



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA  
DE GEOPROPÓLEOS RECOLECTADOS EN PUEBLA, MÉXICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Fernando Martínez Hernández**



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2018



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:** María Isabel Aguilar Laurents

**VOCAL:** José Manuel Méndez Stivalet

**SECRETARIO:** José Fausto Rivero Cruz

**1ER SUPLENTE:** Mabel Clara Fragoso Serrano

**2DO SUPLENTE:** Mario Alberto Figueroa Saldivar

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,  
DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

### **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

### **SUSTENTANTE:**

---

Fernando Martínez Hernández

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar los estudios de bachillerato y licenciatura.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo, tiempo y asesoría brindado para la realización de este trabajo.

A la Química Karen Tatiana Hernández Osorio por toda la asesoría y apoyo brindado durante toda mi estancia en el laboratorio.

Al Biólogo Jorge Jiménez Díaz por las muestras y fotografías proporcionadas que se utilizaron en este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito y la corrección del mismo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica 252006.

# Índice

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1 GENERALIDADES DEL PROPÓLEO.....	3
2.1.1 <i>Características físicas de los propóleos</i> .....	4
2.1.2 <i>Clasificación de los propóleos de acuerdo a su origen geográfico</i> .....	5
2.1.3 <i>Composición química</i> .....	6
2.1.4 <i>Actividad de los propóleos</i> .....	6
2.2 GENERALIDADES DEL GEOPROPÓLEO .....	7
2.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA .....	7
2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GEOPROPÓLEO .....	8
2.4.1 <i>Actividad antioxidante</i> .....	9
2.4.2 <i>Actividad antimicrobiana</i> .....	9
2.4.3 <i>Actividad antifúngica</i> .....	10
2.4.4 <i>Actividad antiinflamatoria</i> .....	11
2.4.5 <i>Actividad antiviral</i> .....	12
2.4.6 <i>Actividad gastroprotectora</i> .....	12
2.5 ABEJAS MELIPONAS O ABEJAS SIN AGUIJÓN .....	13
2.5.1 <i>Taxonomía</i> .....	14
2.5.2 <i>Sistema de castas</i> .....	14
2.5.3 <i>Diversidad de especies</i> .....	15
2.5.4 <i>Scaptotrigona mexicana</i> .....	17
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>4 DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>20</b>
4.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE GEOPROPÓLEOS .....	20

4.2	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS (EH) .....	20
4.3	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS (EE).....	21
4.4	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF) DE LOS EEP Y EHP	21
4.5	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	21
4.5.1	<i>Curva patrón de Trolox</i> .....	22
4.5.2	<i>Evaluación de la actividad antioxidante de los EE de geopropóleo</i> .....	22
4.6	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES.....	23
4.6.1	<i>Curva patrón</i> .....	23
4.6.2	<i>Cuantificación de fenoles totales en los EE de geopropóleo</i> .....	23
4.7	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES.....	24
4.7.1	<i>Curva patrón de quercetina</i> .....	24
4.7.2	<i>Cuantificación de flavonoides totales en los EE de geopropóleo</i> .....	24
4.8	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
5.1	RENDIMIENTO DE LOS EHGP Y EEGP .....	26
5.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF) DE LOS EEP Y EHP	27
5.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	28
5.4	DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE FLAVONOIDES TOTALES.....	29
5.5	DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD TOTAL DE FENOLES .....	32
5.6	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	33
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>37</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO I PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES .....</b>	<b>43</b>
	<b>ANEXO II GRÁFICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CE<sub>50</sub> DE LOS EEG .....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO III PLACAS PARA DETERMINAR LA CMI.....</b>	<b>54</b>

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
μM	Micromolar
Abs	Absorbancia
BHI	Infusión cerebro corazón
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
CLSI	Instituto de estándares clínicos de laboratorio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EEG	Extracto etanólico de geopropóleo
EHG	Extracto hexánico de geopropóleo
g	Gramos
h	Horas
HMG	Hidrometanólico de geopropóleo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
m	Masa
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
OMS	Organización mundial de la salud
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
V	Volumen

## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Tipos de propóleos, ubicación y compuestos representativos de cada uno. .	6
<b>Cuadro 2.</b> Apiarios y zonas de recolección de los geopropóleos.....	20
<b>Cuadro 3.</b> Rendimiento de la extracción hexánica y etanólica de las muestras e geopropóleo analizadas .....	26
<b>Cuadro 4.</b> CE <sub>50</sub> en mg equivalentes Trolox (mg ET)/mL.....	29
<b>Cuadro 5.</b> Flavonoides totales en mg equivalentes de quercetina (mg EQ)/g de EEP .	31
<b>Cuadro 6.</b> mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG)/ g de EEG .....	33
<b>Cuadro 7.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos hexánico (EHG) y etanólico (EEG) de los geopropóleos .....	35

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Lagartija embalsamada encontrada en el interior de una colmena. Proporcionada por el MVZ Ramírez. ....	3
<b>Figura 2.</b> Muestras de geopropóleos de diferente origen. Obtenidas de <a href="https://www.zzzangano.com/beneficios-propoleo-abeja/">https://www.zzzangano.com/beneficios-propoleo-abeja/</a> y por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz. ....	5
<b>Figura 3.</b> Ubicación general de los diferentes tipos de propóleos.....	5
<b>Figura 4.</b> Composición general de los geopropóleos.....	8
<b>Figura 5.</b> Celdas en forma de hexágono donde se realiza la crianza de las nuevas abejas y los cántaros donde se almacena la miel. Fotografía tomada por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz.....	15
<b>Figura 6.</b> Los nidos aéreos que construyen algunas especies dificulta la recolección de miel y propóleo. Proporcionada por MVZ Ángel López Ramírez.....	16
<b>Figura 7.</b> Abeja sin aguijón de la especie <i>Scaptotrigona mexicana</i> en la entrada de su nido. Fotografía tomada por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz .....	17
<b>Figura 8.</b> Entrada al nido en forma de trompeta, la cual es característica de la especie <i>Scaptotrigona mexicana</i> . Fotografía tomada por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz.....	17
<b>Figura 9.</b> Reacción de aclaramiento de DPPH. ....	22

<b>Figura 10.</b> Reacción entre flavonoides y sales de aluminio. ....	24
<b>Figura 11.</b> A. EHG. Sistema de elución: hexano:diclorometano. B. EEG. Sistema de elución: AcOEt:MeOH. Agente cromógeno: anisaldehído-sulfúrico.....	27
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando como referencia a el Trolox. ....	28
<b>Figura 13.</b> Comparación de la CE <sub>50</sub> de las muestras de geopropóleo en mg equivalentes de Trolox.....	29
<b>Figura 14.</b> Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales utilizando como referencia a la quercetina. ....	30
<b>Figura 15.</b> Comparación de la cantidad de flavonoides totales presentes en las muestras por cada g de EEP. ....	31
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración para determinar la cantidad total de fenoles utilizando ácido gálico.....	32
<b>Figura 17.</b> Comparación de la cantidad total de fenoles en mg equivalentes de ácido gálico por g de EEG. ....	33

## 1 Introducción

En la industria farmacéutica se ha incrementado el interés de la búsqueda de productos de origen natural para mantener un estilo de vida saludable en la población, especialmente en aquellos que presentan actividad antioxidante y antimicrobiana, ésta última debida a la resistencia bacteriana y fúngica a los medicamentos así como de los efectos secundarios que causan.

Uno de estos productos naturales es el propóleo, por la gran variedad de propiedades biológicas que este presenta y de las cuales destacan la actividad antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, antifúngica, antiinflamatoria, antiviral, citotóxica y hepatoprotectora.

El propóleo es un producto balsámico y resinoso hecho por las abejas de extractos que recolectan de las plantas y árboles, secreciones salivales, ceras y polen. Las abejas sin aguijón pueden producir tanto propóleos como geopropóleos. Los geopropóleos además de los extractos, secreciones salivales, ceras y polen, contienen barro o arcilla que las mismas abejas agregan.

Dentro de los extractos podemos encontrar una gran cantidad sustancias químicas, las cuales son transferidas a la miel y al propóleo. Se ha encontrado que estas sustancias están muy relacionadas con las actividades biológicas antes mencionadas, sin embargo, debido al origen de los extractos la composición es muy variable y dependiente de múltiples factores como son: la estación del año, zona geográfica, especie de las abejas, etc.

A pesar de que en otros países se tienen una gran cantidad de estudios sobre su composición y actividad, en México hay pocos grupos de trabajo que se dedican a ello, probablemente porque se encuentran infravalorados. Sin embargo, recientemente se aprobó la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 en la que se tiene como objetivo regular la calidad de los propóleos y su manejo.

Con base a lo anterior, para este trabajo se analizaron diferentes muestras de geopropóleos procedentes de Puebla, México, en el cual se determinó la actividad

antioxidante utilizando el bioensayo de neutralización del radical libre DPPH, la cantidad de fenoles totales se determinó con la técnica de Folin-Ciocalteu, la cantidad de flavonoides totales se determinó con un procedimiento modificado y para la actividad antibacteriana se utilizaron los criterios establecidos por el CLSI.

## 2 Antecedentes

### 2.1 Generalidades del propóleo

El propóleo es un producto complejo de colmena que posee una amplia variedad en su aspecto físico, lo cual depende de muchos factores. La palabra propóleo es de origen griego y se compone de dos partes: *pro*, en defensa de, y *polis*, ciudad, es decir, es un producto involucrado en la defensa de la colmena. Las abejas lo utilizan para diversos propósitos, entre ellos para sellar las aberturas en la colmena, evitar la entrada de intrusos, para mantener la temperatura dentro de la colmena que es de alrededor de los 35°C. y proporcionar un ambiente interno aséptico<sup>1</sup>. También, lo utilizan para cubrir el cadáver de insectos grandes y animales pequeños pero lo suficientemente grandes para no poder ser arrojados de la colmena, de esa forma evitan su descomposición dentro de ella<sup>2</sup>. Lo anterior es muy importante, ya que evita una posible infección bacteriana generalizada.



**Figura 1.** Lagartija embalsamada encontrada en el interior de una colmena. Proporcionada por el MVZ Ramírez.

El reconocimiento de la eficacia antiséptica de los propóleos es antiguo, se sabe que los egipcios, persas y romanos lo utilizaban para tratar diversas dolencias y para el embalsamamiento de los muertos porque evita la putrefacción<sup>3</sup>. Aristóteles recomendó el

uso del propóleo para tratar abscesos y heridas. Los soldados romanos también lo ocupaban como medicina de emergencia para el tratamiento de las heridas de guerra<sup>1</sup>.

La composición del propóleo es extremadamente compleja. Los componentes principales son cera, resina y componentes volátiles. El primero de ellos es secretado por las abejas mientras que los últimos dos son obtenidos de las plantas. Pero, contrariamente al hábito conocido de visitar las flores para la recolección de néctar y polen, las abejas usualmente toman material vegetal para los propóleos de las secreciones de las plantas o cortando fragmentos de tejidos vegetativos. La actividad biológica de los propóleos es asignada a estas sustancias derivadas de plantas. Por lo tanto, aunque el propóleo es un producto animal, una proporción considerable de sus componentes, principalmente aquellos sobre los que descansa su actividad biológica, son derivados de las plantas.

En los años de 1950 y 1960, los propóleos comenzaron a ganar aprecio como un medio para el tratamiento de los problemas de salud, pero no fue hasta 1980 que empezó a adquirir popularidad en Europa occidental, América del Norte, América del Sur y Japón. Hasta ese momento, el propóleo era considerado por los apicultores como un subproducto de la colmena no deseado, ya que no tenía valor de mercado y su producción significaba una disminución en las cantidades de miel. Poco a poco, el interés por los propóleos fue aumentando hasta que terminó como un producto importante en la medicina complementaria y alternativa. Japón es el principal importador de propóleos, con una notable preferencia por los propóleos de Brasil<sup>1</sup>.

### **2.1.1 Características físicas de los propóleos**

Como se mencionó anteriormente, presentan una gran variedad en su aspecto físico y composición química, los cuales dependen de la zona geográfica de donde se encuentre la colmena. Poseen un aroma característico y el color puede ser verde, marrón y rojizo, que se adquiere dependiendo de su fuente botánica. Para identificar las fuentes vegetales específicas, se realizan estudios de perfil químico del propóleo y de los exudados vegetales de las especies de árboles y plantas de las cuales las abejas realizan su recolección. De esta forma, se puede establecer una relación más acertada entre ambos.



**Figura 2.** Muestras de geopropóleos de diferente origen. Obtenidas de <https://www.zzzangano.com/beneficios-propoleo-abeja/> y por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz.

A elevadas temperaturas es suave, flexible, y muy pegajoso; sin embargo, cuando se enfría a temperaturas de congelamiento, se vuelve duro y quebradizo. Generalmente, se vuelve líquido entre los 60 y 70 °C, pero en algunos casos el punto de fusión puede llegar a los 100 °C<sup>3</sup>.

### 2.1.2 Clasificación de los propóleos de acuerdo a su origen geográfico

Los propóleos a pesar de ser muy variables en su composición, se han encontrado similitudes entre diferentes muestras que se encuentran dentro de una zona geográfica, debido a esto se estableció una clasificación basada en la zona donde se producen y en el tipo de compuestos presentes en ellos(Figura 3 y Cuadro 1).<sup>4</sup>



**Figura 3.** Ubicación general de los diferentes tipos de propóleos

**Cuadro 1.** Tipos de propóleos, ubicación y compuestos representativos de cada uno.

Tipo de propóleo	Ubicación geográfica	Compuestos representativos
I. Derivado del álamo	Zonas templadas	Flavonoides sin sustituyentes en el anillo B, e.g., pinocembrina
II. Propóleos verdes	Centro y sureste de Brasil	Fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeoil quinolínicos, e.g., artepilina C
III. Derivados de <i>Clusia</i>	Noreste de Brasil, Venezuela, zona de la selva Amazónica, Cuba	Benzofenonas polipreniladas
IV. Derivados de <i>Macaranga</i>	Este de África, Taiwán y Japón	Flavonoides de geranilo
V. De la zona mediterránea	Grecia, Creta y Turquía	Diterpenoides o antraquinonas

### 2.1.3 Composición química

En varios estudios se ha descrito que de forma general un propóleo está compuesto por 50 % de resina (flavonoides, cumarinas, aldehídos aromáticos, flavonas y terpenos), 30 % de ceras, 10 % de aceites esenciales y aromáticos, 5 % de polen y 5 % de otras sustancias orgánicas, en las que se incluyen fragmentos de madera<sup>3,5</sup>.

Hasta la fecha, más de 300 compuestos se han caracterizado en los propóleos, incluyendo a los ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, ácidos grasos, carbohidratos, aldehídos, aminoácidos, cetonas, chalconas, dihidrochalconas, terpenoides, vitaminas y sustancias orgánicas. De todos los identificados, los flavonoides son los de mayor interés en la investigación, ya que se ha demostrado que con los causantes de la actividad antibacteriana y antioxidante<sup>6</sup>.

### 2.1.4 Actividad de los propóleos

Los propóleos poseen actividades farmacológicas tales como propiedades antibacteriales, antifúngicas, antiparasitarias, antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias, y se utiliza ampliamente como ingredientes de caramelos, mieles, productos biofarmacéuticos, cosméticos y en bebidas en diversas partes del mundo

donde se pretende mejorar la salud humana y prevenir enfermedades como la diabetes y el cáncer<sup>7,8</sup>. Recientemente, el propóleo se ha propuesto como conservador químico en carne molida y como germicida e insecticida en alimentos envasados<sup>8</sup>.

Los efectos biológicos del propóleo pueden estar asociados con su actividad antioxidante, y en las últimas décadas se han propuesto nuevas técnicas analíticas para determinar dicha actividad<sup>9,10</sup>. Se basan, por ejemplo, en la determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales o en los ensayos de actividad/capacidad antioxidante: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), potencia férrica reductora/antioxidante (FRAP) y generación del catión ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)<sup>11</sup>. También, se ha descrito que con los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de las muestras se puede predecir la actividad antibacterial y antioxidante sin la necesidad de hacer pruebas<sup>12</sup>.

## **2.2 Generalidades del geopropóleo**

La palabra propóleo proviene del griego que significa en defensa de la ciudad o colmena, mientras que el prefijo *geo* hace referencia a la presencia de tierra o arcilla, característica que los diferencia de los propóleos<sup>13</sup>.

Los geopropóleos son un producto resinoso producido por las abejas meliponinas a partir de la colecta de resinas vegetales, aceites esenciales, polen, cera, azúcares y tierra, que se utiliza para la construcción y como calefactor de la colmena. Pueden ser de diferentes tonalidades de color verde y marrón, con un aroma característico, propiedades adhesivas<sup>14</sup> y sabor amargo<sup>15</sup>. Dado lo anterior, son físicamente indistinguibles de los propóleos producidos por *Apis mellifera*.

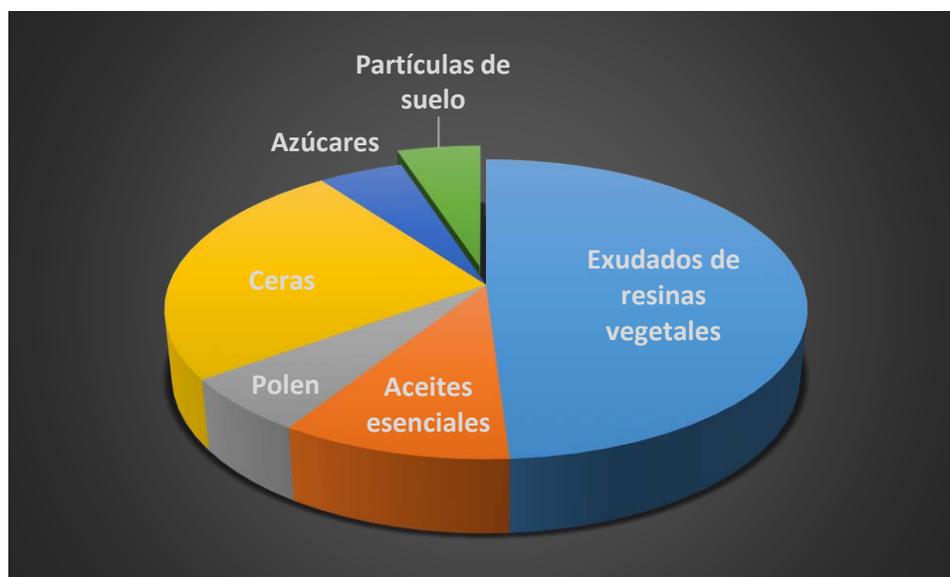
## **2.3 Composición química**

La composición química de los geopropóleos y de los propóleos en general, está relacionada con la fuente botánica, la zona geográfica, la estación del año, el clima y la zona de recolección<sup>16</sup>.

