K_E}	I _{K_T}	Método Ident.	Peso	Fórmula
22	ác. 7-hidroxi-6-metil-oct-3-oico	2.0773	341.209	1086		EM	172	C ₉ H ₁₆ O ₃
23	3,3,6-trimetil-1,5-heptadien-4-ol	0.4561	342.259	1088	1092	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
24	<i>p</i> -cimeno	2.7573	352.359	1107	1091	EM/IR	132	C ₁₀ H ₁₂
25	tujona	2.7366	352.509	1107	1102	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
26	2-nonanona	0.5489	353.159	1108		EM	142	C ₉ H ₁₈ O
27	1,2,4,5-tetrametil-benceno	0.4596	355.209	1112	1114	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
28	4-(1-metiletil)-ciclohexanol	0.442	360.659	1122	1126	EM/IR	142	C ₉ H ₁₈ O
29	2,6-dimetil-octa-2,4,6-trieno	1.0715	372.059	1143	1144	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
30	ácido octanoico	2.6964	372.459	1144		EM	144	C ₈ H ₁₆ O ₂
31	<i>trans</i> -vervenol	2.6964	372.709	1144	1144	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
32	<i>trans</i> -pinocanfona	2.4888	381.059	1160	1162	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
33	<i>cis</i> -crisantenol	1.1462	382.559	1163	1164	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
34	2-octenal	1.8691	389.859	1176	1172	EM/IR	126	C ₈ H ₁₄ O
35	<i>m</i> -cimenol	3.6674	391.009	1178	1179	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
36	<i>trans</i> -isocarveol	1.4891	396.909	1189	1189	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
37	dihidrocarveol	2.4647	398.859	1193	1193	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
38	verbanol	3.5145	401.359	1197	1197	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
39	verbenona	3.288	407.459	1211	1205	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
40	<i>trans</i> -pulegol	3.7478	410.609	1218	1214	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
41	β -ciclocitral	0.6282	411.559	1220	1219	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
42	(<i>Z</i>)-ocimenona	6.8263	416.259	1231	1229	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
43	neral	0.6852	419.909	1240	1238	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
44	(<i>Z</i>)-anetol	0.056	428.559	1260	1252	EM/IR	148	C ₁₀ H ₁₂ O
45	D-carvona	0.5404	429.359	1261		EM	150	C ₁₀ H ₁₄ O
46	α -citral	0.1423	433.709	1271	1267	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O

Cuadro 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Scaptotrigona mexicana* (continuación)

Pico	Nombre	Área	T.R. (s)	I _{KE}	I _{KT}	Método Ident.	Peso	Fórmula
47	geraniol	0.0672	439.009	1283	1277	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
48	<i>trans</i> -3-fenilpropanal	3.9908	445.759	1299		EM	132	C ₉ H ₈ O
49	1-fenil-1-pentanona	0.0716	451.859	1313		EM	162	C ₁₁ H ₁₄ O
50	timol	0.23	456.209	1324	1324	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
51	α -logipineno	0.1418	470.009	1355	1352	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
52	dihydro carveol acetate <neoiso->	0.0323	470.509	1357	1359	EM/IR	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
53	silphiperfolene	0.2514	479.159	1377	1379	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
54	modhefeno	0.2254	482.009	1383	1383	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
55	β -bourboneno	0.4063	485.509	1391	1388	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
56	1,4-dimetil-naftaleno	0.3604	499.859	1428	1436	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
57	1,5-cis-aromadendr-9-eno	0.1444	522.559	1489	1484	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
58	α -muroleno	0.3707	526.659	1500	1499	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
59	β -bisaboleno	0.5119	529.659	1508	1509	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
60	δ -cadineno	0.2227	535.409	1524	1524	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
61	<i>trans</i> -dauca-4(11),8-dieno	0.2925	537.059	1528	1529	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
62	guaia-6,9-dien-4 β -ol	0.0822	549.409	1561	1565	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O
63	epoxido de β -funebreno	0.5214	560.459	1591	1591	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O
64	kusinol	0.2332	571.409	1624	1674	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O

En el análisis de los compuestos volátiles por CG-EM se utilizaron métodos combinados que incluyen el cálculo de índices de retención (IR), el análisis de los espectros de masas y la inyección de compuestos estándares.

