



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE UN GEOPROPÓLEO PRODUCIDO POR ABEJAS MELIPONAS DE LA LOCALIDAD DE CUETZALAN, PUEBLA. EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. KAREN TATIANA HERNÁNDEZ OSORIO

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México, febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Dr. Manuel Jiménez Estrada
VOCAL Dr. José Pedraza Chaverri
VOCAL Dr. Ricardo Reyes Chilpa
VOCAL Dra. María Yolanda Ríos Gómez
SECRETARIO Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Lugar donde se llevó a cabo el proyecto:

Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

Laboratorio de Inmunoparasitología de la unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina UNAM.

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Tutor

Q. Karen Tatiana Hernández Osorio

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Nacional Autónoma de México, que mediante el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas me permitió completar mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado con la beca durante mis estudios de maestría. No. becario 620319/CVU 818411.

Proyecto PAIP 5000-9138 otorgado al Dr. José Fausto Rivero Cruz.

A la USAI por prestar de manera eficiente los servicios relacionados a técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero a través del Proyecto de Ciencia Básica 252006 otorgado al Dr. José Fausto Rivero Cruz.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su asesoría, tiempo brindado, apoyo constante y guiarme en la realización de este proyecto.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser y al Dr. José Sotero Delgado, por su asesoría, tiempo brindado, apoyo constante y guiarme en la realización de los ensayos biológicos.

Al Honorable Jurado asignado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. José Pedraza Chaverri, Dra. María Yolanda Ríos Gómez, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

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

Al M. en C. William García Santos por su asesoría en el procesamiento de los espectros de RMN.

A la M. en C. Ronna Delgado Altamirano por su asesoría técnica en los ensayos biológicos.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **FAO:** Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas.
- **CG-MS:** Cromatografía de gases acoplado a masas.
- **HPLC-DAD-MS:** Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de diodos y espectrometría de masas.
- **SPME-GC-TOF-MS:** Microextracción en fase sólida acoplado a cromatografía de gases con un detector de masas.
- **HT-HRGC-MS:** Cromatografía de gases de alta resolución y alta temperatura acoplado a espectrometría de masas.
- **Et-Br:** Extractos etanólicos de Brasil.
- **Et-Bul:** Extractos etanólicos de Bulgaria.
- **RMN:** Resonancia magnética nuclear.
- **HSQC:** Heteronuclear Single Quantum Correlation.
- **HMBC:** Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
- **COSY:** Correlation Spectroscopy.
- δ : Desplazamiento químico.
- **DS:** Desviación estándar.
- **DPPH:** Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
- **L.C.L:** Leishmaniasis cutánea localizada.
- **L.C.D:** Leishmaniasis cutánea difusa.
- **L.V:** Leishmaniasis visceral.
- **L.M:** Leishmaniasis mucocutánea.
- **EAG:** Equivalentes de Ácido gálico.
- **EQ:** Equivalentes de Quercetina.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante.....	38
Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico y la fracción de hexano obtenidos del geoprópoleo.	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos identificados en estudios previos de geopropóleos recolectados en diferentes regiones del mundo.....	11
Cuadro 2. Actividades biológicas de geopropóleos producidos por abejas sin aguijón.....	18
Cuadro 3. Información general en el tratamiento de leishmaniasis ^{48,49,50}	23
Cuadro 4. Rendimiento del reparto líquido-líquido del extracto de etanol del geopropóleo.	30
Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción de hexano del geopropóleo por cromatografía en columna abierta.....	35

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de calibración de fenoles.....	31
Gráfica 2. Curva de calibración de flavonoides.	32
Gráfica 3. Curva de calibración de trolox.	33
Gráfica 4. Curva dosis-respuesta del efecto <i>in vitro</i> del extracto etanólico en promastigotes de <i>L. mexicana</i> , a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL. Las barras representan el promedio de parásitos vivos ± DS de cuatro experimentos independientes y los asteriscos (****) la diferencia significativa $p < 0.0001$ con respecto al control; (**) la diferencia significativa $p < 0.01$ con respecto al control.	48
Gráfica 5. Curva dosis-respuesta del efecto <i>in vitro</i> de la fracción de hexano en promastigotes de <i>L. mexicana</i> , a concentraciones de 100, 200, 250, 300, 350 y	