En el año de 1998 se lograron identificar más de 50 compuestos en muestras de geopropóleos, en donde la mayoría de ellos fueron compuestos fenólicos, ácidos grasos como el ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido palmítico, ácido mirístico y ácido láctico. Ácidos aromáticos tales como el ácido gálico, ácido benzoico y ácido cinámico además de flavonoides y terpenoides<sup>17</sup>.

Más recientemente se han llegado a encontrar triterpenos, saponinas, compuestos no alcalioides<sup>15</sup>, hidratos de carbono y sus derivados<sup>18</sup>.

La composición de los geopropóleos está conformada por exudados de resinas vegetales, aceites esenciales, polen, ceras, azúcares, y especialmente por partículas del suelo. En la Figura 4 se muestra a grandes rasgos la proporción de los componentes principales de los geopropóleos.



**Figura 4.** Composición general de los geopropóleos.

#### **2.4 Actividad biológica del geopropóleo**

Los propóleos y geopropóleos se han utilizado en la medicina tradicional durante miles de años, debido a las propiedades biológicas que presentan. Dichas propiedades se relacionan con la presencia de productos naturales biológicamente activos como polifenoles, flavonoides y ésteres de ácido cafeico<sup>14</sup>.

Debido a la gran cantidad de componentes presentes en los propóleos, es muy complicado identificar cuál de ellos es el responsable de la actividad terapéutica, sin embargo, algunos autores afirman que la eficacia no es de un solo componente sino de la composición heterogénea<sup>19</sup>.

#### **2.4.1 Actividad antioxidante**

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, se agrupan en los radicales libres y dentro de estas destacan el anión superóxido, los radicales hidroxilo, oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, se producen continuamente en las células humanas. Las especies reactivas de oxígeno y las reacciones inducidas por los radicales libres se han asociado con eventos degenerativos o patológicos como envejecimiento, cáncer, disfunción cardíaca, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, shock hemorrágico, trastornos cardiovasculares, fibrosis quística, trastornos metabólicos, enfermedades neurodegenerativas, fibrosis quística, ulcerogénesis gástrica y SIDA<sup>20</sup>.

En estudios de muestras de geopropóleos se han encontrado ácidos fenólicos y taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos), como los responsables del alto contenido fenólico y de la actividad antioxidante<sup>20,21</sup>. Otros estudios describen el aislamiento de la naringenina y su efecto sobre la modulación de la actividad de la superóxido dismutasa y catalasa, así como la protección de la membrana celular contra el proceso de peroxidación<sup>22</sup>.

#### **2.4.2 Actividad antimicrobiana**

La identificación de nuevos compuestos con acción antimicrobiana ha despertado el interés de la industria farmacéutica, sobre todo porque muchas cepas de los microorganismos se han vuelto resistentes a los antibióticos disponibles en la actualidad, lo que resulta en morbilidad y mortalidad elevados, especialmente entre las infecciones nosocomiales. Entre los principales mecanismos de resistencia son la eliminación de los

antibióticos por bombas de eflujo en la pared celular de los microorganismos y la degradación de los antibióticos por enzimas específicas<sup>22</sup>.

La mayoría de los estudios antibacteriales están enfocados en los microorganismos causantes de enfermedades de la cavidad oral, especialmente de las caries y la candidosis. En esos estudios se han encontrado buenos resultados en contra de la formación de biofilm de *S. mutans*<sup>23,24</sup>, causante de las caries. A diferencia de otros estudios, en la formación de biofilm, se han probado tanto los extractos polares como los apolares. En estos últimos no se afecta a la población bacteriana pero si al proceso de formación del biofilm<sup>25</sup>.

En un estudio del 2016 se probaron a los geopropóleos en aislados clínicos de otitis externa provenientes de perros, en el cual se observó una buena actividad antibacteriana para los microorganismos identificados, por lo tanto, pueden ser una alternativa en el tratamiento de las otitis recurrentes<sup>26</sup>.

Otro mecanismo encontrado relacionado con los geopropóleos es la inhibición de la DNA girasa, que es una topoisomerasa que actúa durante la replicación del DNA, también se ha encontrado que genera daño a las membranas celulares impidiendo que estas realicen su función de manera adecuada<sup>22</sup>.

### **2.4.3 Actividad antifúngica**

El mecanismo de acción de muchos antifúngicos está basado en la inhibición de la síntesis o unión de ergosterol, causando así alteración en la membrana celular fúngica, ya que este es su principal componente. La toxicidad generada a las personas por los antifúngicos es causada por la similitud del ergosterol y el colesterol presente en nuestras propias células. Por esta razón, actualmente hay una gran necesidad de descubrir nuevos compuestos antifúngicos con alta eficacia y baja toxicidad.

En el trabajo de Araújo y colaboradores presentaron por primera vez los efectos de los propóleos y geopropóleos en contra de *Phythium insidiosum*, agente causal de la pitiosis. La pitiosis es una micosis localizada, caracterizada por lesiones granulomatosas

cutáneas, subcutáneas, gastrointestinales y en algunas ocasiones multisistémicas que afecta principalmente a caballos, perros y humanos. Encontraron que en la mayoría de los aislados del hongo se inhibió el crecimiento a una concentración de 3.4 mg/mL, pero en el caso de los geopropóleos la actividad fue fungistática en lugar de fungicida con concentraciones mayores a 3.4 mg/mL<sup>27</sup>.

La candidosis es una de las infecciones más frecuentes y polimórficas que atacan al hombre; su gravedad y profundidad no depende del agente etiológico, sino del factor de predisposición de las personas<sup>28</sup>. En el IX Congreso nacional de micología médica se presentó un trabajo en el que se estudiaron los EEG, éstos generaban un daño significativo a la membrana del principal agente causal de dicha infección, *Candida albicans*, impidiendo que realizara sus funciones adecuadamente y por la tanto su muerte.

#### **2.4.4 Actividad antiinflamatoria**

En las últimas décadas, los analgésicos representan una de las clases terapéuticas más estudiadas en el mundo, debido a la disminución del efecto por el alto consumos de estos. Por esta razón, el esfuerzo en desarrollar nuevos fármacos a partir de productos naturales va en aumento, siendo los extractos de propóleos y geopropóleos unos muy importantes.

En un estudio realizado en el año 2012 se evaluaron los extractos de geopropóleos para medir su actividad antinociceptiva y antiinflamatoria utilizando diferentes modelos: constricciones abdominales inducidas por ácido acético, prueba de formalina, hipernocicepción inducida por carragenina y cuantificación de la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). También mencionan que de los dos primeros modelos se recomienda utilizar la prueba de formalina, ya que en esta no interfieren otros compuestos, como los antihistamínicos, neurolepticos y los bloqueadores adrenérgicos<sup>29</sup>.

En los resultados describen que los geopropóleos son una fuente prometedora de compuestos bioactivos con actividad antinociceptiva, mediada por la inhibición de

citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que juegan un papel muy importante en la liberación de prostanoïdes, los cuales sensibilizan los nociceptores. Además, están directamente relacionados con la migración de neutrófilos en el proceso inflamatorio<sup>30</sup>.

#### **2.4.5 Actividad antiviral**

El virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) se transmite principalmente por contacto directo de boca a boca y causa infecciones en la boca o a sus alrededores, mientras que el herpes simple tipo 2 (VHS-2) se transmite únicamente por vía sexual y provoca infecciones en la zona genital o anal. De acuerdo a datos de la OMS (2017), se estima que en todo el mundo hay un total de 3,700 millones de personas menores de 50 años infectadas por VHS-1 y alrededor de 417 millones de personas de 15 a 49 años infectadas por VHS-2. Estos virus a pesar de ser tratados con Aciclovir, Famciclovir o Valaciclor, no curan la infección, simplemente reducen la intensidad y frecuencia de los síntomas. En personas con infecciones crónicas puede llevar al desarrollo de resistencia de los fármacos de elección, por ello es que los resultados reportados por Coelho y colaboradores son de gran interés. En los estudios muestran que el extracto HMG de *Scaptotrigona postica*, redujo el número de copias del VHS-1 de ADN genómico en el sobrenadante y en la célula lisada. De la misma forma, no se observó la presencia de viriones en el citoplasma de células inoculadas con el virus, llegando a la conclusión de que los geopropóleos inhiben la replicación viral durante la infección temprana<sup>31</sup>.

#### **2.4.6 Actividad gastroprotectora**

Las úlceras pépticas son el resultado del desequilibrio de los agentes agresivos (*Helicobacter pylori*, antiinflamatorios no esteroideos, alcohol, entre otros) y los agentes de protección (prostaglandinas, óxido nítrico, entre otros). Hasta la fecha se sabe muy poco sobre los mecanismos de acción de los geopropóleos sobre esta actividad, pero en un estudio del 2015, se demostró que los EEG de *Melipona scutellaris* presentaron efecto gastroprotector en ratas utilizando el modelo de úlcera inducida por etanol, con un posible mecanismo relacionado con el del óxido nítrico y prostaglandinas<sup>32</sup>.

## 2.5 Abejas meliponas o abejas sin aguijón

Las abejas con cerca de 20,000 especies en el mundo resaltan como importantes visitantes de la flora existente; pertenecen al orden Hymenoptera, que incluye a la familia Apidae con algunas de las especies con los hábitos sociales más altos, como son *Apis mellifera* y las abejas sin aguijón o meliponinos que caracterizan por tener el aguijón atrofiado.

Los meliponinos se encuentran principalmente en zonas tropicales y subtropicales, teniendo su mayor distribución en el neotrópico americano, distribuyéndose desde México hasta Argentina, donde se encuentran 300 de las 400 especies identificadas. Son las abejas más comunes en varias zonas de América tropical, y por lo tanto, presumiblemente juega un papel importante como polinizadores de la vegetación nativa<sup>33</sup>.

La mayor parte de los meliponinos visitan flores para obtener néctar y polen para su subsistencia; existen otros que nunca visitan las flores pero obtienen polen y miel de otras colonias. Algunas especies colectan resinas, lodo o excremento para la fabricación de sus nidos, estableciendo de esta forma una interacción positiva en la conservación de insectos y vegetación.

Cuando las abejas reinas vírgenes dejan el nido madre para empezar su vida en un nuevo panal, realizan vuelos nupciales o rituales de apareamiento, estos a menudo son específicos para cada especie y van acompañados de la colocación de huevos tróficos (comida para la reina) por parte de los obreros. El comportamiento de las reinas y obreros durante la postura puede proporcionar caracteres de importancia filogenética<sup>33</sup>.

La mayoría de la especies realizan sus nidos en cavidades que las abejas encuentran, y pueden limitar cerrando las áreas no utilizadas. Las cavidades varían en tamaño, pueden ser desde madrigueras abandonadas de escarabajos hasta grandes huecos en el tronco de un árbol o cavidades en el suelo. Algunas especies no ocupan las cavidades, si no que realizan los nidos de forma expuesta en ramas o en paredes de acantilados<sup>33</sup>.

Los nidos están hechos de cera secretada por el metasoma, resinas y gomas recogidas por las abejas. Algunas especies agregan barro, heces u otros materiales para realizar la

construcción. En todas las especies la composición y la textura difieren en las diferentes secciones del nido. Por ejemplo, las celdas de crianza y los alrededores de ellas son de material blando, presumiblemente en gran parte de cera; los soportes y las placas de batumen (mezcla de resinas, ceras, barro o arena) son de material duro; en los expuestos la capa más externa de batumen es quebradiza<sup>33</sup>.

Estos insectos se encuentran amenazados por la deforestación de los bosques, por el saqueo de nidos silvestres y por el poco conocimiento sobre el cultivo de estas abejas. Si continúan estas técnicas, la falta de polinización disminuirá la producción de frutos y semillas provocando la desaparición de una gran cantidad de especies vegetales.

### 2.5.1 Taxonomía

En el año de 1948 se consideraba solamente tres géneros de abejas sin aguijón: *Melipona*, *Lestrimelita* y *Trigona*, este último con varios subgéneros<sup>34</sup>. En 1951 se propuso una nueva clasificación con 12 géneros y 19 subgéneros para la región tropical. En 1988 se propusieron 27 taxasupraespecíficos (géneros y subgéneros) para los meliponinos del nuevo mundo<sup>35</sup>.

La clasificación más actual basada en el análisis de gonostilos, aguijones y palpos labiales de las obreras, y los genitales de los machos, reconoce 21 géneros y 17 subgéneros, los cuales se mencionan a continuación: *Cleptotrigona*, *Hypotrigona*, *Austroplebeia*, *Pariotrigona*, *Lisotrigona*, *Trigonisca*, *Liotrigona*, *Plebeia*, *Trichotrigona*, *Dactylurina*, *Oxytrigona*, *Cephalotrigona*, *Trigona*, *Lestrimelitta*, *Melipona*, *Nannotrigona*, ***Scaptotrigona***, *Paratrigona*, *Partamona*, *Meliponula* y *Plebeina*<sup>36</sup>.

Estos géneros se encuentran dentro de la tribu meliponini, subfamilia *Apinae latreille*, familia *Apidae*, superfamilia *Apoidea*, suborden *Apocrita* y orden *Hymenoptera*<sup>33</sup>.

### 2.5.2 Sistema de castas

En el caso de los meliponinos, la diferenciación entre las castas femeninas es muy diferente de lo que se conoce del género *Apis*, que resulta de diferencias en la calidad de los alimentos. Se conocen tres sistemas diferentes de los Meliponinos. En el primer

sistema, en el que se encuentran la mayoría de los Meliponinos, las reinas se producen en números pequeños en celdas grandes, ubicadas cerca de los límites de los cántaros, la gran cantidad de alimento parece ser el factor principal del desarrollo de reinas. En el segundo sistema, las celdas de las reinas se encuentran con una separación definida en lugar de en cántaros. Si dos celdas resultan ser contiguas, una larva vieja puede irrumpir en la celda de otra larva más joven y comer su comida almacenada, generando de esta forma a una reina<sup>37</sup>. En el tercer sistema no hay celdas de reina especiales, las reinas se producen en números relativamente grandes, llegando hasta un cuarto de la población total en ciertas estaciones, de las cuales la gran mayoría es expulsada o matada por los mismos obreros<sup>33</sup>.



**Figura 5.** Celdas en forma de hexágono donde se realiza la crianza de las nuevas abejas y los cántaros donde se almacena la miel. Fotografía tomada por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz.

### 2.5.3 Diversidad de especies

En México se encuentran 46 especies de abejas sin aguijón, de las cuales se cultivan principalmente a *S. mexicana* (“abeja congo”), *Melipona beecheii* (“abeja real”), *M. solani* (“abeja real roja”), *S. pectoralis* (“abeja congo alazana”), *Trigona* (Tetragonisca) *angustula* (“doncellita o sayulita”) y *Nannotrigona perilampiodes* (“doncellita prieta”).

Algunas especies presentan problemas para su cultivo ya sea por sus comportamientos o por sus hábitos de nidificación: *Oxytrigona mediorufa* (“pringadora”) en su defensa libera sustancias cáusticas al morder la piel de las personas, *Lestrimellita niitkib* (“limoncillo”) roba alimento a otras colonias de meliponinos, *Trigona fulviventris* (“culodebuey”), tiene hábito de nidificación subterráneo o *Partamona orizabaensis*, *T. fuscipennis* y *T. nigérrima* son conocidas como basureras, tamagazas, que nidifican de forma aérea, son difíciles de cultivar por la naturaleza de sus nidos.



**Figura 6.** Los nidos aéreos que construyen algunas especies dificulta la recolección de miel y propóleo. Proporcionada por MVZ Ángel López Ramírez.

#### 2.5.4 *Scaptotrigona mexicana*

Es una abeja de color negro, de talla mediana de aproximadamente 5.0 a 5.3 mm de largo, alas color naranja con una longitud de 5.1 a 5.4 mm.



**Figura 7.** Abeja sin aguijón de la especie *Scaptotrigona mexicana* en la entrada de su nido. Fotografía tomada por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz

Esta especie construye sus nidos en las oquedades de los troncos o ramas, una de las principales características de esta abeja es tener la entrada en forma de una trompeta y es muy común observar a un pequeño grupo de ellas vigilar la entrada del nido.



**Figura 8.** Entrada al nido en forma de trompeta, la cual es característica de la especie *Scaptotrigona mexicana*. Fotografía tomada por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz.

Es un meliponino que se propaga por medio de enjambrazón. Primero, un grupo de obreras buscan un nuevo lugar y empiezan a construir el nuevo nido con material de la colonia madre. Después de construir la entrada y tener cántaros aprovisionados de alimento, una abeja reina virgen deja la colonia vieja junto con un grupo de la población adulta para ir al nuevo nido. La reina virgen realiza su vuelo nupcial, posteriormente el abdomen se agranda impidiendo que la reina vuelva a volar.

La distribución que tiene en nuestro país va desde el estado de Chiapas y por la costa del Golfo hasta Tamaulipas, tanto por tierras bajas con bosque tropical perennifolio como en las laderas de las montañas en bosques de pinos y mesófilo de montaña. Se presenta de 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 oeste de la Sierra Madre del sur en Guerrero<sup>38</sup>.