En la identificación de los compuestos volátiles basada en la metodología de Kovats se utilizaron como estándares externos una mezcla de hidrocarburos constituida por una serie homóloga de *n*-alcanos (C-8 a C-24); el proceso de elución se realizó utilizando las mismas condiciones cromatográficas que para las muestras.

Los índices de Kovats fueron calculados de manera automática por el software del equipo utilizado el siguiente algoritmo:

$$I = \left(\frac{t_r(\text{desconocido}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right) * 100z + 100n$$

dónde:

I = Índice de Kovats, *n* = número de átomos de carbono del alcano más corto, *N* = número de átomos de carbono en el alcano más largo, *z* = diferencia del número de átomos de carbono entre el alcano más corto y el más largo, *t_r* = tiempo de retención (Baquero-Quirós, 2006).

La comparación de los espectros de masas se realizó utilizando la base de datos que se incluye en el programa del equipo (Software ChromaTOF). Se realiza considerando el espectro obtenido y el incluido en la base de datos NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología).

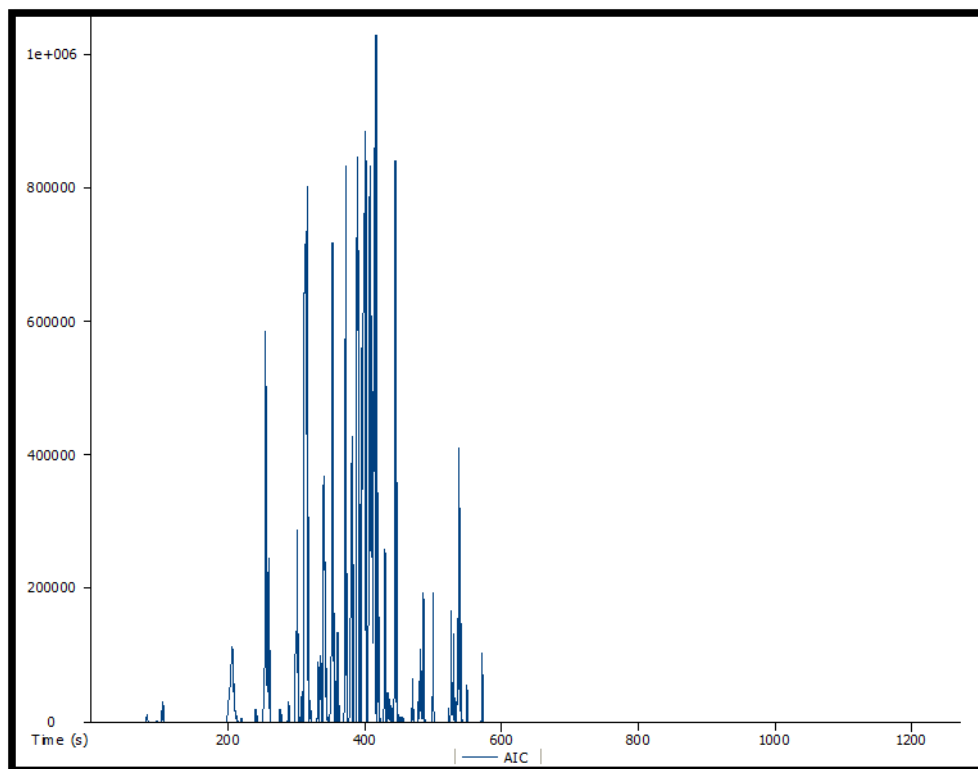


Figura 10. Cromatograma del geopropóleo producido por *Scaptotrigona mexicana*

Cabe destacar que uno de los compuestos mayoritarios del geopropóleo es el estireno (7.9955 %). Este resultado puede estar relacionado con el tipo de vegetación que existe en la región. La flora natural en la zona de Coatepec está compuesta principalmente por vegetación del bosque mesófilo de montaña, en donde destacan especies como el alamillo (*Populus tremula*), palo de baqueta (*Ulmus mexicana*), palo barranco (*Mirandaceltis monoica*), álamo (*Populus mexicana*), cedro (*Cedrela odorata*) y ocozote (*Liquidambar styraciflua*). Además, se ha reportado previamente la presencia de estireno en las resinas producidas por árboles del género *Liquidambar* (Yeon-Suk *et al.*, 2009), lo que podría explicar la presencia y abundancia de este compuesto en la muestra estudiada.

Los usos tradicionales que se le han dado al ocozote (*Liquidambar styraciflua*) varían; como astringente, para las caries, para proteger la piel contra la picadura de insectos, para sanar heridas, para dolores de estómago, facilitando la digestión, en la dermatosis, ictericia entre otros (Biblioteca Digital de la Medicina