400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las barras representan el promedio de parásitos vivos \pm DS de cuatro experimentos independientes y los asteriscos (****) la diferencia significativa $p < 0.0001$ con respecto al control.....	49
Gráfica 6. Cl_{50} del extracto etanólico (a) y de la fracción de hexano (b) sobre <i>L. mexicana</i> a partir de la curva de porcentaje de muerte de promastigotes contra el logaritmo de la concentración.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agrupación jerárquica de las abejas ¹⁶	5
Figura 2. Abeja <i>Scaptotrigona mexicana</i>	6
Figura 3. Distribución de las abejas sin aguijón en el mundo ³	7
Figura 4. Localización de registros de meliponicultura antigua (amarillo) e iniciativas recientes (morado) del cultivo de abejas sin aguijón en México ¹⁸	8
Figura 5. Distribución de las diferentes formas clínicas de leishmaniasis en México ⁵³	21
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> ⁵⁷	22
Figura 7. Geopropóleo de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	29
Figura 8. Estructura de los triterpenoides aislados en geopropóleo producido por <i>Scaptotrigona mexicana</i>	40
Figura 9. Proporción de los isómeros α/β de la 3-O-acetil-amirina en el espectro de RMN ¹ H.	42
Figura 10. Proporción de isómeros α/β amirina en el espectro de RMN ¹ H	46

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 Abejas sin aguijón	5
1.2 Distribución de las abejas sin aguijón.....	6
1.3 Meliponicultura	7
1.3 Geopropóleo.....	9
1.4 Composición química del geopropóleo.....	9
1.6 Actividades biológicas del geopropóleo	18
1.7 Generalidades de <i>Leishmania</i>	20
1.7.1 Infección por <i>Leishmania</i>	20
1.7.2 Distribución en México	20
1.7.3 Ciclo de vida.....	22
1.7.4 Tratamiento	23
2.OBJETIVO.....	28
2.1 OBJETIVO GENERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1 Recolección del material	29
3.2 Obtención del extracto etanólico	29
3.3 Determinación de contenido de fenoles totales	30
3.3.1 Curva de calibración de fenoles y preparación de las muestras de geopropóleo	30
3.5 Determinación del contenido de flavonoides.....	31
3.5.1 Curva de calibración y preparación de las muestras de geopropóleo.....	31
3.6 Determinación de la capacidad antioxidante.....	32
3.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana	34
3.7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	34
3.8 Purificación, detección e identificación de compuestos	34
3.9 Evaluación de la actividad leishmanicida del extracto etanólico y compuestos mayoritarios	36

3.9.1 Análisis estadístico.....	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1 Actividad antioxidante y antibacteriana	38
4.2 Componentes mayoritarios aislados del geopropóleo producido por <i>Scaptotrigona mexicana</i> y elucidación estructural	40
4.2.1 Mezcla de 3-O-acetil- α -amirina (C1a) y 3-O-acetil- β -amirina (C1b).....	41
4.2.2 Cicloart-23-en-3 β ,25-diol (C2).....	43
4.2.3 Lupeol (C3)	44
4.2.4 Mezcla de α -amirina (C4a) y β -amirina (C4a)	45
4.3 Actividad biológica contra la Leishmania	47
5.CONCLUSIONES.....	52
6. PERSPECTIVAS.....	53
7. BIBLIOGRAFÍA	54
8. ANEXOS	64

ABSTRACT

Geopropolis is a type of propolis that contains plant resins, wax and mud. This is produced by stingless bees from the Meliponini tribe. However, studies on its biological activity and chemical composition of the geopropolis produced by *Scaptotrigona mexicana* are scarce. In this work, the chemical and biological study of the ethanolic extract derived from a geopropolis collected in Cuetzalan is described. The study allowed the isolation of mixture of 3-O-acetyl- α/β -amyrin (**C1a** y **C1b**), α/β -amyrin (**C4a** y **C4b**), cicloart-23-ene-3 β ,25-diol (**C2**) and lupeol(**C3**). Additionally, the content of phenols and flavonoids and antioxidant capacity were quantified following the NOM-0003-SAG/GAN-2017. The content of phenols and flavonoids in the ethanolic extract of the geopropolis were 6.29 mg EAG/g of extract and 0.72 mg EQ/ g of extract, respectively. Antioxidant activity was measured using DPPH bleaching and a minimum inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.55 mg/mL was obtained. On the other hand, the antibacterial activity was evaluated using the 96 well plate microdilution method and as test bacteria *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the ethanolic extract and the hexane fraction were in a range of 500 to 1000 μ g/mL for the tested bacteria. The ethanolic extract exhibited the best activity against *S. mutans* with a MIC of 500 μ g/mL. Finally, the *in vitro* effect of the ethanol extract and the fraction of hexane on the viability of promastigotes of *L. mexicana* was evaluated. In these experiments, IC₅₀ of 37.3 μ g/mL and 209.7 μ g/mL were determined for the ethanolic extract and the hexane fraction, respectively.