### 3 Justificación y objetivos

En la actualidad, los propóleos son ampliamente utilizados por la población mexicana debido a sus diversas aplicaciones, entre ellas se puede mencionar el uso como antiinflamatorio, antioxidante, antiséptico, antibacteriales, antimicóticas, anestésicas, actividad citotóxica, para el tratamiento de úlceras, anticancerígenas e inmunomoduladoras<sup>2</sup>. Por esta razón se han dedicado muchos estudios para conocer la composición química de estos, de hecho, los estudios no se limitan a nuestro país si no que en varias regiones del mundo también se realizan investigaciones teniendo como tema principal a los propóleos. Brasil es uno de los países que más tiempo a dedicado a ello y tal es la importancia de sus investigaciones que México realizó su propia norma basándose en la de ese país con el fin de establecer los requerimientos mínimos que deben cumplir los propóleos para su procesamiento y comercialización<sup>39</sup>.

Por otro lado, de los geopropóleos, que son producidos por abejas cuya característica distintiva es no tener aguijón, se conoce muy poco, por esta razón se planteó como objetivo general de este trabajo determinar la capacidad antioxidante y antibacteriana que presentan 11 muestras de geopropóleo recolectadas en Puebla, México. Para lograr este objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Preparar extractos hexánicos y etanólicos de las muestras recolectadas de geopropóleos.
- Realizar una comparación cualitativa del contenido de fenoles y flavonoides de presentes en los extractos etanólicos y hexánicos.
- Determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos de geopropóleos.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos por medio del ensayo de decoloración del radical libre DPPH.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólicos y hexánicos de los geopropóleos, utilizando como microorganismos de prueba a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus mutans*.

## 4 Desarrollo experimental

### 4.1 Recolección de las muestras de geopropóleos

Las 11 muestras de geopropóleos utilizadas para este estudio fueron recolectadas por el Biólogo Jorge Jiménez Díaz entre los meses de marzo y mayo del año 2017 en los municipios de Cuetzalan y Rayón en el estado de Puebla. Las muestras se mantuvieron en congelación hasta el momento de la extracción. En el Cuadro 2 se enlistan las zonas de recolección de los geopropóleos.

**Cuadro 2.** Apiarios y zonas de recolección de los geopropóleos.

Muestra	Apiario	Ubicación
1	Don Miguel	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Coapan
2	Don Pedro	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Coapan
3	Don Miguel	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Coapan
4	Sra. Minerva	Jonotla, San Antonio Rayón
5	Sra. Minerva	Jonotla, San Antonio Rayón
6	Don Pedro	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Coapan
7	Baudel	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Pahuata
8	Baudel	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Pahuata
9	Lázaro	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Texochico
10	Don Miguel	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Coapan
11	Lázaro	Cuetzalan, Santiago Yancuitlalpan, Texochico

### 4.2 Obtención de los extractos hexánicos (EH)

Para realizar la extracción se pesaron aproximadamente 10 g de geopropóleo, se adicionaron 200 mL de hexano y se mantuvieron en maceración por 72 h; transcurrido este tiempo se filtraron al vacío y el disolvente se eliminó con el auxilio del rotavapor a 50 °C. Este proceso se realizó por duplicado desde la adición de hexano.

#### **4.3 Obtención de los extractos etanólicos (EE)**

Posterior a la extracción con hexano se adicionaron 200 mL de etanol al 96% por 72 h, se filtró al vacío y se evaporó hasta sequedad en un rotavapor a 50 °C. Este proceso se realizó por duplicado para cada muestra.

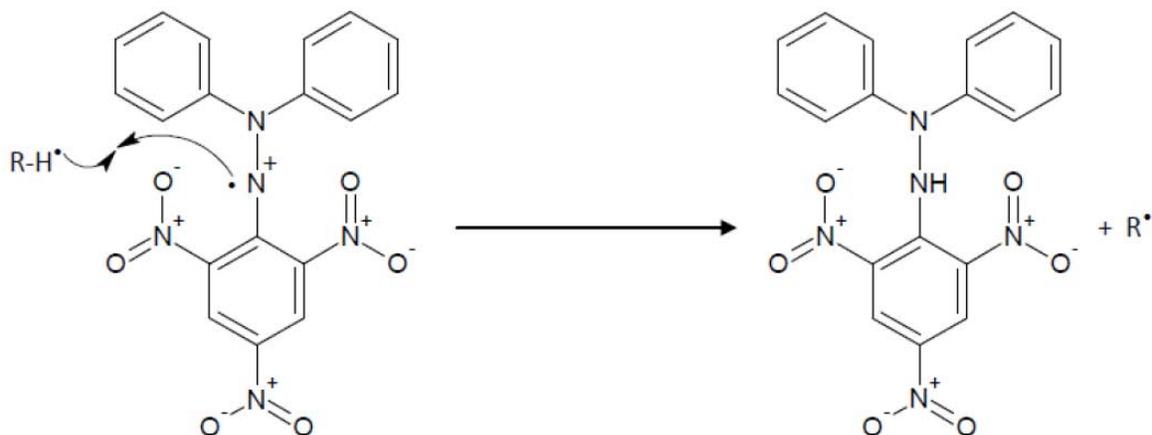
#### **4.4 Perfil cromatográfico por cromatografía en capa fina (CCF) de los EEP y EHP**

El perfil cromatográfico de las muestras de geopropóleo se realizó preparando disoluciones de los extractos con una concentración aproximada de 2 mg/mL, utilizando diclorometano como disolvente para los EHG y MeOH para los EEG.

Con un capilar se realizaron 25 aplicaciones de cada disolución en placas de aluminio cubiertas de silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), posteriormente, se probaron diferentes sistemas de elución para ambos extractos. En los EHG se probaron proporciones de hexano:cloroformo y para los EEG se probaron proporciones de acetato de etilo:MeOH y acetato de etilo:hexano. Las placas se revelaron con DPPH, AlCl<sub>3</sub> y anisaldehído sulfúrico.

#### **4.5 Evaluación de la actividad antioxidante**

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el bioensayo de la capacidad de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) siguiendo los protocolos descritos en la literatura<sup>40,41</sup>. El radical libre de color púrpura reacciona con el agente neutralizante para producir 1,1-difenil-2-picrilhidrazina como se puede ver en la Figura 9<sup>42</sup>.



**Figura 9.** Reacción de aclaramiento de DPPH.

#### 4.5.1 Curva patrón de Trolox

En primer lugar, se prepararon disoluciones de DPPH (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.216 mM y de Trolox (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$  en metanol. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se colocaron de la columna dos a la nueve 100  $\mu\text{L}$  de metanol y en la columna uno 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de Trolox. Como paso siguiente, se realizaron las diluciones seriadas de los extractos de prueba hasta la columna 9. En las columnas 10 - 12 se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de DPPH, Trolox y metanol, respectivamente. Finalmente, de la columna 1 a la 9 se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de DPPH. La microplaca con la mezcla de reacción se mantuvo durante 30 min en la oscuridad y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. La curva de calibración se construyó en un intervalo de concentración 500 a 1.95  $\mu\text{M}$  de Trolox.

#### 4.5.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los EE de geopropóleo

Para evaluar la capacidad antioxidante de cada muestra se pesaron 10 mg del extracto etanólico y se disolvieron en 1 mL de metanol. El llenado de la placa se realizó colocando un blanco de metanol en la columna 1, un blanco de muestra en la columna 2 realizando diluciones seriadas desde la fila A hasta la H (2.5 a 0.019 mg/mL), muestra con DPPH en la columna 3 con las mismas diluciones y DPPH solo. La prueba se realizó por triplicado

para muestra y las condiciones de tiempo y lectura fueron las mismas a la de la curva. Los datos obtenidos se introdujeron en la siguiente ecuación para obtener el porcentaje de atrapamiento de DPPH, el cual es necesario para el cálculo de la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>)<sup>43</sup>. Los modelos utilizados fueron el lineal, semilogarítmico y doble recíprocos mostrados en el anexo II.

$$\% \text{ de Atrapamiento de DPPH} = \left[ 1 - \frac{Abs_{Muestra+DPPH} - Abs_{Muestra}}{Abs_{DPPH} - Abs_{metanol}} \right] \times 100$$

#### 4.6 Determinación del contenido de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu<sup>44</sup> en microescala.

##### 4.6.1 Curva patrón

Para la construcción de la curva patrón se utilizó una curva de 96 pozos y ácido gálico (Sigma-Aldrich) en un rango de concentración de 0.39 a 25.0 µg/mL. Dicha curva se preparó a partir de una disolución stock de 800 µg/mL de ácido gálico y realizando diluciones seriadas de forma similar al punto 4.4.1. Posteriormente, a cada pozo se adicionaron 20 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma-Aldrich) y se mantuvo por 15 min en la oscuridad. Como paso siguiente, se adicionaron 80 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 8% (m/V) y se mantuvo por 1 h en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm.

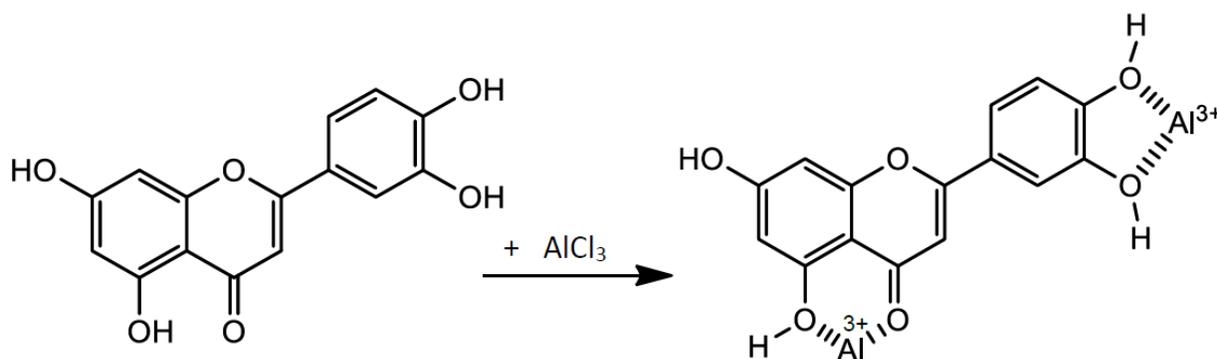
##### 4.6.2 Cuantificación de fenoles totales en los EE de geopropóleo

Para cuantificar los fenoles totales se prepararon disoluciones del extracto etanólico de cada muestra con una concentración de 10 mg/mL en metanol. Como paso que sigue, en una placa de 96 pozos se colocaron 10 µL de la disolución anterior, 90 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ, 20 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar en oscuridad por 15 min. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 80 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 8% (m/V), se agitó

suavemente y se mantuvo por 1 h en la oscuridad. Por último, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm y se interpolaron los valores en la curva patrón para expresar los resultado en  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto etanólico. El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

#### 4.7 Determinación del contenido de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales presentes en las muestras se realizó con un procedimiento modificado como se encuentra descrito en la literatura<sup>41</sup>. En la Figura 10 se muestra la reacción de complejación entre flavonoides y sales de aluminio<sup>45</sup>.



**Figura 10.** Reacción entre flavonoides y sales de aluminio.

##### 4.7.1 Curva patrón de quercetina

Se preparó una curva patrón utilizando como referencia a la quercetina (Sigma-Aldrich). Las diluciones necesarias se realizaron en una placa de 96 pozos iniciando con una concentración de 0.1 mg/mL hasta la última con 0.00234 mg/mL.

##### 4.7.2 Cuantificación de flavonoides totales en los EE de geopropóleo

Para la cuantificación de los flavonoides totales se pesaron 10 mg del EE y disolvieron en 1 mL de metanol, de esta disolución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se colocaron en un pozo de

una placa, posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  (J.T. Baker) al 2% y se dejó reposar por 15 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda 420 nm y se interpolaron los valores en la curva patrón para expresar los resultados en  $\mu\text{g}$  equivalentes de quercetina por gramo de extracto etanólico. El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

#### **4.8 Evaluación de la actividad antibacteriana**

Para determinar el efecto de los geopropóleos sobre el crecimiento bacteriano se utilizó el método de microdilución en placa de 96 pozos siguiendo los criterios establecidos por el CLSI. Para realizar este bioensayo se pesaron 10 mg, tanto de los EEG como los EHG, y se disolvieron en DMSO al 5% en agua. A continuación, se describe brevemente el proceso utilizado. En todos los pozos de la placa se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo BHI y 100  $\mu\text{L}$  de muestra únicamente en la primera columna (8 muestras por placa), de la cual se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para realizar diluciones seriadas hasta la columna 10. Posteriormente, a cada pozo, se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de medio BHI y 20  $\mu\text{L}$  de la bacteria a probar a una escala de 0.5 de McFarland. En la columna 11 se colocó el control positivo (digluconato de clorhexidina) y en la columna 12 el control negativo (medio BHI). Por último, las placas se incubaron por 24 hrs a 37 °C.

Las bacterias utilizadas fueron *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Streptococcus mutans* (ATCC 10449)

## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Rendimiento de los EHGP y EEGP

La extracción de cada una de las muestras de geopropóleo se realizó utilizando en primer lugar hexano. Esta extracción permitió la obtención de los componentes menos polares de los geopropóleos. En la literatura en estudios previos se ha descrito la presencia de componentes de tipo terpenoide en muestras recolectadas en Brasil y Venezuela. Los rendimientos que se obtuvieron para esta extracción se encontraron en un rango de 32.77 a 62.05 %. Estos rendimientos también son consistentes con reportes previos en la literatura<sup>15,46</sup>.

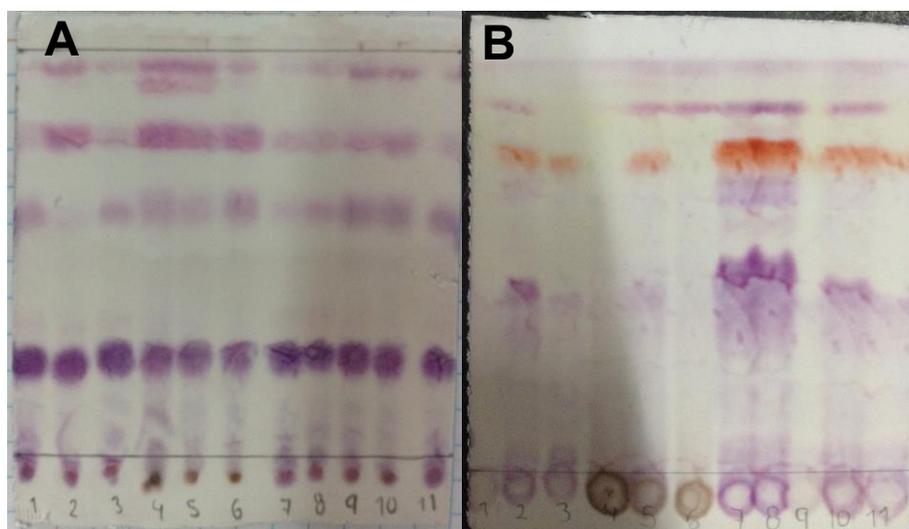
La segunda extracción de las muestras se realizó utilizando etanol 96 % como disolvente de extracción. La selección de este disolvente se realizó con base en los reportes previos encontrados en la literatura<sup>18</sup>. Los rendimientos que se obtuvieron para los extractos etanólicos se encontraron en un rango de 5.92 a 25.41 %.

**Cuadro 3.** Rendimiento de la extracción hexánica y etanólica de las muestras e geopropóleo analizadas

Muestra	Rendimiento (%)	
	EH	EE
1	32.77	17.07
2	39.92	10.46
3	48.90	20.05
4	62.05	5.92
5	60.92	9.79
6	54.74	10.73
7	42.80	25.41
8	38.86	8.80
9	51.76	12.29
10	57.24	10.56
11	45.71	17.63

## 5.2 Perfil cromatográfico por cromatografía en capa fina (CCF) de los EEP y EHP

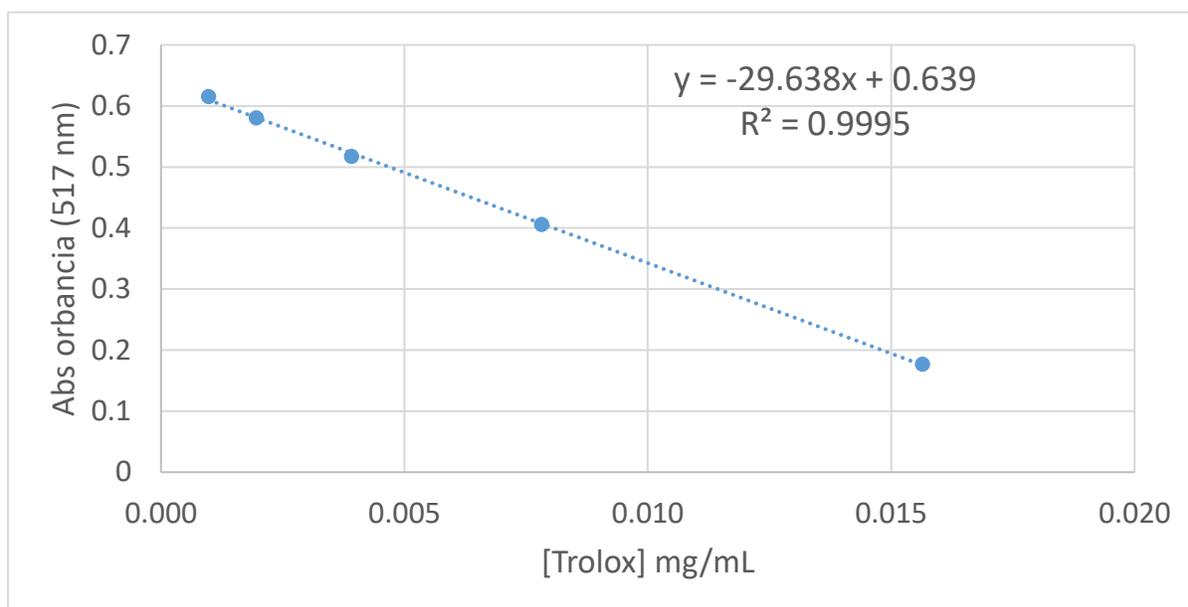
Con la finalidad de conocer el perfil cromatográfico de cada uno de los extractos hexánicos y etanólicos se realizó la cromatografía en capa fina de cada una de las 11 muestras. En la Figura 11A se muestra la cromatoplaqueta obtenida para los extractos hexánicos de cada geopropóleo. En esta placa se observó que las 11 muestras tuvieron un patrón cromatográfico muy similar, por el color obtenido al ser tratados con un agente cromógeno anisaldehído sulfúrico se puede sospechar de la presencia de terpenoides y ácidos grasos como componentes principales. Wagner (1996)<sup>47</sup> describe que los triterpenoides al ser tratados con anisaldehído como agente cromógeno desarrollan colores que varían de azul intenso a rojo. Por otra parte, los extractos etanólicos (Figura 11B) de las muestras también fueron muy similares entre si y no se observaron diferencias significativas entre ellos. El tratamiento con el agente cromógeno anisaldehído sulfúrico permitió la detección presuntiva de terpenoides y flavonoides. Los perfiles cromatográficos son similares a otros obtenidos previamente de geopropóleos brasileños en los cuales se determinó que los componentes principales de los geopropóleos son de tipo flavonoide y triterpenoide<sup>17,18</sup>.