Tradicional Mexicana). El bálsamo que emana del tronco se conoce en el mercado con el nombre de estoraque americano y se le atribuyen propiedades sudoríficas, estimulantes, estomáticas, diuréticas, y antigonorreicas. Este bálsamo se utiliza como incienso, como aromatizante del tabaco; en medicina como desinfectante, expectorante y para la elaboración de ungüentos. Con la corteza se prepara un jarabe que se usa en medicina doméstica para el tratamiento de diarrea y disentería en los niños (CONABIO, 2016). Estudios realizados demuestran que las resinas producidas por *Liquidambar orientalis*, son buenos antisépticos, expectorantes, y para el tratamiento de algunas enfermedades de la piel (Fernandez *et al.*, 2005).

Otros compuestos que se han detectado en el aceite esencial de las hojas del *Liquidambar* son los terpenos como α -pineno, limoneno, *p*-cimeno y el canfeno (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana). Estos terpenos presentan actividades biológicas como descongestionantes, antitumorales, hepatoprotectores y antimicrobianas (Griffin *et al.*, 1999). Particularmente, el α -pineno y limoneno, tienen actividad antimicrobiana y de acuerdo a estudios realizados, mostraron tener efectos estructurales y funcionales sobre las membranas de bacterias, permeabilizándolas y generando que se hinchen; en consecuencia se inhiben enzimas respiratorias y se genera una disipación del gradiente de pH y del potencial eléctrico (Sikkema *et al.*, 1995).

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se utilizaron las condiciones de análisis reportadas del método analítico para la extracción, separación, concentración y análisis de los compuestos volátiles de la muestra de geopropóleo, utilizando la técnica acoplada de FG-MEFS-CG-EM-TV, por sus siglas en español (HS-SPME-GC-MS-TOF, por sus siglas en inglés) y la posterior implementación de la metodología de Kovats para realizar la identificación de los compuestos.

- ✓ El análisis de la muestra de geopropóleo producida por *Scaptotrigona mexicana* recolectada en el Estado de Veracruz utilizando la técnica acoplada de HS-SPME-GC-MS-TOF permitió identificar 64 compuestos volátiles en 10 minutos, que es el tiempo en el que se obtiene el cromatograma.

- ✓ Esta técnica demostró ser un método útil para la caracterización de compuestos volátiles del geopropóleo ya que es una metodología simple, la cual requiere de una etapa de extracción, utiliza poca cantidad de muestra, no emplea disolventes y es de fácil manipulación.