RESUMEN

El geopropóleo es un tipo de propóleo que contiene resinas vegetales, cera y tierra. Este es producido por abejas sin aguijón de la tribu Meliponini. Sin embargo, los estudios sobre su actividad biológica y composición química del geopropóleo producido por *Scaptotrigona mexicana* son escasos. En este trabajo se describe el estudio químico y biológico del extracto etanólico derivado de un geopropóleo recolectado en Cuetzalan. El estudio permitió el aislamiento de las mezclas de α/β -amirina (**C4a** y **C4b**), 3-O-acetil- α/β -amirina (**C1a** y **C1b**), el cicloart-23-en-3 β ,25-diol (**C2**) y del lupeol (**C3**). Adicionalmente, se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides totales y capacidad antioxidante siguiendo la NOM-0003-SAG/GAN-2017. El contenido de fenoles y flavonoides en el extracto etanólico del geopropóleo fue de 6.29 mg EAG/g de extracto y 0.72 mg EQ/g de extracto, respectivamente. La actividad antioxidante se midió utilizando el blanqueamiento de DPPH y se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (CI₅₀) de 0.55 mg/ml. Por otra parte, se evaluó la actividad antibacteriana empleando el método de microdilución en placa de 96 pozos y como bacterias de prueba *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) del extracto etanólico y de la fracción de hexano estuvieron en un rango de 500 a 1000 μ g/mL para todas las bacterias. La mejor actividad se observó para el extracto etanólico a 500 μ g/mL sobre *S. mutans*. Finalmente, se evaluó el efecto *in vitro* del extracto etanólico y la fracción de hexano sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*. En estos experimentos se determinaron CI₅₀ de 37.3 μ g/mL y 209.7 μ g/mL para el extracto etanólico y la fracción de hexano, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Los meliponinos son abejas nativas, sociales y sin aguijón que se distribuyen en las regiones de clima tropical y subtropical, principalmente en América del Sur. En México, hay una gran diversidad de abejas sin aguijón, entre ellas *Scaptotrigona mexicana* que produce miel, cera y geoprópoleo, algunos de estos productos son una fuente de ingresos para las comunidades rurales de la región de Cuetzalan, Puebla.

La meliponicultura, crianza de las abejas sin aguijón, es una actividad que se remonta a la época de los mayas y es un modelo sostenible para la conservación de estas abejas, además es una alternativa económica para el desarrollo de Cuetzalan. No obstante, el único producto explotado comercialmente en esta región es la miel y no hay un aprovechamiento del geoprópoleo, que es descartado durante el proceso de recolección de la miel. El geoprópoleo, es un tipo de propóleo que se produce a partir de mezcla de material resinoso vegetal con secreciones salivales, barro o arcilla y es ampliamente utilizado en la medicina tradicional con diversos fines terapéuticos.

En estudios farmacológicos recientes del geoprópoleo han demostrado que posee propiedades antinociceptivas¹ y anti-inflamatorias^{2,3,4} es antioxidante^{2,3,5,6}, antibacteriano^{2,5,7}, antifúngico^{7,8}, antiproliferativo⁹, antitumoral¹⁰, antimutagénico² y posee actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer humano^{5,11}. Por otra parte, los estudios químicos de extractos de geoprópoleo revelan la presencia de ácidos aromáticos, alcoholes, fenoles, terpenoides, ácidos alifáticos, azúcares, flavonoides, saponinas, cumarinas y esteroides. Aunque en la literatura los informes sobre la actividad anti-leishmania del geoprópoleo son escasos, es importante destacar que, para el propóleo producido por *Apis mellifera*, se tienen numerosos reportes sobre su actividad anti-protozoaria, entre ellas leishmanicida^{12,13,14,15}.

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades tropicales causadas por un conjunto de parásitos protozoarios que pertenecen al género *Leishmania*, que

afectan a 12 millones de personas en 88 países. En México, predomina ampliamente la cutánea pura conocida popularmente como “úlceras de los chicleros”, que es producida por *Leishmania mexicana*.