**Figura 11. A.** EHG. Sistema de elución: hexano:diclorometano.  
**B.** EEG. Sistema de elución: AcOEt:MeOH. Agente cromógeno: anisaldehído-sulfúrico.

### 5.3 Determinación de la actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se utilizaron concentraciones en un rango de 0.000489 mg/mL hasta 0.125145 mg/mL de Trolox y se encontró que el intervalo lineal se ubica entre 0.015643 mg/mL y 0.000978 mg/mL. En este caso, la pendiente de la recta es negativa, ya que a mayor concentración de antioxidantes, menor concentración del radical libre DPPH y, por lo tanto, menor absorbancia a esa longitud de onda.

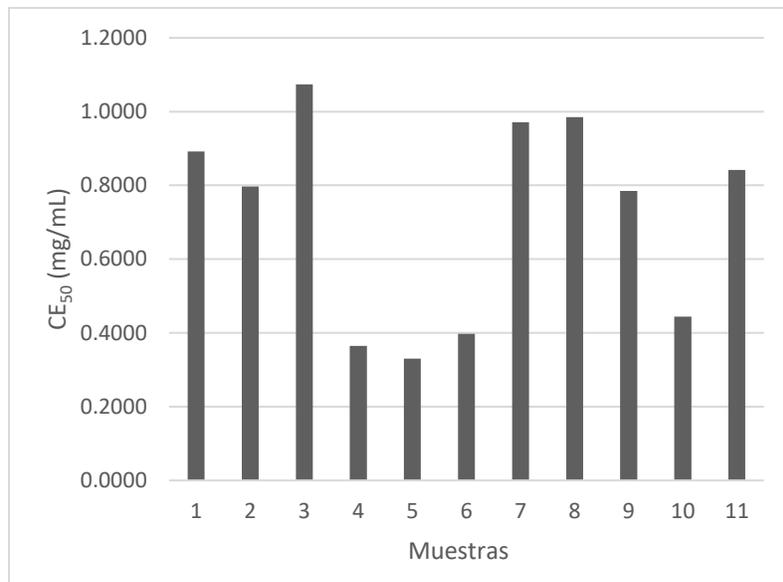


**Figura 12.** Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando como referencia a el Trolox.

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó mediante el análisis de una curva dosis-respuesta, en este caso, concentración del EEG contra el porcentaje de atrapamiento de los radicales libres DPPH. Se realizó una interpolación para estimar la concentración a la cual se atrapa el 50 % de los radicales libres DPPH con el modelo que mejor se ajustó a una tendencia lineal. En los 11 casos se observó una mejor tendencia con el modelo de los dobles recíprocos. (Anexo II). Los resultados se muestran en el Cuadro 4 y Figura 13.

**Cuadro 4.** CE<sub>50</sub> en mg de extracto etanólico de geopropóleo por mL (mg EEG/mL).

Muestra	CE <sub>50</sub> mg/mL
1	0.8922
2	0.7971
3	1.0735
4	0.3649
5	0.3301
6	0.3977
7	0.9714
8	0.9846
9	0.7846
10	0.4444
11	0.8421

**Figura 13.** Comparación de la CE<sub>50</sub> de las muestras de geopropóleos en mg de EEG/mL.

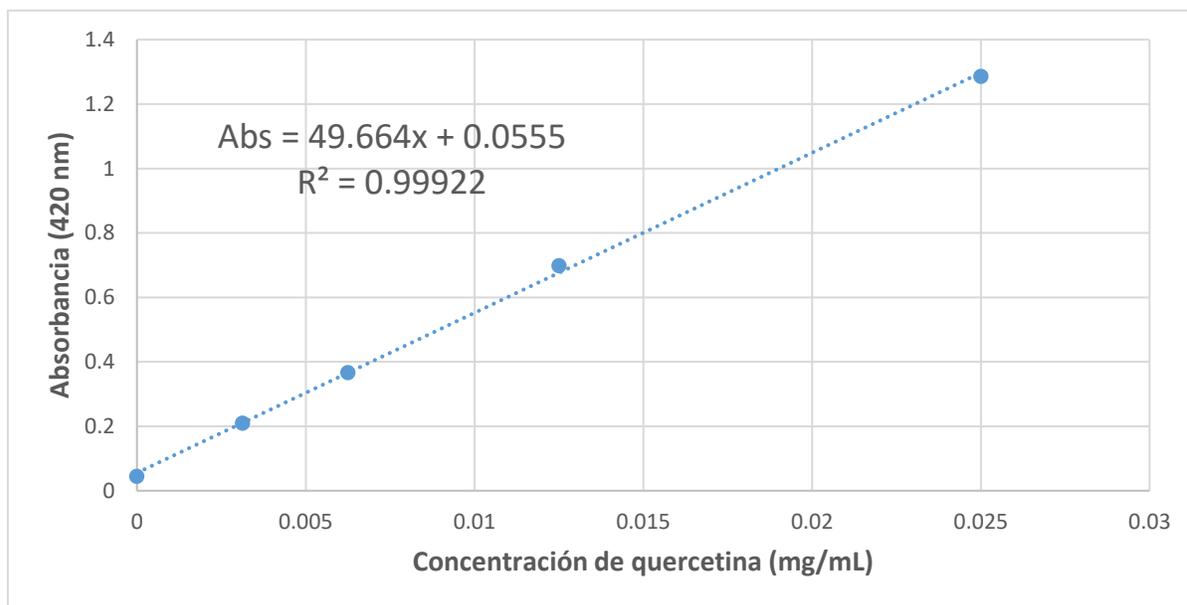
El intervalo de la CE<sub>50</sub> encontrada fue de 0.3301 a 1.0735 mg EE/mL. En la Figura 13 se puede observar que los mejores geopropóleos son el M4 y M5 provenientes de San Antonio Rayón, seguidos de M6 y M10 provenientes de Coapan. Por otro lado, el resto de las muestras requirieron prácticamente el doble de extracto para generar el mismo efecto, esto destaca ya que algunos de ellos fueron recolectados en la misma zona que M6 y M10.

En la literatura, la CE<sub>50</sub> de los extractos provenientes de abejas de la familia melipona se encuentran entre 0.00424 a 0.5 mg EE/mL<sup>14,16,20–22,48</sup>, sin embargo, la mayoría de ellos no rebasan los 0.05 mg EE/mL. Por lo tanto, de forma general, los geopropóleos producidos por *Scaptotrigona mexicana* presentan baja actividad antioxidante.

#### 5.4 Determinación de la cantidad de flavonoides totales

De acuerdo a la literatura, los flavonoides son los productos naturales a los cuales se les atribuyen las propiedades medicinales mencionadas anteriormente además de ser

utilizado como un parámetro de calidad. Para la determinación de flavonoides totales se realizó una curva de calibración con quercetina con un intervalo lineal entre 0.0 mg/mL y 0.025 mg/mL. En la Figura 14 se ilustra la curva y la ecuación de la recta correspondiente.

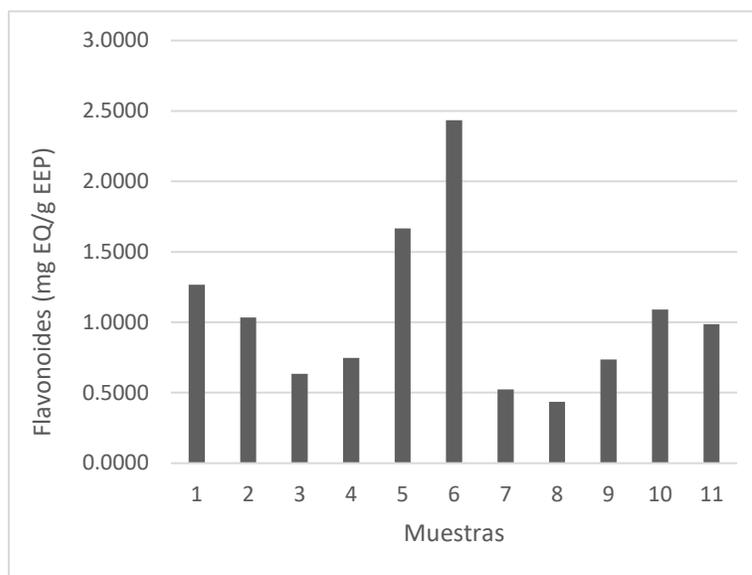


**Figura 14.** Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales utilizando como referencia a la quercetina.

Las muestras se analizaron en las mismas condiciones a la de la curva patrón y se observó que todas se encontraban dentro del intervalo lineal. Posteriormente, se relacionó la masa para preparar las disoluciones con el valor de la concentración de flavonoides totales para obtener la cantidad de miligramos equivalentes de quercetina por cada gramo de extracto (mg EQ/ g EEG). Estos resultados se muestran en el Cuadro 5 y una comparación entre muestras en la Figura 15.

**Cuadro 5.** Flavonoides totales en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg EQ/g de EEP)

Muestra	mg EQ/g EEP
1	1.3330
2	1.0279
3	0.6343
4	0.7460
5	1.6672
6	2.4334
7	0.5235
8	0.4359
9	0.7359
10	1.0913
11	0.9866



**Figura 15.** Comparación de la cantidad de flavonoides totales presentes en las muestras por cada g de EEP.

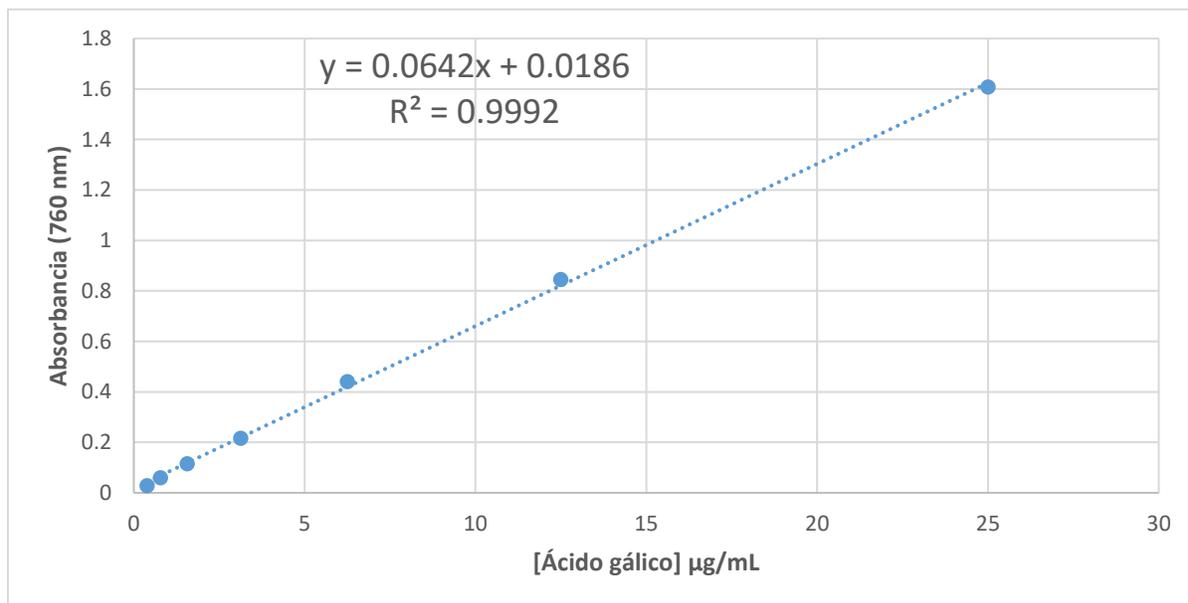
Entre las muestras analizadas destaca la cantidad presente de flavonoides en M5 y M6, con más de 1.5 mg EQ/g EEP, ambas recolectadas en diferentes lugares, San Antonio Rayón y Coapan respectivamente. A pesar de ello, no son lo suficientemente altas para cumplir con el criterio de calidad establecido en la norma (5 mg EQ/ g EEG).

En la literatura, se ha reportado un valor de flavonoides totales de 25.4 mg EQ/ g EEP<sup>22</sup>, este geopropóleo fue producido por la especie *Melipona quadrifasciata anthidiodes*, ubicada en el Noroeste de Brasil, zona que pertenece a un tipo diferente de propóleos (tipo III), esta probablemente sea la razón de la diferencia tan grande que existe entre las muestras.

A inicios de este año se reportó el análisis por HPLC de 59 muestras y una de ellas es de meliponinos ubicados en Cuetzalan, Puebla, se reporta que no fue posible la detección por la baja cantidad de flavonoides. Este resultado es comparable con el obtenido de las 11 muestras analizadas en este estudio.

### 5.5 Determinación de la cantidad total de fenoles

En la determinación de la cantidad total de fenoles se construyó una curva de calibración de ácido gálico. En la Figura 16 se ilustra esta curva y la ecuación de la recta correspondiente.



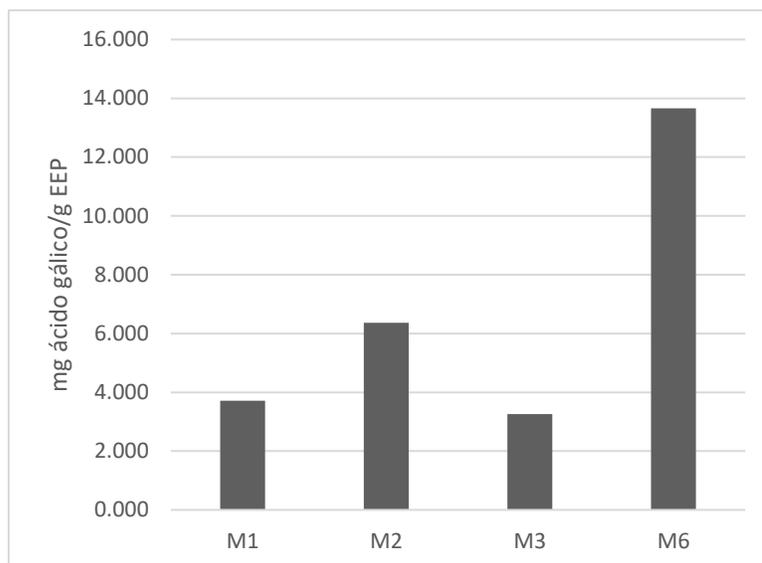
**Figura 16.** Curva de calibración para determinar la cantidad total de fenoles utilizando ácido gálico.

Para realizar esta determinación se probaron diferentes proporciones de MeOH:H<sub>2</sub>O para preparar las disoluciones iniciales de los extractos ya que, con la propuesta en el desarrollo experimental, se generaba un precipitado en las microplacas al momento de mezclar con los otros componentes de la reacción, al probar diferentes proporciones se disminuyó la formación del precipitado pero se observaba una disolución de aspecto lechoso, impidiendo la lectura correcta del resto de las muestras

Los datos de absorbancia se interpolaron en la curva y la concentración se relacionó con la cantidad de extracto utilizado para preparar las disoluciones, este resultado final se expresó en mg EAG/g EEG mostrados en el Cuadro 6 y Figura 17.

**Cuadro 6.** Cantidad total de fenoles en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/ g de EEG)

Muestra	mg EAG/g EEG
1	3.709
2	6.368
3	3.263
6	13.657



**Figura 17.** Comparación de la cantidad total de fenoles en mg equivalentes de ácido gálico por g de EEG.

Comparando estos resultados con los de las pruebas anteriores, se observa una relación directa en M2, M3 y M6 con el contenido de fenoles, flavonoides y  $CE_{50}$ , siendo M6 la más representativa por tener los mejores resultados en las tres pruebas: En M1 hay una baja actividad antioxidante y pocos fenoles pero la cantidad de flavonoides es mayor a la que se esperaba.

Con respecto a la literatura, los resultados obtenidos continúan siendo bajos ya que se reportan valores de hasta 201.6 mg EAG/ g EE<sup>48</sup> en especies meliponas, por lo tanto, esta baja cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides explica la poca actividad antioxidante de las muestras.

## 5.6 Evaluación de la actividad antibacteriana

Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizaron tres bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. La primera

de ellas se evaluó por ser un oportunista que infecta pulmones y las vías respiratorias, vías urinarias, heridas, y también puede causar sepsis y neumonías. *Staphylococcus aureus* es el principal causante de las infecciones nosocomiales, además de infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas. El estudio de *Streptococcus mutans* es debido a que es el principal agente de la formación caries, por su capacidad de producir glucosiltransferasas, las cuales le ayudan a sintetizar glucanos a partir de sacarosa, éstos glucanos permiten la formación de la placa dentobacteriana.