7. PERSPECTIVAS

- Efectuar el estudio de la fracción no volátil del geopropóleo de *S. mexicana*, con el objetivo de aislar y purificar los compuestos presentes.
- Evaluar los componentes mayoritarios del geopropóleo de *S. mexicana* para determinar su efecto contra posibles patógenos orales.
- Ampliar el análisis de muestras de geopropóleos de diferentes regiones de México con la finalidad de determinar la composición volátil y poder realizar una comparación entre las muestras.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Adams, R. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Ed. Biology Department. Baylor University.
- ❖ Adorjan, B. & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr. J.*, Vol. 25, pp. 407-426.
- ❖ Agüero M., Svetaz L., Sánchez M., Luna L., Lima B., López M., Zacchino S., Palermo J., Wunderlin D., Feresin G., Tapia A. (2011). Argentinean andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nítida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1970-1978.
- ❖ Alpendurada, M.F. (2000) Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. 889: 3-14.
- ❖ Alves de Souza, S. & Armorim C., (2013). Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Janadaíra) Bees. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Vol. 2013, Article ID 801383.
- ❖ Aranda, R., Kruus, P., Burk, R.C. (2000). Assessment of polycrystalline graphites as sorbents for solid-phase microextraction of nonionic surfactants. *Journal of Chromatography A*. 888: 35-41.
- ❖ Araújo, M.J., Mattar, N.S., Reis, A.S., Serra, I.C., Fialho, E.M., Assunção, A.K., Dutra, R.P., Nogueira, A.M., Libério, S.A., Guerra, R.N., Lopes, A.S., Ribeiro, M.N., Nascimento, F.R., (2011). Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*

25, 1037-1046.

- ❖ Arthur, C.L., Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*. 62: 2145-2148.
- ❖ Atungulu G, Miura M, Atungulu E, Satou Y, Suzuki K (2007). Activity of gaseous phase steam distilled propolis extracts on peroxidation and hydrolysis of rice lipids. *Journal of Food Engineering*, 80(3): 850–858
- ❖ Ayala, R., (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenóptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entom. Mex.* 106, 1-123.
- ❖ Bankova V., Christov R., Popov S., Marcucci MC., Tsvetkova L., Kujumgiev A. (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70: 190-193.
- ❖ Bankova V., Christov R., Popov S., Pureb O., Bocari G. (1994). Volatile constituents of propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 49: 6-10.
- ❖ Bankova, V., (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 114-117.
- ❖ Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M., Popov, S. (1995). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. *Z. Naturforsch.* 50 c, 167-172.
- ❖ Bankova, V., Christov, R., Marcucci C., Popov, S. (1998). Constituents of Brazilian Geopropolis. *Z. Naturforsch.* 53 c, 402-406.
- ❖ Barquero-Quirós, M., (2006). Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. 1a Edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica, 28-30.
- ❖ 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* 41, 71–85.

- ❖ Begala, M., Corda, L., Podda, G., Fedrigo, M., Traldi, P. (2002). Headspace solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry in the analysis of the aroma constituents of “Cannonau of Jerzu” wine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16: 1086-1091.
- ❖ Boyle, R., McLean, S., Brandon, S., Pass, G., Davies, N. (2002). Application of solid-phase microextraction to the quantitative analysis of 1, 8-cineole in blood and expired air in a *Eucalyptus* herbivore, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Chromatography B*, 780: 397–406.
- ❖ Castaldo, S., Capasso, F., (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73, 1-6.
- ❖ Castro, L., Ross, C. (2015). Determination of flavour compounds in beer using stir-bar sorptive extraction and solid-phase microextraction. The Institute of Brewing & Distilling. *J. Inst. Brew*, 121: 197–203.
- ❖ Cheng, H., Qin, Z., Guo, X., Hu, X., Wu, J. (2013). Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 51: 813-822.
- ❖ Cuevas-Glory, L., Pino, J., Santiago, L., Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry* 103: 1032–1043.
- ❖ Dutra, R., Aranha, M., Sousa, M., Abreu, B., Brandao, L., Meireles, R., Soares, M., Fernandes, F. (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.