Considerando que no se cuenta con vacunas para tratar la leishmaniasis y los fármacos empleados como tratamiento son costosos, tóxicos y poseen numerosos efectos secundarios, así mismo, algunos de estos parásitos ya presentan una resistencia hacia estos medicamentos reduciendo su eficacia, se hace necesario descubrir nuevos y mejores tratamientos terapéuticos para esta enfermedad.

Con el fin de evaluar los parámetros de calidad establecidos por la (NOM-0003-SAG/GAN-2017) que deben cumplir los propóleos y sus extractos para su procesamiento y comercialización en el país, este estudio tuvo como objetivo aislar los componentes mayoritarios, determinar la actividad antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de un geopropóleo recolectado en Cuetzalan, Puebla; y de manera paralela se evaluó su actividad leishmanicida *in vitro* para usarlo como alternativa en el tratamiento en contra de esta enfermedad.

1. ANTECEDENTES

1.1 Abejas sin aguijón

Existen aproximadamente 20 mil especies de abejas a nivel mundial y están agrupadas en 7 familias taxonómicas, una de estas familias es Apidae y contiene la subfamilia Apinae en la cual se ubican diferentes tribus tales como Apini, Euglossini, Bombini y Meliponini, entre otras (Figura 1). En la tribu Meliponini se encuentran las abejas con los hábitos sociales más altos, como lo son las abejas sin aguijón (Meliponinos); estas abejas forman colonias permanentes en donde almacenan miel y polen en grandes cantidades y se organizan en diferentes castas: obreras, reinas y zánganos cumpliendo con varias tareas en la colmena.

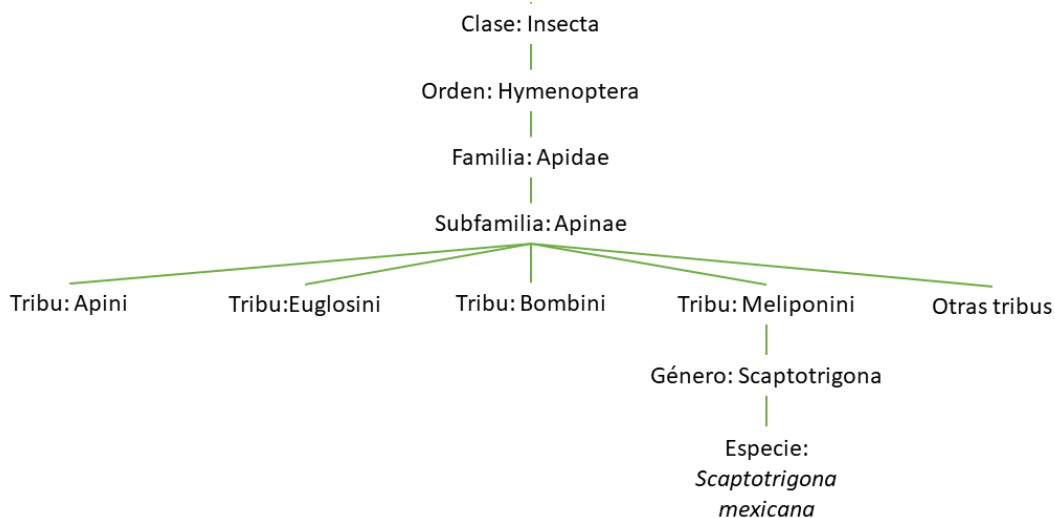


Figura 1. Agrupación jerárquica de las abejas¹⁶

Las abejas sin aguijón viven en colonias que varían desde algunos cientos de individuos hasta más de 100.000 trabajadoras dependiendo de la especie. Éstas especies se caracterizan anatómicamente por la ausencia de un aguijón funcional, poseen una estructura pilosa en forma de cepillo en el extremo más ancho de la tibia y tienen una venación muy débil o ausente en sus alas, además, sus dimensiones corporales son alrededor de un centímetro^{16,17} (Figura 2).