Las determinadas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para las tres bacterias probadas se muestran en el Cuadro 7. Las concentraciones límite de los extractos etanólicos de geopropóleo de 1000 µg/mL no inhibieron el crecimiento de las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Estos resultados contrastan con los descritos por Santos et al. (2017) para un EEG de *Melipona mondury* inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* a una concentración de 250 µg/mL y con una concentración >1000 µg/mL para *S. aureus*<sup>49</sup>. Por otra parte, el EEG inhibió el crecimiento de la bacteria *S. mutans* a concentraciones de 500 µg/mL. Otra investigación utilizando la bacteria cariogénica de *S. mutans* reportó que el EEG generó un halo de inhibición con concentraciones más elevadas a las probadas en este estudio (6.25 mg/mL y 12.5 mg/mL)<sup>23</sup>, indicando que, de forma general, la concentración de los compuestos antibacteriales en los geopropóleos son bajas y no son capaces de generar dicha actividad.

Por otra parte, los EHG tuvieron CMI mayores a las concentraciones probadas para las tres bacterias. Estos resultados son consistentes con los reportados por Santos et al. (2017) para *P. aeruginosa* y *S. aureus* quienes reportan CMI de 1000 y 500 µg/mL, respectivamente.

**Cuadro 7.** Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos hexánicos (EHG) y etanólicos (EEG) de los geopropóleos

Muestra	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	EEG			EHG		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
2	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
3	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
4	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
5	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
6	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
7	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
8	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
9	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
10	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
11	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000

## 6 Conclusiones

- El análisis de los extractos hexánicos de los geopropóleos (EHG) recolectados en Santiago Rayón y Cuetzalan por cromatografía en capa fina permitió determinar que los extractos tenían una gran similitud entre ellos. Por otra parte, los extractos de etanol (EEG) también fueron similares y no se observaron diferencias significativas.
- El contenido de flavonoides y fenoles determinado para los diferentes extractos analizados fue menor a 2.5 mg EQ/g EEG y menor a 1.4 mg EAG/g EEG. Estos resultados permiten concluir que ninguna de las muestras cumple con los criterios de calidad establecidos por la Norma Mexicana de Propóleos (NOM-003-SAG/GAN-2017) con concentraciones de 5 mg EQ/g EEG y 50 mg AEG/g EEG para flavonoides y fenoles totales, respectivamente.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) calculadas para los extractos hexánicos de geopropóleo (EHG) fueron mayores a 1000 µg/mL, mientras que las correspondientes a los extractos etanólicos de propóleo (EEG) en el rango de 500 a 1000 µg/mL. Las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos EHG y EEG no son comparables a las determinadas para el control positivo (CHX) utilizado y de acuerdo con la literatura se pueden considerar como poco activos.

## 7 Perspectivas

Evaluar los efectos antiparasitarios contra *Leishmania spp.* y antifúngicos contra *Candida albicans* que presentan los extractos hexánicos (EHG) y etanólicos (EEG).

Realizar análisis fitoquímico de los compuestos activos presentes en los geopropóleos.

Ampliar el perfil antibacteriano con un mayor número de cepas bacterianas de interés clínico.

Agregar muestras de otras regiones de México para tener una visión más general de los geopropóleos.

Encontrar otros disolventes o mezcla de ellos que mejoren la solubilidad de los extractos en la prueba de fenoles.

**Bibliografia**

1. Salatino, A., Teixeira, É. W., Negri, G. & Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2**, 33–38 (2005).
2. Toretí, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M. & Park, Y. K. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, 1–13 (2013).
3. Martinotti, S. & Ranzato, E. Propolis: a new frontier for wound healing? *Burn. Trauma* **3**, 9 (2015).
4. Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A. & Salatino, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 925 (2011).
5. Sharaf, S., Higazy, A. & Hebeish, A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. *Int. J. Biol. Macromol.* **59**, 408–416 (2013).
6. Marcucci, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83–99 (1995).
7. Valencia, D. *et al.* Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.* **131**, 645–651 (2012).
8. Falcão, S. I. *et al.* Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 887–897 (2010).
9. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. & Mérillon, J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 1768–1774 (2009).
10. Buratti, S., Benedetti, S. & Cosio, M. S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta* **71**, 1387–1392 (2007).
11. Yang, H. *et al.* Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China.

- Molecules* **16**, 3444–3455 (2011).
12. Rivero-Cruz, J. *et al.* Prediction of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mexican Propolis by <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy and Chemometrics Data Analysis. *Molecules* **22**, 1184 (2017).
  13. Wagh, V. D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2013**, 1–11 (2013).
  14. Silva, E. C. C. da, Muniz, M. P., Nunomura, R. de C. S., Nunomura, S. M. & Zilse, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Quim. Nova* **36**, 628–633 (2013).
  15. Dutra, R. P., Nogueira, A. M. C., Marques, R. R. D. O., Costa, M. C. P. & Ribeiro, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**, 557–562 (2008).
  16. Alves De Souza, S., Camara, C. A., Monica Sarmiento Da Silva, E. & Silva, T. M. S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
  17. Bankova, V., Christov, R., Marcucci, C. & Popov, S. Constituents of Brazilian geopropolis. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **53**, 402–406 (1998).
  18. Da Cunha, M. G. *et al.* Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med.* **82**, 190–194 (2015).
  19. Matsuno, T. A New Clerodane Diterpenoid Isolated from Propolis. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **50**, 93–97 (1995).
  20. Dutra, R. P. *et al.* Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 2549–2557 (2014).
  21. Batista, M. C. A. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas

- of Maranhão State, northeastern Brazil. *Acta Amaz.* **46**, 315–322 (2016).
22. Dos Santos, C. M. *et al.* Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–13 (2017).
  23. Liberio, S. A. *et al.* Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement. Altern. Med.* **11**, 108 (2011).
  24. Da Cunha, M. G. *et al.* Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent-nemorosone from Brazilian geopropolis. *J. Funct. Foods* **26**, 27–35 (2016).
  25. Cunha, M. G. Da *et al.* Apolar bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis on *Streptococcus mutans* biofilm. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
  26. Dias C, R., Bóby M, D., Vinicius Taveira M, M. & Alves S, V. Acción antibacteriana de geopropolis de *Melipona quadrifasciata* en cultivo de secreción de otitis en perros. *Rev. MVZ Córdoba* **22**, 5837 (2017).
  27. Araújo, M. J. A. M., Bosco, S. de M. G. & Sforcin, J. M. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Brazilian J. Microbiol.* **47**, 863–869 (2016).
  28. Bonifaz, A. Candidosis. in *Micología Médica Básica* 583 (Mc Graw Hill, 2012).
  29. Franchin, M. *et al.* Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *J. Ethnopharmacol.* **143**, 709–715 (2012).
  30. Franchin, M. *et al.* Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of nitric oxide pathway. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
  31. Coelho, G. R. *et al.* Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from

- Scaptotrigona postica against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 1–10 (2015).
32. Ribeiro-Junior, J. A. *et al.* Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 1–5 (2015).
33. Michener, C. D. *The bees of the world. The Johns Hopkins University Press* **85**, (Johns Hopkins University Press, 2007).
34. Schwarz, H. F. Stingless bees of the western hemisphere. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* **90**, 1–546 (1948).
35. Moure, J. ., Camargo, J. M. . & Garcia, M. V. . Uma nova especie de *Leurotrigona* (Hymenoptera: apidae: Meliponinae). *Bol. do Mus. Para. Emilio Goeldi. Ser. Zool.* **4**, 145–154 (1988).
36. Parra, Nates, G. Las Abejas sin Aguijón ( Hymenoptera : Apidae : Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana* **2** (3) 233-248 299 (2001).
37. Faustino, C. D., Silva-Matos, E. V., Mateus, S. & Zucchi, R. First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Insectes Soc.* **49**, 111–113 (2002).
38. Guzmán, M., Balboa, R. V., Albores, M. L. & González, J. *Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México.* (2011).
39. SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. (2017).
40. Mohamad, H. *et al.* DPPH Free Radical Scavenger Components from the Fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). *Zeitschrift für Naturforsch. C* **59**, 811–815 (2004).
41. Ahn, M.-R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.-S. & Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *J. Agric.*

- Food Chem.* **52**, 7286–7292 (2004).
42. Prieto, J. M. Procedure : Preparation of DPPH Radical , and antioxidant scavenging assay. 7–9 (2012).
  43. Yu, L. L. 9.2.1 Principles and Background. in *Wheat Antioxidants* (ed. Yu, L. L.) 120–125 (John Wiley & Sons Inc, 2008).
  44. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. in *Methods in Enzymology* **299**, 152–178 (1999).
  45. Rocha, J. C. da, Gomes, J. A. da C. P. & D'Elia, E. Aqueous extracts of mango and orange peel as green inhibitors for carbon steel in hydrochloric acid solution. *Mater. Res.* **17**, 1581–1587 (2014).
  46. Cardozo, D. V. *et al.* Chemical Variability of Geopropolis from Jataí, Mandaçaia and Mandurí Stingless Bees. *Rev. Virtual Química* **7**, 2457–2474 (2015).
  47. Wagner, H. & Bladt, S. *Plant Drug Analysis*. (Springer Berlin Heidelberg, 1996). doi:10.1007/978-3-642-00574-9
  48. Silva, T. M. S. *et al.* Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology* **61**, 660–665 (2014).
  49. Dos Santos, T. L. A. *et al.* *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *An. Acad. Bras. Cienc.* **89**, 2247–2259 (2017).

## **Anexo I Preparación de disoluciones**

### **1. Disolución de DDPH (0.2 N)**

En una balanza analítica se pesaron 17.0 mg de DPPH (Sigma-Aldrich) y se colocaron en un matraz aforado de 200.0 mL. A este matraz se le adicionó una pequeña cantidad MeOH y se agitó suavemente. Posteriormente, se adicionó el MeOH suficiente para llegar a la marca de aforo. La disolución se guardó en un frasco ámbar y en refrigeración hasta el momento de su uso para evitar la degradación.

### **2. Disolución stock de Trolox (1000 $\mu$ M)**

En una balanza analítica se pesaron 12.5 mg de Trolox (Sigma-Aldrich) y se colocaron en un matraz aforado de 50.0 mL. Posteriormente, se adicionó un poco de MeOH y se agitó suavemente. Para completar el volumen se agregó MeOH hasta llegar a la marca de aforo. La disolución se mantuvo en oscuridad y en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **3. Reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N)**

En una matraz volumétrico de 100.0 mL se colocaron 50.0 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N y se adicionó la cantidad suficiente de agua destilada para completar el volumen. La disolución se mantuvo en un frasco ámbar y en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **4. Disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 8% (m/V)**

En un matraz volumétrico de 10.0 mL se colocaron 0.8 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Laitz) y se adicionó la cantidad suficiente de agua destilada para completar el volumen.

### **5. Disolución stock de quercetina (0.2 mg/mL)**

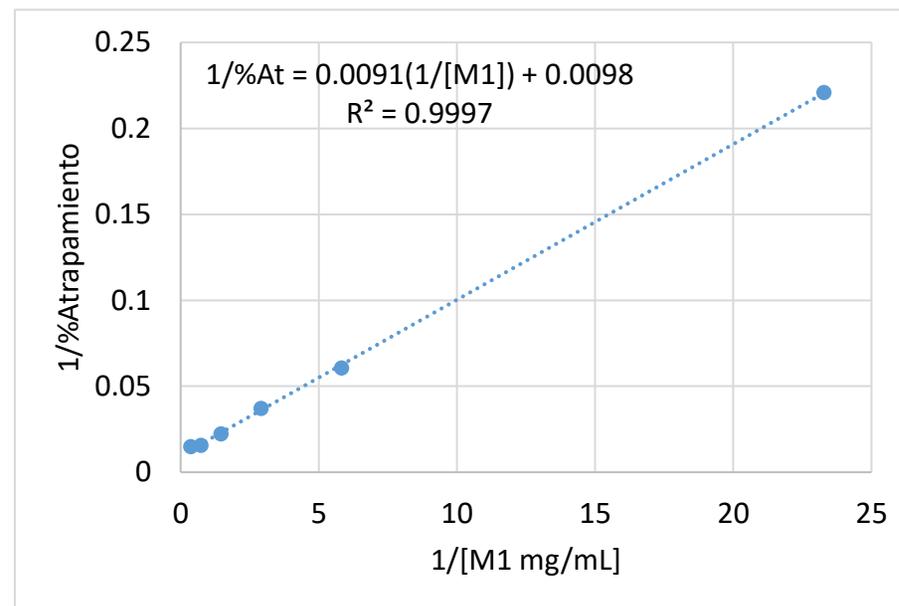
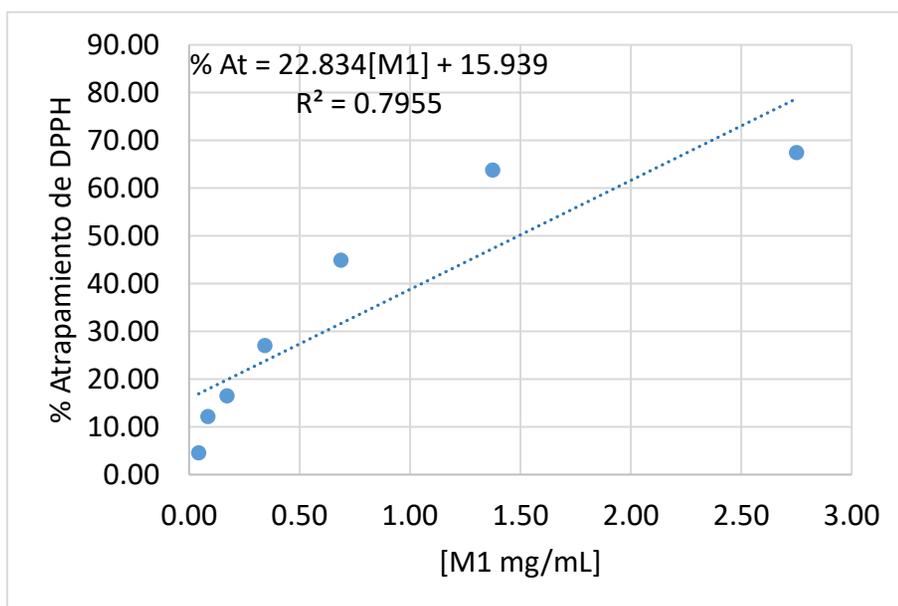
En un matraz volumétrico de 10.0 mL se colocaron 20.5 mg de quercetina (Sigma-Aldrich) y se completó el volumen con EtOH. De la disolución anterior se tomaron 2 mL y se diluyeron nuevamente a 10.0 mL con EtOH.

**6. Disolución de ácido gálico (800 µg/mL)**

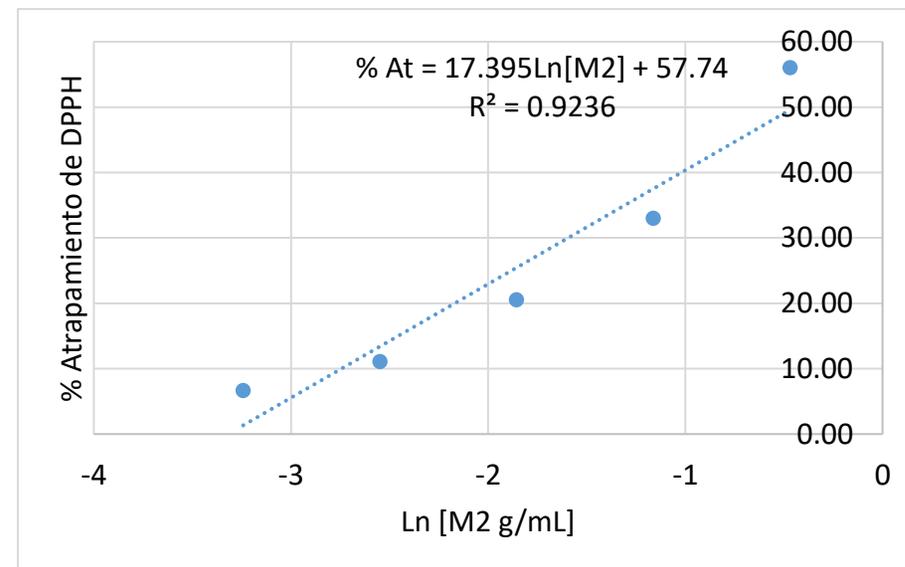
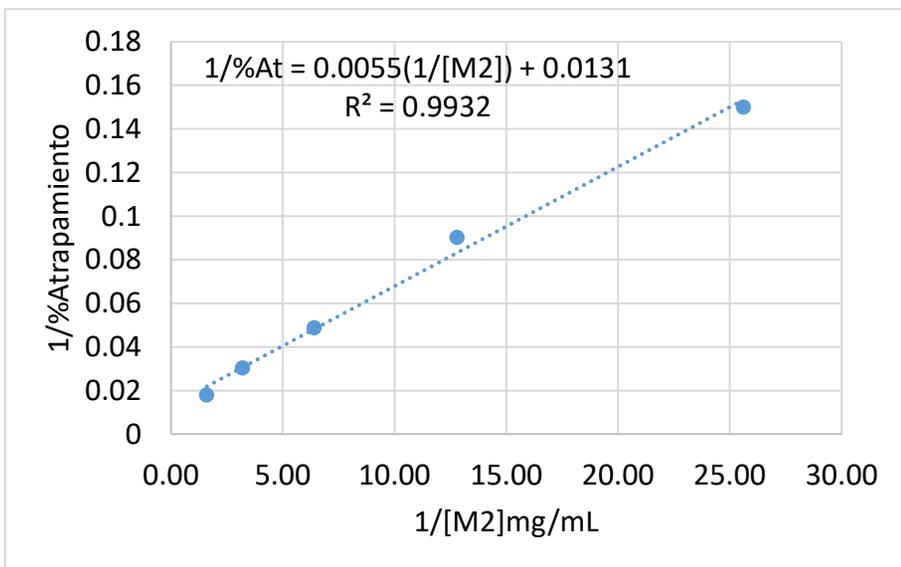
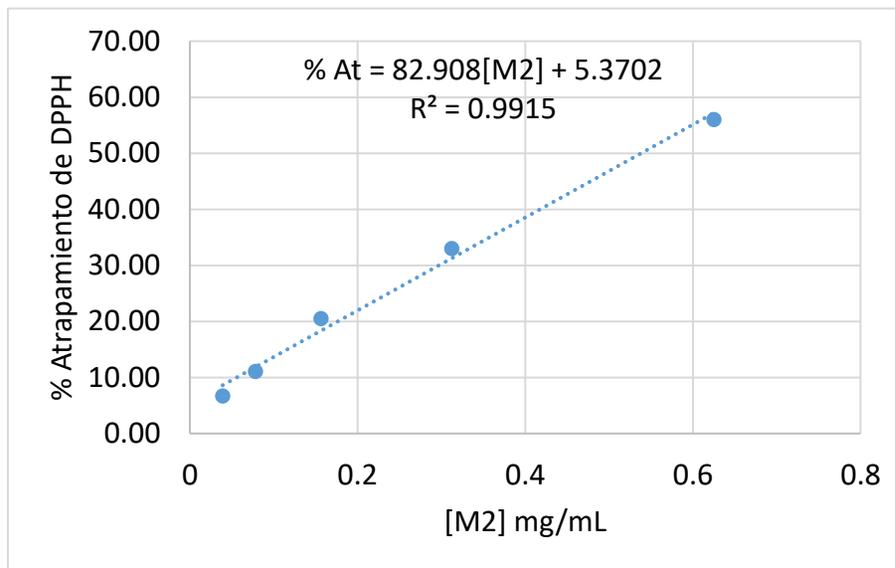
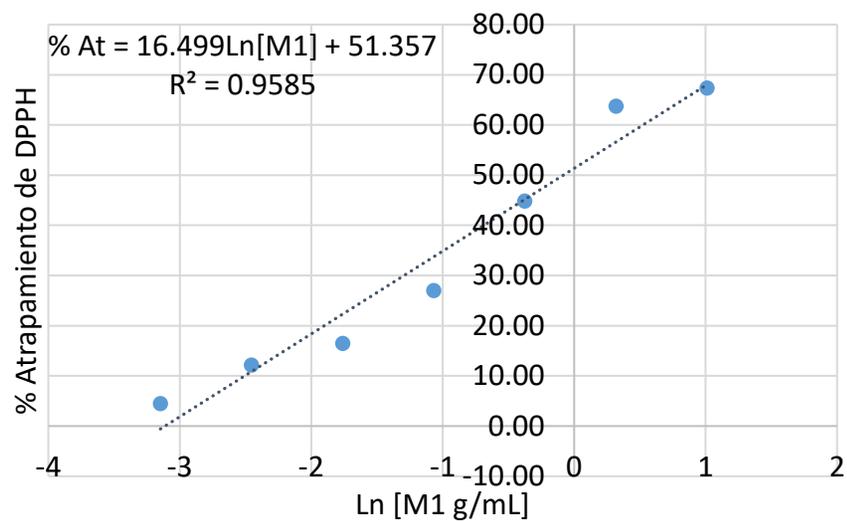
En un matraz volumétrico de 10.0 mL se colocaron 7.9 mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich) y se completó el volumen con H<sub>2</sub>O destilada. La disolución se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