- ❖ Eisert, R., Pawliszyn, J. (C). New Trends in Solid-Phase Microextraction. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27(2): 103-135.
- ❖ Franchin, M., M. G. da Cunha, C. Denny. (2013). "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.
- ❖ Fu Y-X, Xu Y-J, Chen B, Li Y, Lou L-P. (2009). Analysis of volatile components from Inner Mongolia propolis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 37: 745-748.
- ❖ González-Acereto, J.A., Quezada-Euán, J.J., (2012). Producción tradicional de miel: abejas nativas sin aguijón (trigonas y meliponas). *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*, 382-384.
- ❖ Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. (1989). Headspace volátiles from propolis. *Flavour and Fragrance Journal*, 4: 173-175.
- ❖ Griffin, S.G.; Wyllie, S.G.; Markham, J.L. & Leach, D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol.14, pp. 322-332.
- ❖ Hames-Kocabas E., Demirci B., Uzel A., Demirci F. (2013). Volatile composition of anatolian propolis by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), antimicrobial activity against food contaminants and antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 2140-2149.
- ❖ Harris, D.C., (1999). *Análisis Químico Cuantitativo*. 2a Edición. Barcelona, España: Editorial Reverte, 596-599.
- ❖ Hinshaw J.V., (2003). *Solid-Phase Microextraction*. LC•GC Europe, 1-4.
- ❖ Huang S., Lu Y., Zhang C., Hu F. (2013). Analysis chemical composition of volatile components before and after ethanol extracting of Brazilian green

propolis. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 32: 680-685.

- ❖ Janas K. & Bumba V. (1974). Contribution to composition of beeswax propolis. *Pharmazie*, 29: 544-545.
- ❖ Jelen, H.H. (2003). Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Letters in Applied Microbiology* 36, 263–267.
- ❖ Kaškonienė V., Kaškonas P., Maruška A., Kubiliene L. (2014). Chemometric analysis of volátiles of propolis from different regions using static GC-MS. *Central European Journal of Chemistry*, 12: 736-746.
- ❖ Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase micro- extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 800:35- 62.
- ❖ Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 235-240.
- ❖ Li Y., Xuan H., Shou Q., Zhan Z., Lu X, Hu F. (2012). Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Human & Experimental Toxicology*, 31: 157-165.
- ❖ Liberio, S. A., Pereira, A. L., Dutra, R. P., Reis, A. S., Araujo, M. J., Mattar, N. S. (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.
- ❖ Lord, H.; Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A.*, 885: 153-193.
- ❖ Maciejewicz W., Scheller S., Daniewski M. (1983). GC-MS investigation of propolis: analysis of sesquiterpenes. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 40: 251-

253.

- ❖ Melliou E., Stratis E., Chinou I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103: 375-380.
- ❖ Michener, C.D., (2000). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, 570-575.
- ❖ Miguel M., Nunes S., Cruz C., Duarte J., Antunes M., Cavaco A., Mendes D., Lima A., Pedro L., Barroso J., Figueiredo A. (2013). Propolis volátiles characterisation from acaricide-treated and untreated beehives maintained at Algarve (Portugal). *Nature Product Research*, 27: 743-749.
- ❖ Mills, G. A., Walker V. (2001). Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations. *Journal of Chromatography B*, 753: 259-268.
- ❖ Naik D., Vaidya H., Namjoshi T. (2013). Essential oil of Indian propolis: chemical composition and repellency against the honeybee *Apis florea*. *Chemistry & Biodiversity*, 10: 649-657.
- ❖ Negrao, M., Alpendurada, M. (1998). Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography*, 823: 211-218.
- ❖ Orsi R O, Funari S R C, Soares A M V C, Calvi S A, Olibeira S L, Sforcin J M, Bankova V. (2000). Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Venomous Animals and Toxins*, 6(2): 205–219.
- ❖ Pawliszyn, J. *Applications of solid phase microextraction*. (1999). The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- ❖ Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction, theory and practice*, Wiley-VCH, New York.