Figura 2. Abeja *Scaptotrigona mexicana*

Foto: Biól. Jorge Jiménez-Díaz

Las abejas sin aguijón se consideran excelentes polinizadores en el trópico debido a la gran gama de tamaños que poseen, éstas pueden polinizar por vibración una mayor diversidad de flores de diferentes tamaños y formas, además, son polinizadores de la flora nativa y cultivos en los ecosistemas donde habitan¹⁸. Cabe mencionar que la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) indica que el 71% de los cultivos de alimentos en el mundo son polinizados por estas abejas¹⁹. Por otra parte, éstas son ecológica, económica y culturalmente muy importantes, ya que la miel, polen, cerumen y geopropóleo que producen algunas de estas especies han sido usados tradicionalmente por comunidades indígenas y no indígenas en zonas rurales a lo largo del continente Americano²⁰.

1.2 Distribución de las abejas sin aguijón

Los meliponinos o abejas sin aguijón se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Australia (Figura 3). En el Continente Americano se encuentra la mayor diversidad de meliponinos, entre 300 de las 400 especies identificadas y se distribuyen desde México hasta Brasil y el norte de Argentina, también están presentes en las islas del Caribe y Pacífico²⁰. Esta especie puede habitar una gran variedad de ecosistemas, incluyendo tierras húmedas y

áridas así como bosques nublados y páramos en los Andes que pueden alcanzar los 4.000 metros de altitud²⁰.

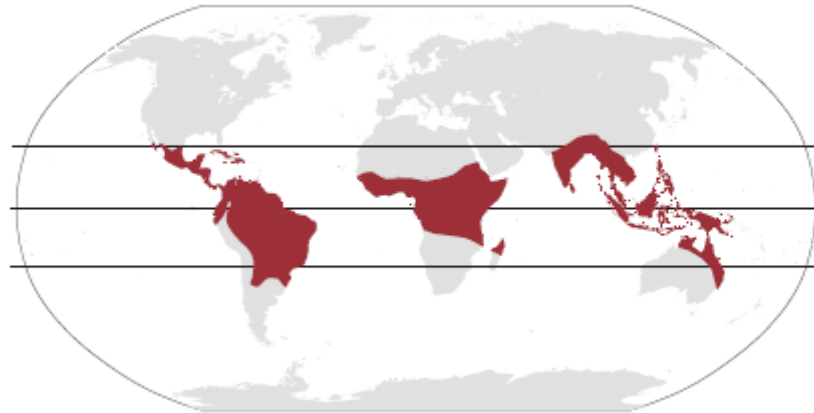


Figura 3. Distribución de las abejas sin aguijón en el mundo³.

En México se encuentran 46 especies de abejas sin aguijón agrupadas en 16 géneros y de acuerdo con Ayala, la distribución geográfica en México puede seguir tres patrones:

- I. Amplia distribución tropical y subtropical
- II. Distribución asociada al bosque tropical perennifolio y
- III. especies endémicas asociadas con varios cultivos²⁰.

1.3 Meliponicultura

El manejo de las abejas nativas sin aguijón o meliponicultura es una práctica que inició desde las culturas prehispánicas avanzadas de Mesoamérica²¹. Para estas comunidades, las abejas sin aguijón han tenido un valor importante en el ámbito social, cultural y religioso. Desde tiempos antiguos la miel, cerumen y geopropóleo que producían estas abejas eran empleados en la medicina tradicional y como objetos de comercio y tributo, también eran concebidas como seres sagrados y representaban un vínculo a través del cual conectaban a su pueblo con la divinidad. El origen de la meliponicultura aún es un misterio, sin embargo, se cree que esta práctica tuvo su inicio en la península de Yucatán. Primero, se domesticaron algunas de las especies y luego se trasladó el nido a un lugar mas cercano de la casa,

posteriormente se desarrollaron técnicas para el manejo de las colonias y fabricación de colmenas artificiales. En el código Madrid o Tro-Cortesiano se detalla como los mayas desarrollaron la meliponicultura, específicamente con la especie *Melipona bacheei* (Koolel-Kab), en el cual se presentan las actividades de cosecha y manejo, así mismo, las deidades relacionadas con las abejas¹⁸.

Actualmente, en México la meliponicultura continúa sólo en los lugares donde hubo un arraigo cultural por esta actividad como en la península de Yucatán, la región Totonaca de Veracruz y la sierra Nororiental de Puebla. Adicionalmente, de las 46 especies presentes en el país sólo se trabaja con 19 de éstas. Específicamente en la región de la sierra norte de Puebla se cultiva de manera tradicional la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana*, denominada en lengua nahua “Pisil Nek-mej” el manejo y crianza de esta abeja se caracteriza por los usos de ollas de barro que son utilizados como colmenas²². En la Figura 4 se puede observar la distribución en el país de las principales zonas donde aún persiste la meliponicultura e iniciativas recientes.