**7. Disolución de AlCl<sub>3</sub> (2% m/V)**

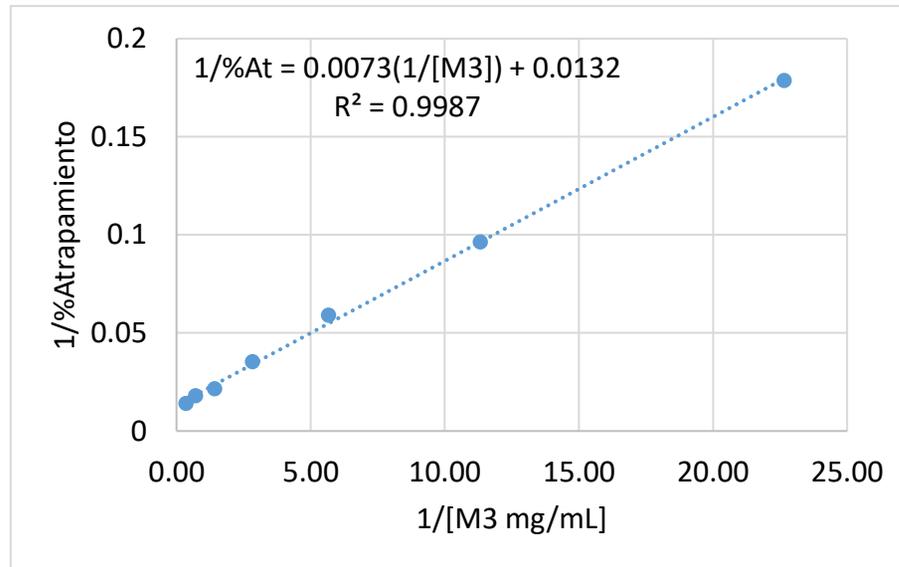
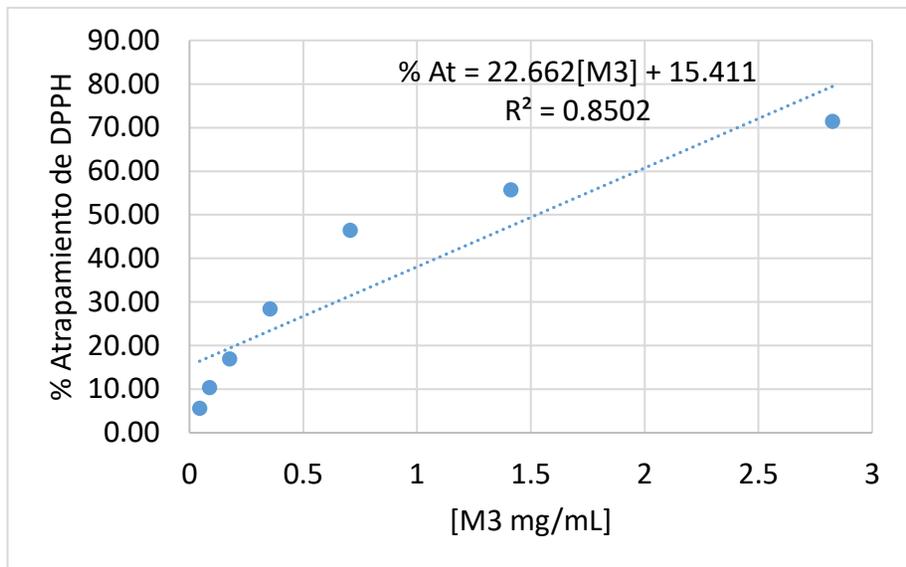
En una balanza analítica se pesaron 0.5029 g de AlCl<sub>3</sub> (J.T. Baker) y se colocaron en un matraz volumétrico de 25 mL. Se completó el volumen con la cantidad necesaria de EtOH. La disolución se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

**Anexo II Gráficas para la determinación de la  $CE_{50}$  de los EEG****Muestra 1**

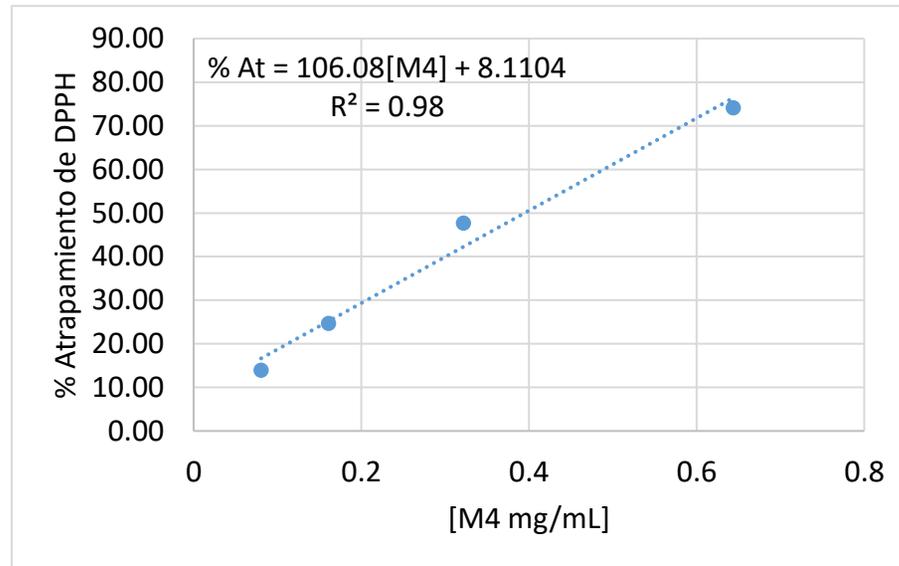
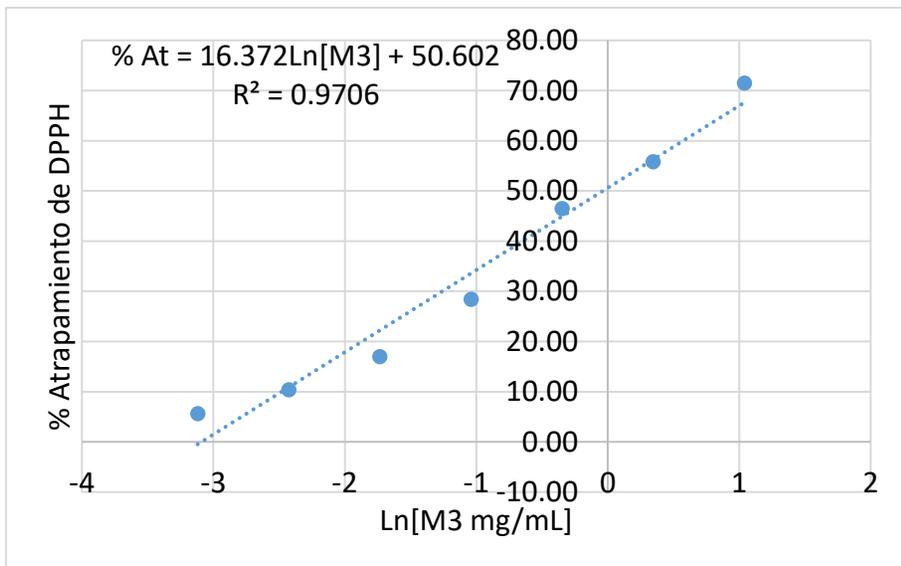
**Muestra 2**

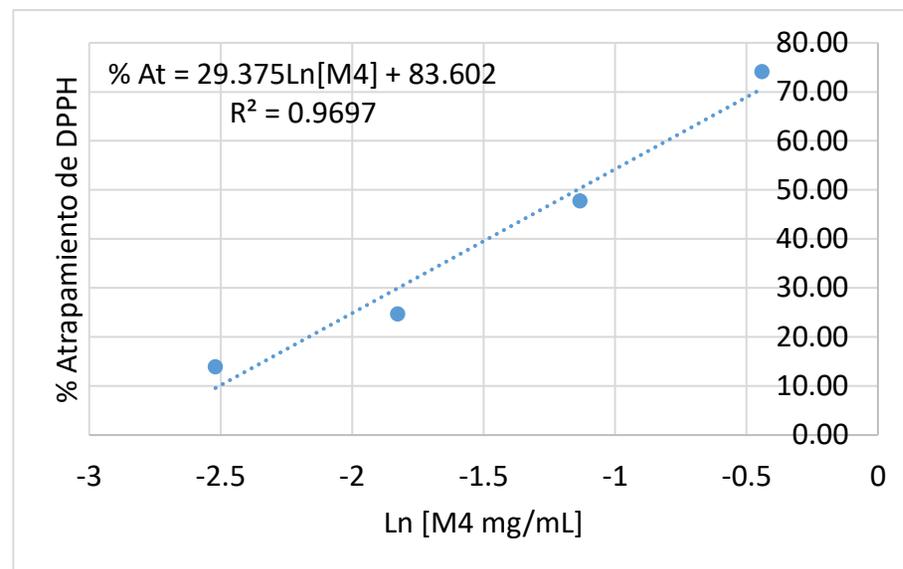
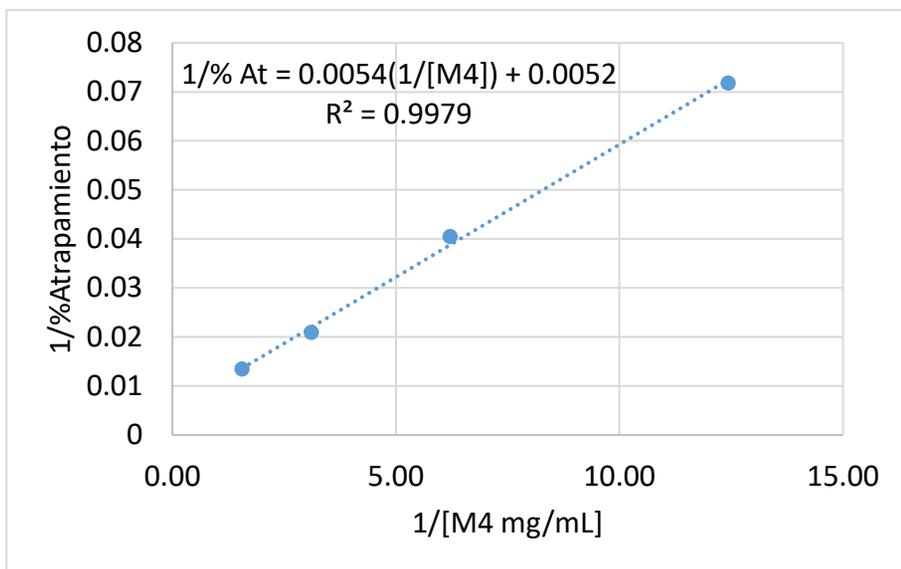


**Muestra 3**

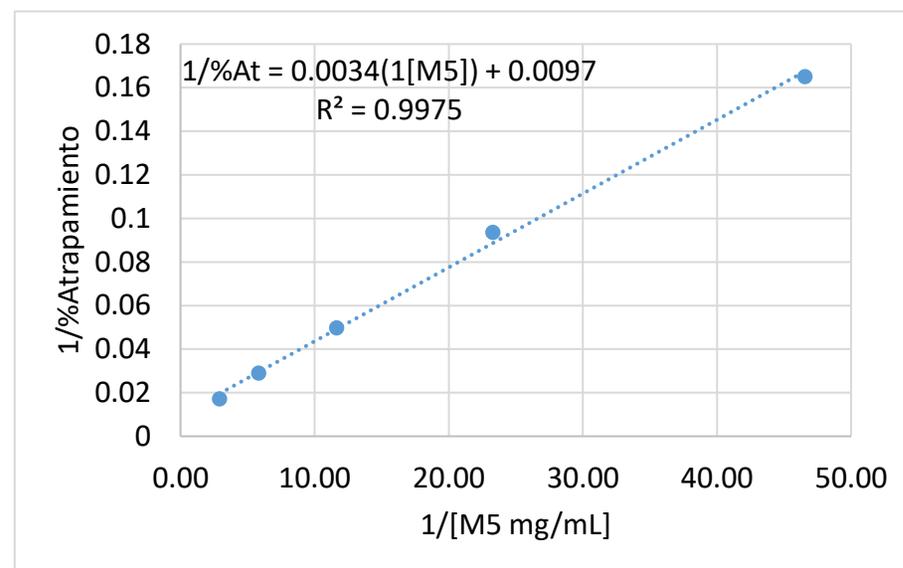
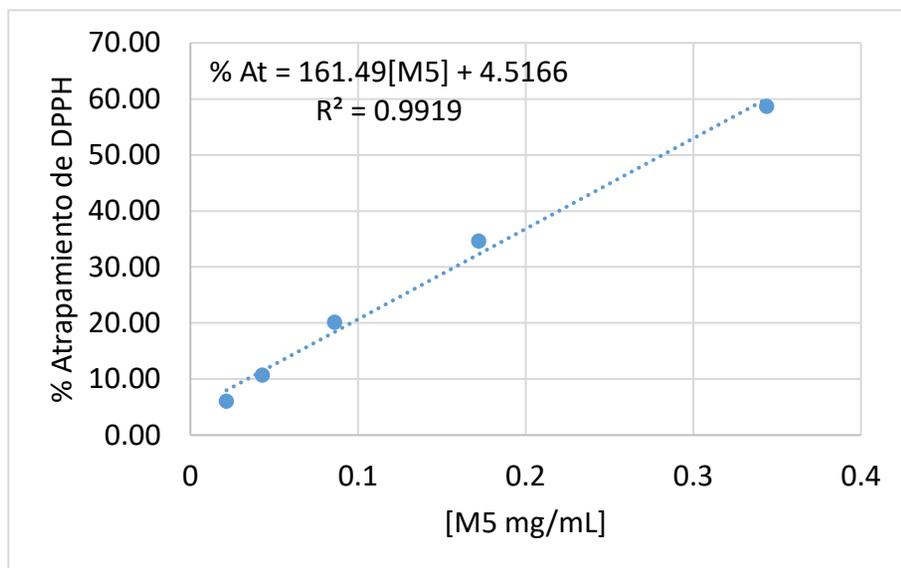