- ❖ Pawliszyn, J., (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* 880, 35-62.
- ❖ Pellati, F., Prencipe, F., Benvenuti, S. (2013). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84: 103-111.
- ❖ Peñalver-Hernando, A., (2002). Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. *Universitat Rovira I Virgili Departament de Química Analítica i Química Orgànica*, 10-38.
- ❖ Petri G., Lemberkovics E., Foldvar M. (1988). Examination of Differences Between Propolis (bee Glue) Produced from Different Floral Environments. In *Flavors and Fragrances: a World Perspective*. Edited by Lawrence BM, Mookherjee BD, Wills BJ. Amsterdam: Elsevier, 439-446.
- ❖ Pillonel, L.; Bosset, J.O.; Tabacchi, R. (2002). Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review. *Lebensm.-Wiss.u.Technol.*, 35: 1-14.
- ❖ 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, 53-56. 36. Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 36, 347-363.
- ❖ Poop, P., Bauer, C., Möder, M., Paschke, A. (2000). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in waste water by off-line coupling of solid-phase microextraction with column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 897: 153–159.
- ❖ Prosen, H., Zupančič-Kralj, L. (1999). Solid-phase microextraction. *Trends in*

analytical chemistry, vol. 18, no. 4., 272-281.

- ❖ 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.
- ❖ Quezada-Euán, J.J., de Jesús May-Itzá, W., González-Acereto, J.A., (2001). Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development. Bee World 82, 160-167.
- ❖ Reyes-González, A., Camou-Guerrero, A., Reyes-Salas, O., Argueta, A., Casas, A. (2014). Diversity, local knowledge and use of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the municipality of Nocupétaro, Michoacan, Mexico. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 10:47.
- ❖ Ribeiro-Junior, J., Denny, C., Franchin, M., Matias de Alencar, S., Cavallini, M., Ikegaki, M., Rosalen, P. (2015). Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 2015, Article ID 459846, 5 pages.
- ❖ Roubik, D.W., (1989). Ecology and Natural History of Tropical Bees. Cambridge Univ. Press, New York, 4-15.
- ❖ Sarrión, M., Santos, F., Galceran, M. (2002). Determination of chlorophenols by solid-phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography A, 947: 155-165.
- ❖ Sawaya, A. C. H. F., Abdelnur, P. V., Eberlin, M. N., Kumazawa, S., Ahn, M., Bang, K., et al. (2010). Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Talanta, 81(1–2), 100–108.
- ❖ Seisonen, S., Kivima, E., Vene, K. (2015). Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase

microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. *Food Chemistry*, 169: 34-40.

- ❖ Sforcin J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1): 1–14.
- ❖ Sforcin, J.M., Bankova, V., (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 253- 260.
- ❖ Sikkema, J., Bont, J. A., Poolman, Bert. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, June 1995, p. 201–222.
- ❖ Simplicio, A.L.; Boas L.V. (1999). Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *Journal of Chromatography A.*, 833: 35-42.
- ❖ Valadares B L B, Graf U, Spano M A (2008). Inhibitory effects of wáter extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3): 1103–1110.
- ❖ Vas G, Gal L, Dobo A, Vekey K. J. (1998). *Chromatography Science*. 36: 505.
- ❖ Vas, G., Vekey, K., (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom* 39, 233–254.
- ❖ Wennig, R. (2000). Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, 107: 5-12.
- ❖ Xu, Y., Lou, L., Chen, B., Fu, L. (2009). Recent developments of chemical components in propolis. *Frontiers of Biology in China*, 4: 385-391.
- ❖ Yang, X.; Peppard, T. (1999). Solid phase microextraction for flavor analysis. *J Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1925-1930.

- ❖ Yashiki M, Kojima T, Miyazaki T, Nagasawa N, Iwasaki Y, Hara K. (1995). Forensic Sci. Int. 76: 169.
- ❖ Yeon-Suk, L., Junheon, K., Sang-Gil, L., Eunsung, O., Sang-Chul, S., Il-Kwon, P. (2009). Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. Pesticide Biochemistry and Physiology, 93: 138-143.
- ❖ Yue-Zhong Shu, (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. Journal of Natural Products 61, 1053-1071.
- ❖ Zhou, J., Li, Y., Zhao, J., Xue, X., Wu, L., & Chen, F. (2008). Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints. Food Chemistry, 108 (2), 749–759.

Referencias Electrónicas

- ❖ Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=liquidambar&id=7416> Fecha de consulta 15 de Febrero 2016.
- ❖ Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/34-hamam1m.pdf Fecha de consulta 15 de Febrero 2016.