**Muestra 4**

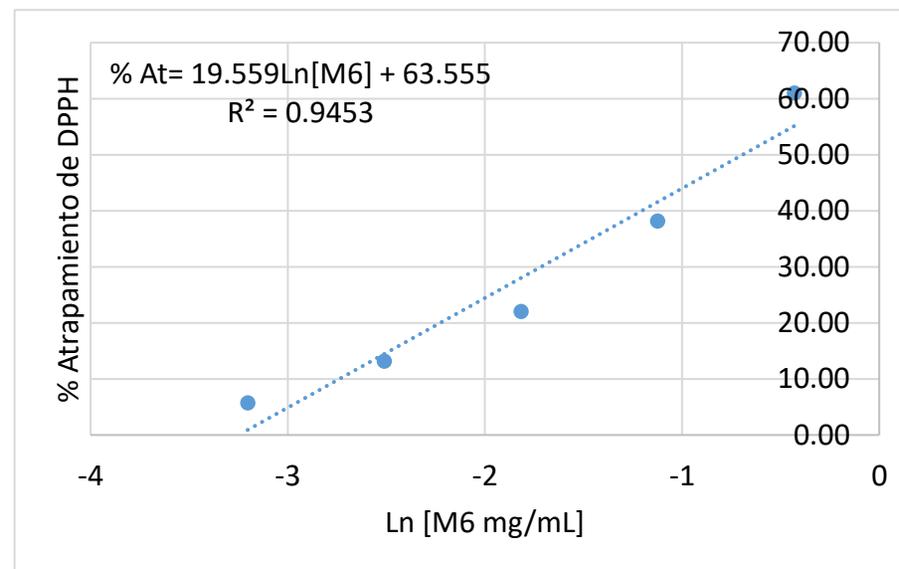
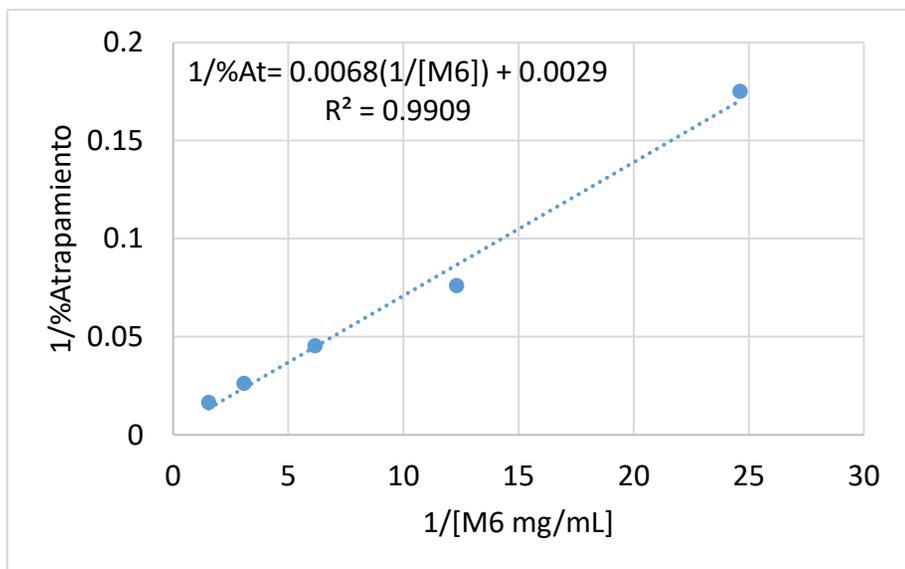
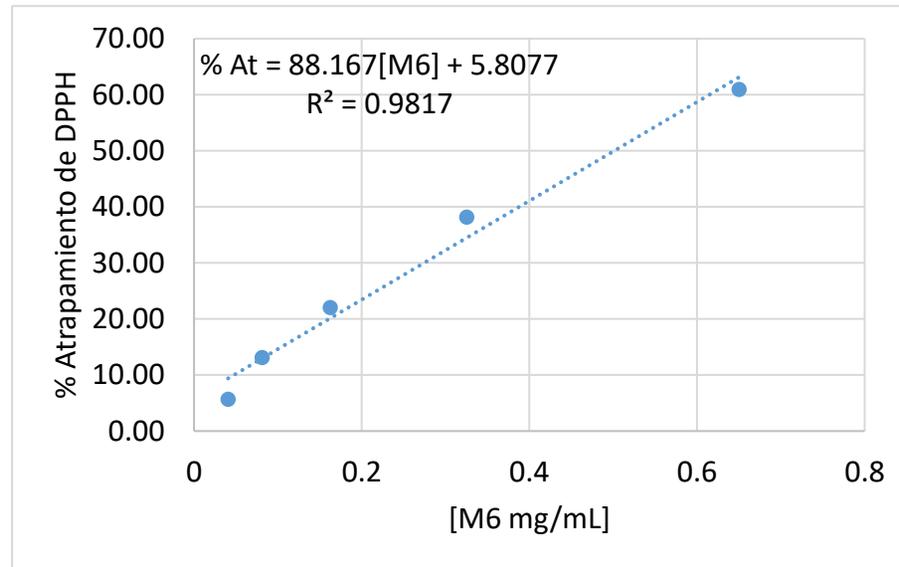
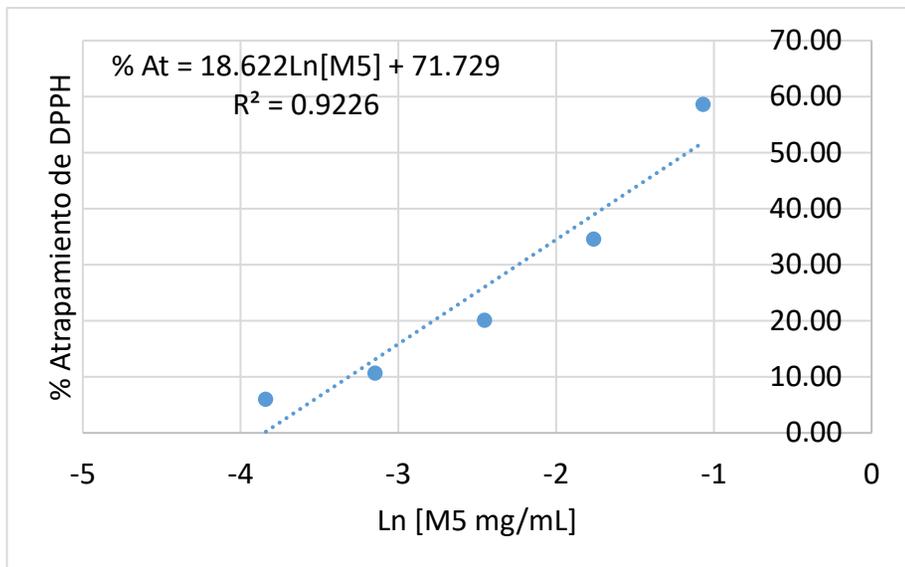




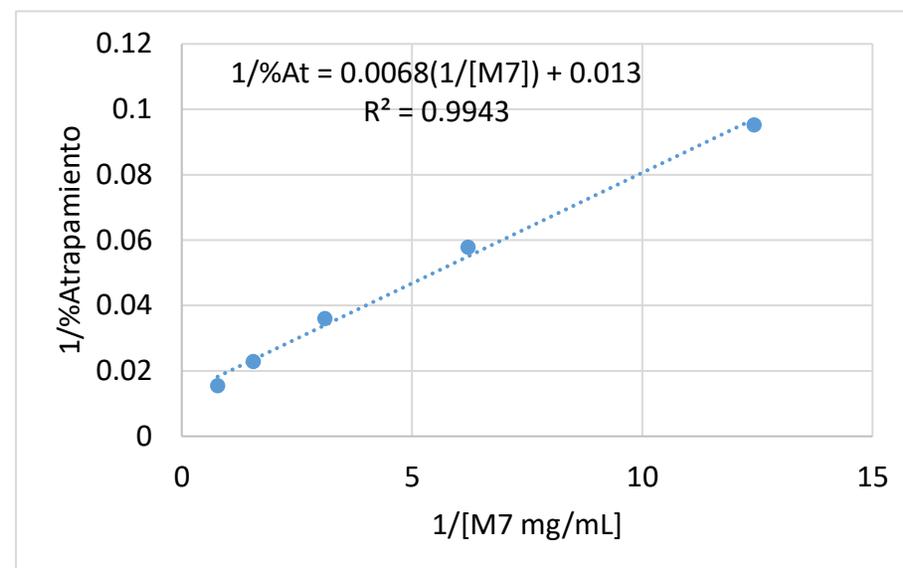
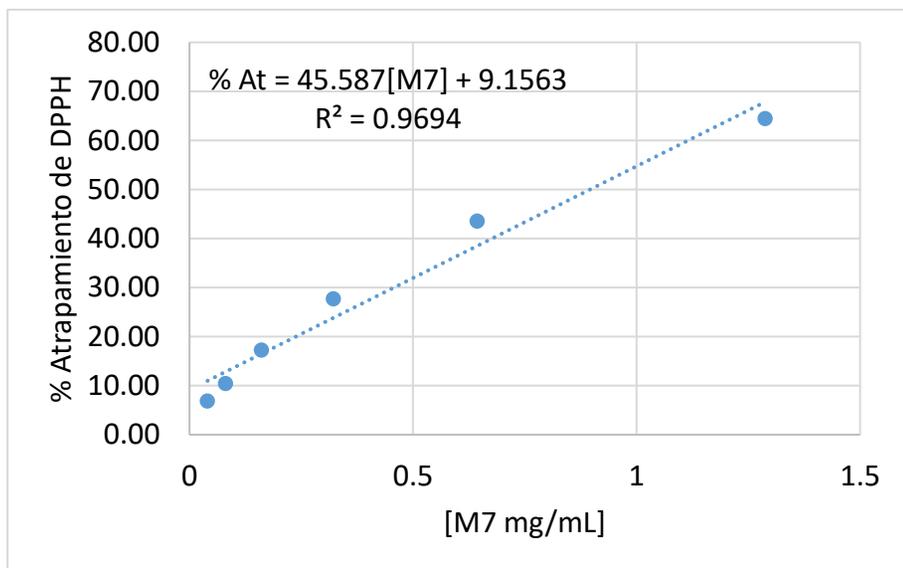
**Muestra 5**



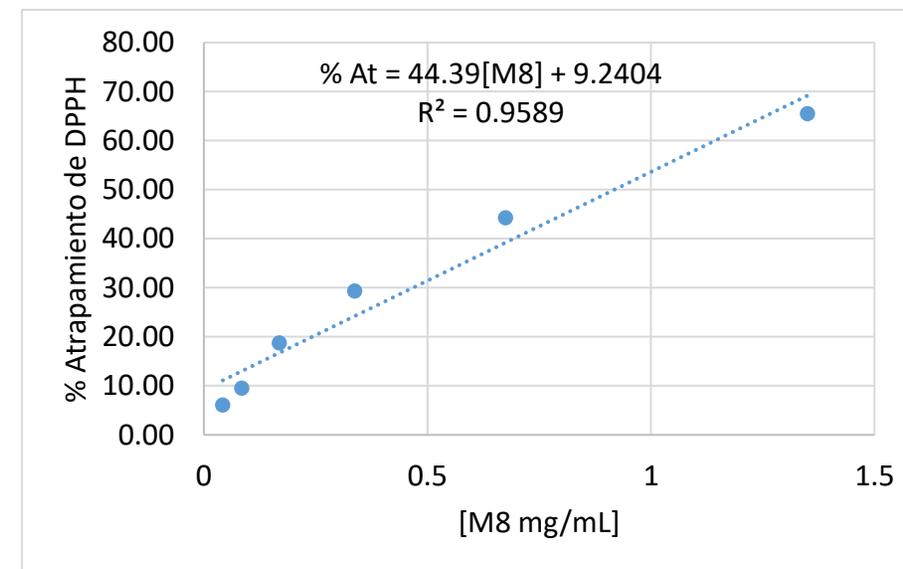
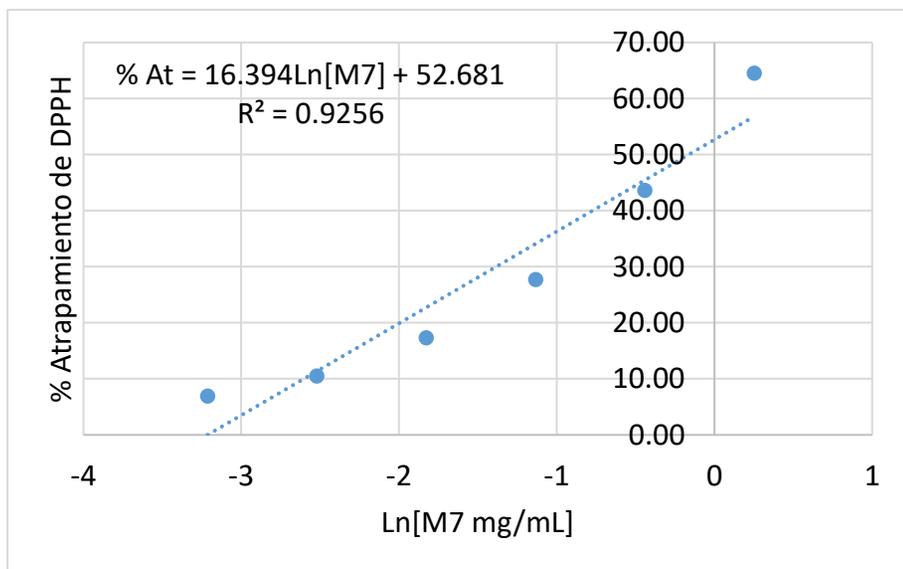
**Muestra 6**

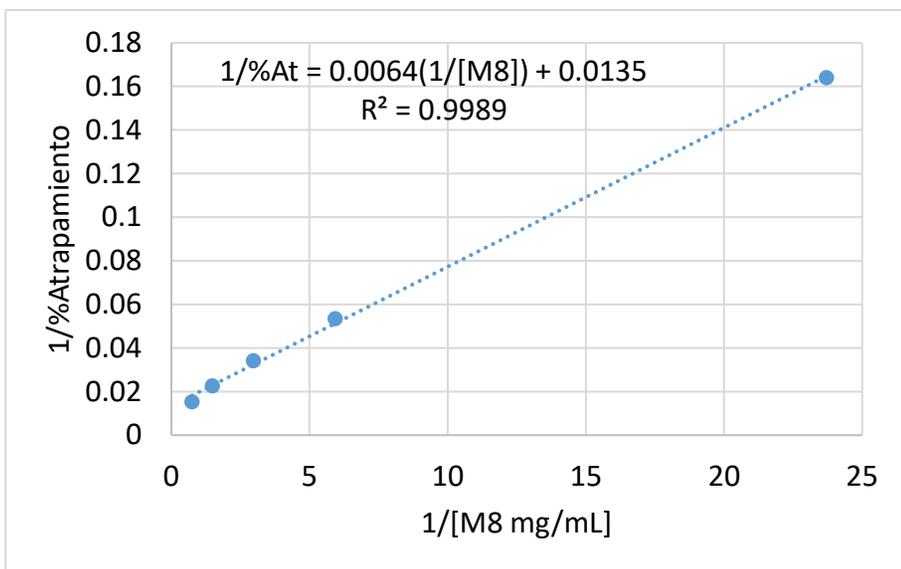


**Muestra 7**

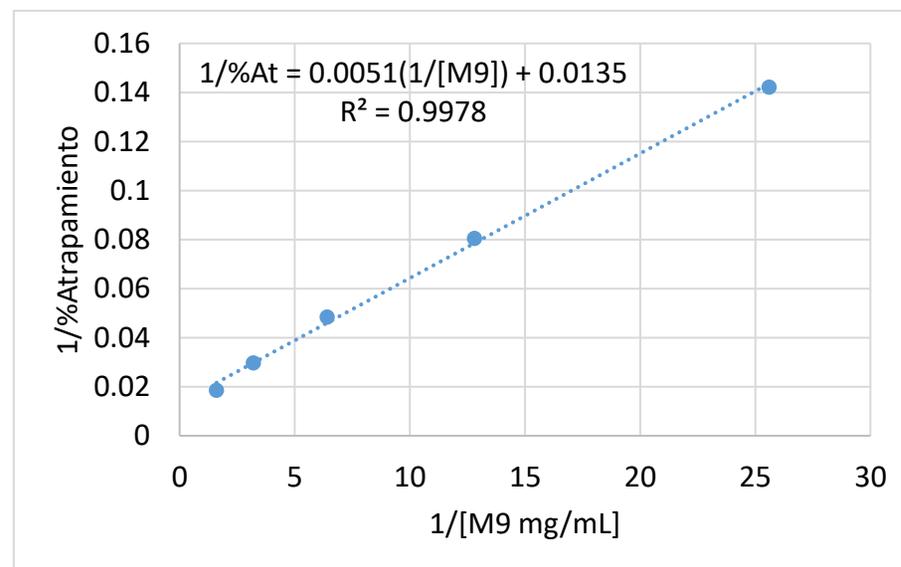
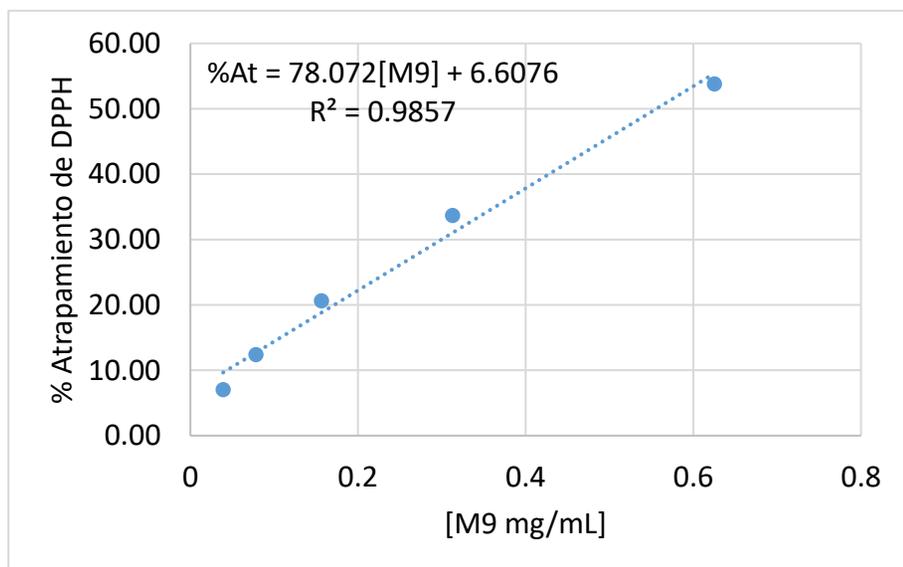
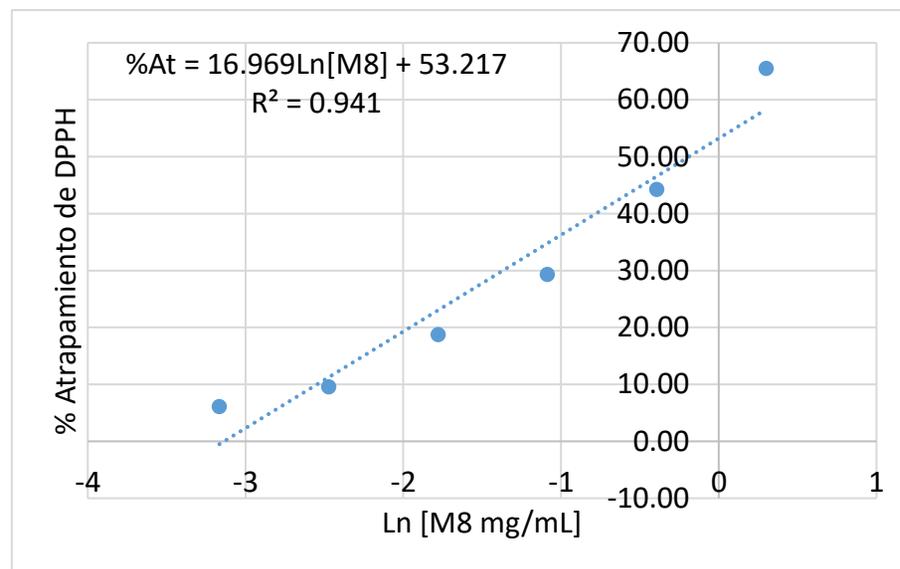


**Muestra 8**

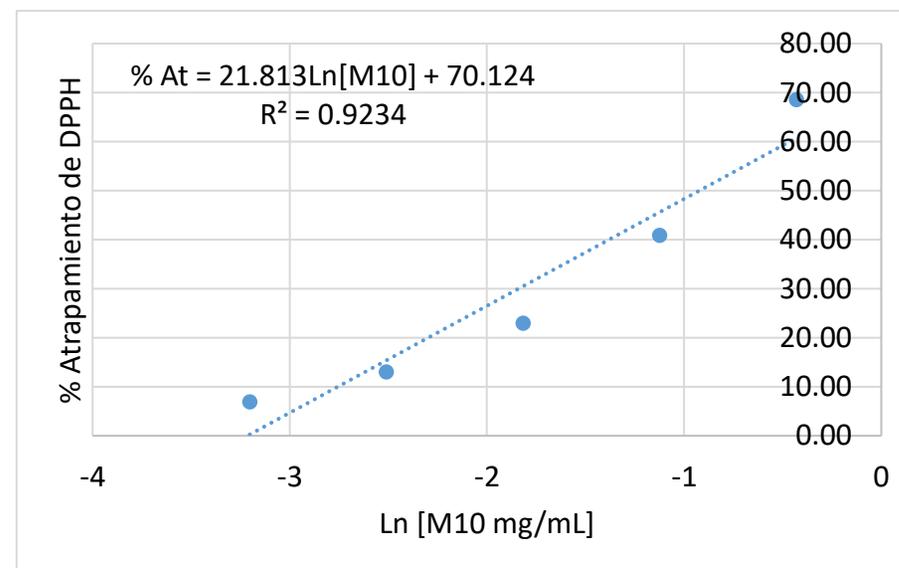
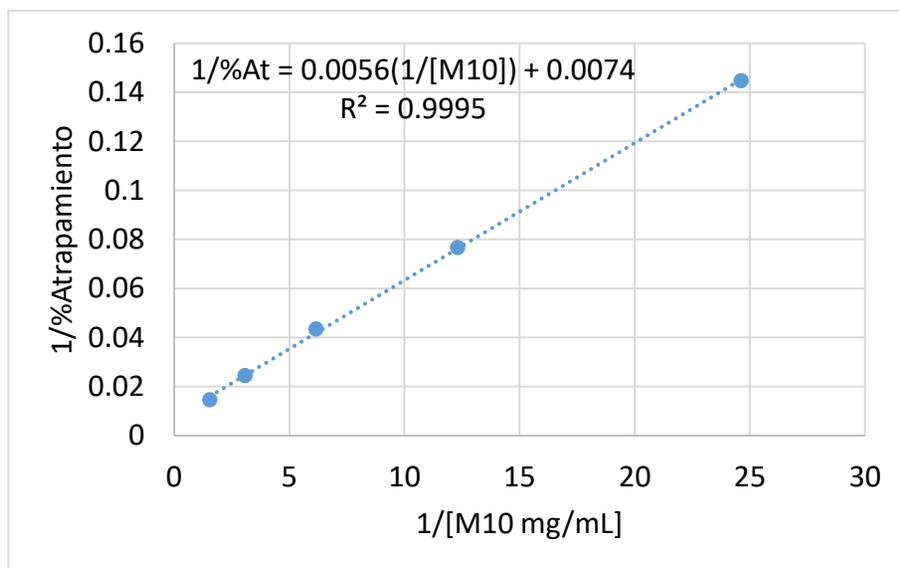
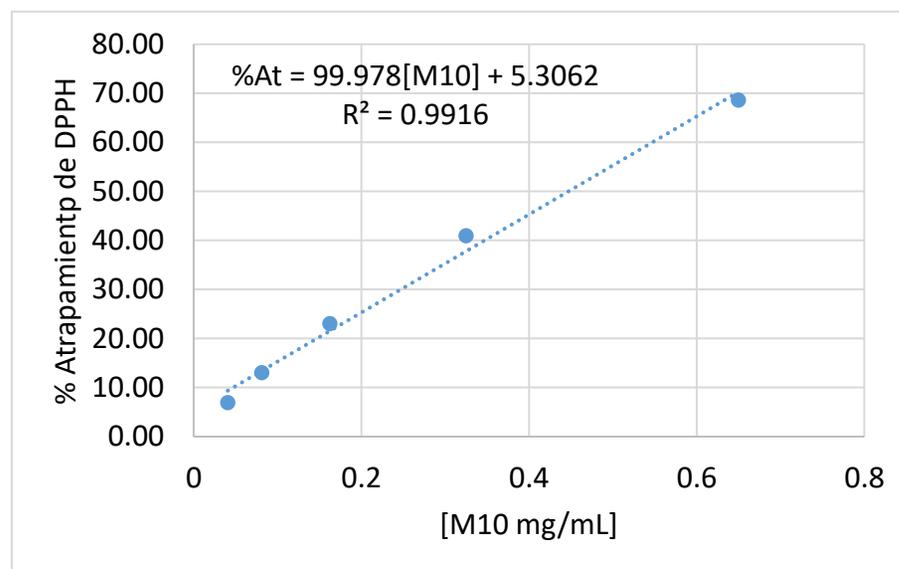
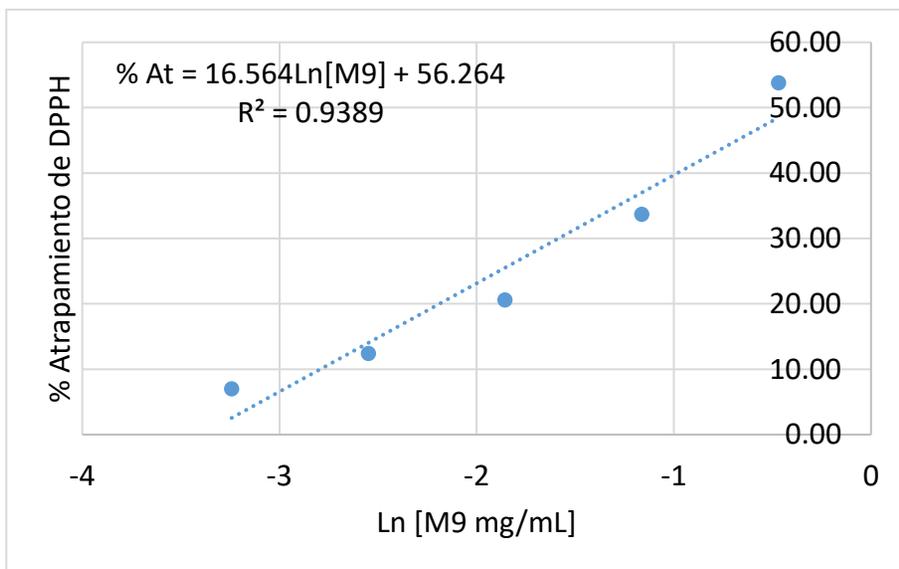




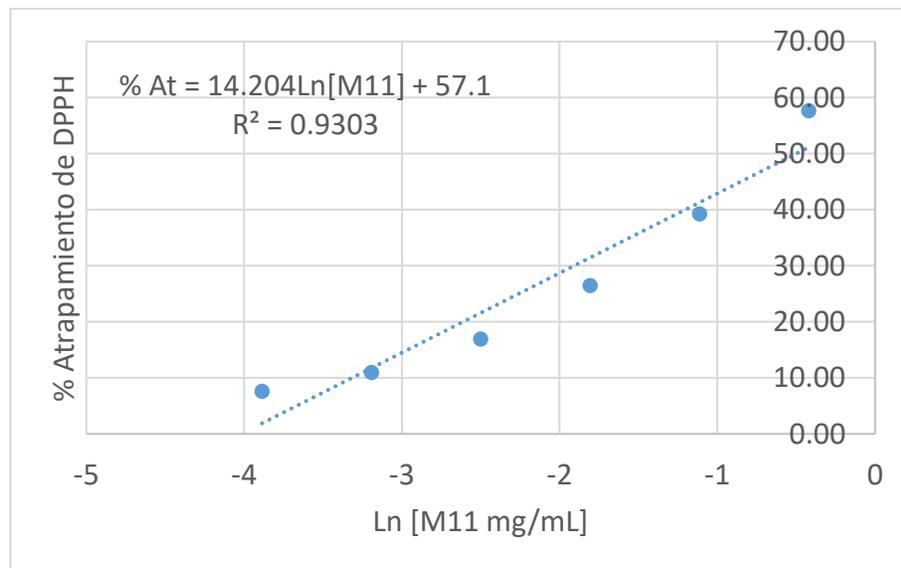
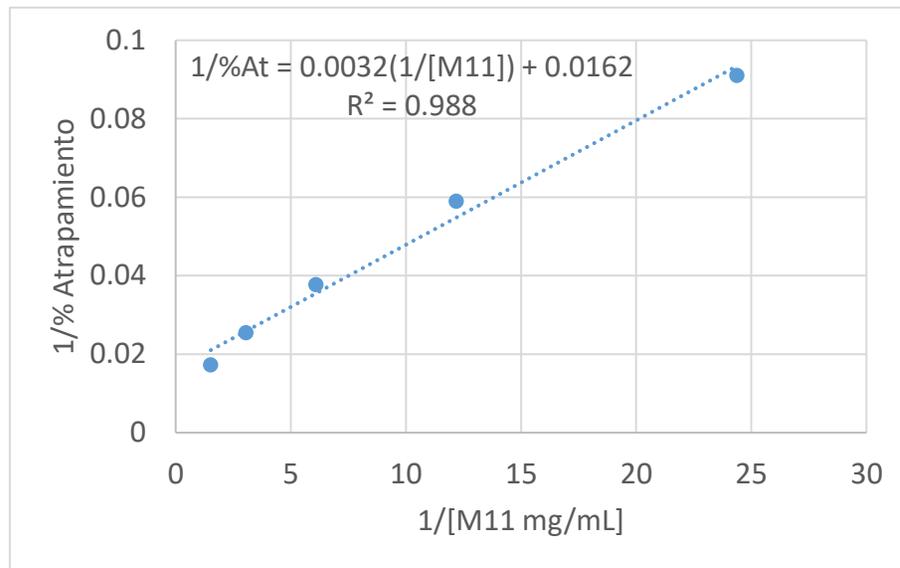
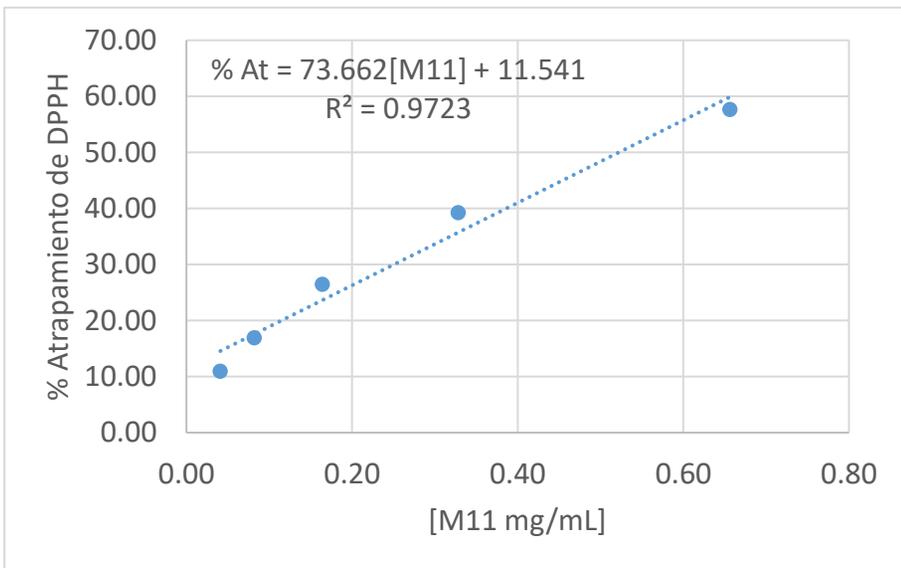
**Muestra 9**



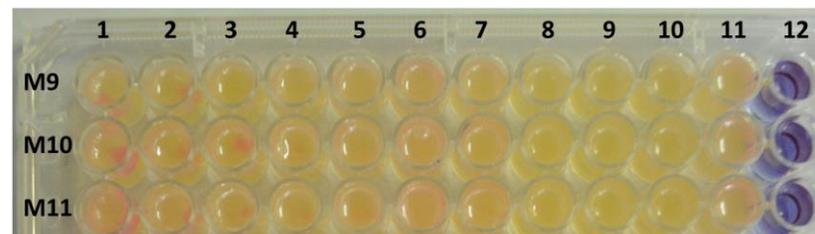
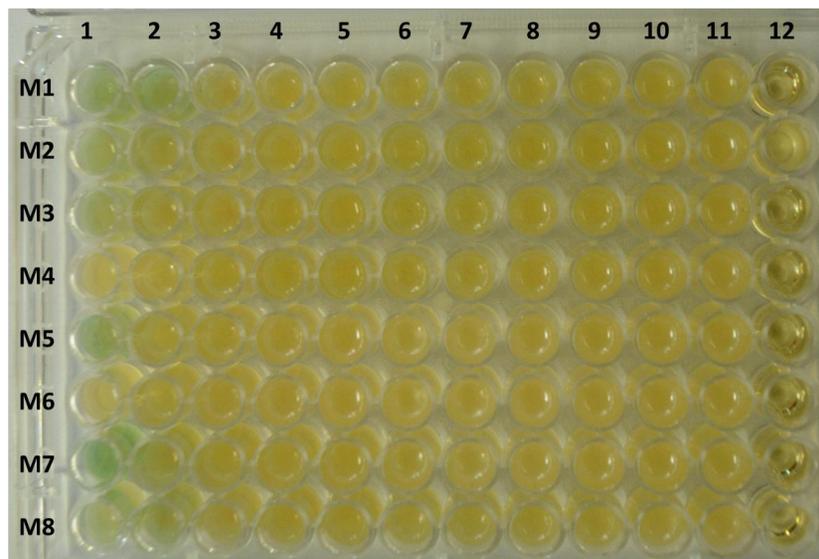
**Muestra 10**



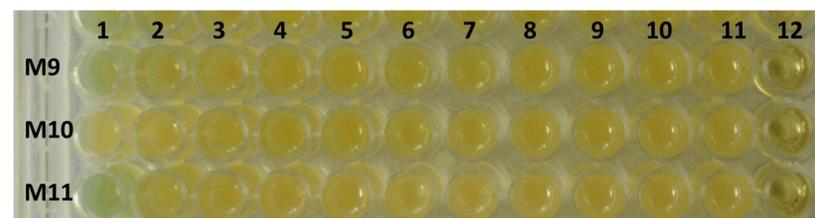
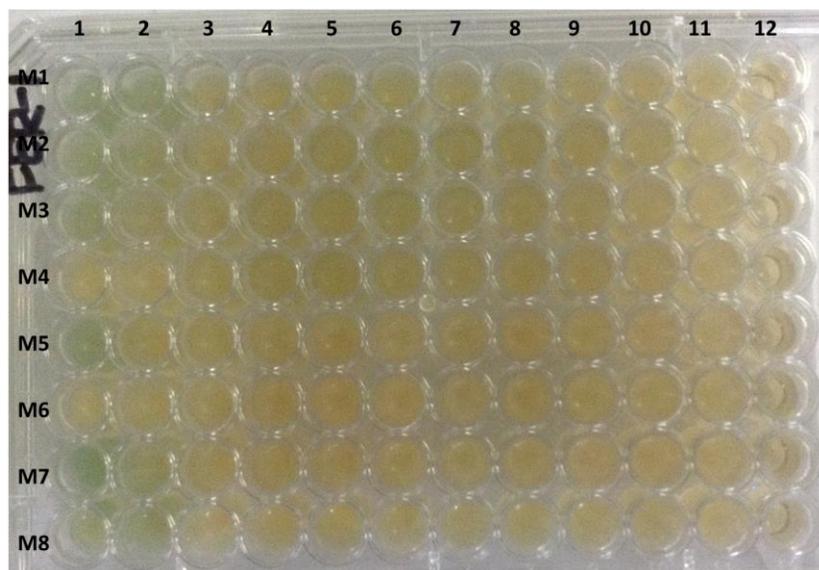
**Muestra 11**



### Anexo III Placas para determinar la CMI



**Placas para *P. aeruginosa*.** En la columna 1 se encuentra la muestra con una concentración de 1000 µg/mL, en la columna 11 el control + y en la columna 12 el control -. En la segunda placa se adicionó el colorante para comprobar la presencia de bacterias vivas o muertas.



**Placas para *S. aureus*.** En la columna 1 se encuentra la muestra con una concentración de 1000 µg/mL, en la columna 11 el control + y en la columna 12 el control -.