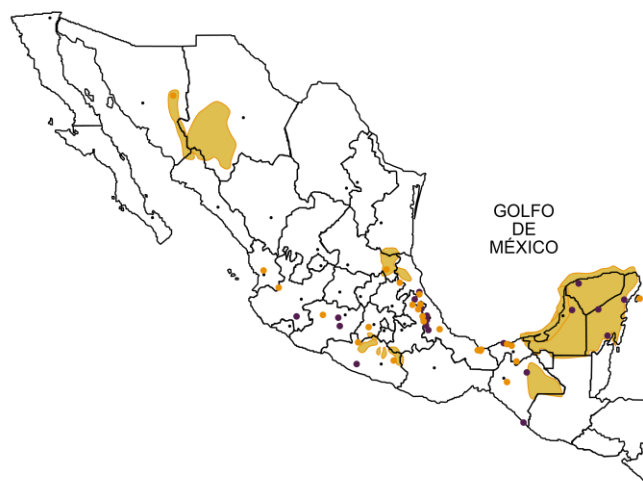


Figura 4. Localización de registros de meliponicultura antigua (amarillo) e iniciativas recientes (morado) del cultivo de abejas sin aguijón en México¹⁸.

1.3 Geopropóleo

El geopropóleo es producido por abejas sin aguijón a partir de la recolección de material resinoso vegetal que se mezcla con secreciones salivales, barro o arcilla y ceras que le confieren características únicas^{3,23} y es usado por las abejas para evitar daños mecánicos y sellar agujeros o grietas de las colmenas, actuando como un agente termorregulador evitando la exposición a las corrientes de aire y provee un ambiente esterilizado, igualmente protege la colmena de invasores externos como bacterias, hongos, virus u otros microorganismos patógenos que pueden invadir la colonia^{24,25}.

Por otra parte, el geopropóleo se ha empleado en la medicina popular empíricamente para el tratamiento de enfermedades respiratorias, digestivas⁷, visuales, fertilidad femenina², problemas de dermatosis²³ y también como agente antibacteriano²⁶, además, en los últimos años se ha encontrado que tienen propiedades anti-inflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, antivirales y gastroprotectoras², adicionalmente, en algunos estudios recientes se ha demostrado la actividad antioxidante de estos materiales de origen biológico.

1.4 Composición química del geopropóleo

La composición química del geopropóleo es altamente compleja y variable, ya que depende del sitio de recolección y por lo tanto del tipo de fauna y flora donde las abejas recolectan los exudados y secreciones de las plantas, así como también de factores climáticos y el tipo de abeja²⁷. Por ello, definir la composición química de estas muestras requiere un trabajo arduo; no obstante, se han descrito compuestos en muestras de geopropóleo de diferentes tipos de abeja entre los que destacan compuestos aromáticos de tipo ácidos, alcoholes, fenoles, terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos), ácidos alifáticos, azúcares, flavonoides, saponinas, cumarinas, esteroides y otros compuestos presentes en trazas.

En la literatura se destacan los estudios sobre la composición química de geopropóleos producidos por especies de abejas meliponas en diferentes zonas de Brasil por medio de diferentes técnicas analíticas, tal es el caso de Bankova y colaboradores²⁸ quienes identificaron más de cincuenta compuestos en muestras de geoprópoleo provenientes del estado de Piauí y Paraná producidas por las abejas *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* y *Tetragona clavipes* por medio de cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS). Los principales compuestos identificados en las tres muestras fueron ácidos no fenólicos, se resaltó la presencia de ácido láctico y fosfórico, así como ácidos grasos de cadena larga, también se observaron compuestos aromáticos de tipo alcoholes, aldehídos y ácidos en bajas concentraciones. Cabe destacar que en la muestra producida por *Tetragona clavipes* en la zona de Paraná se determinó la presencia de alcoholes triterpénicos como la β -amirina en altas concentraciones, mientras que en una muestra de *M. quadrifasciata anthidioides* procedente de la misma región no se observó la presencia de estos compuestos. Este hallazgo demuestra que las abejas no tienen las mismas fuentes vegetales, generando así una variación en su composición química. Por otro lado, no se observó la presencia de flavonoides en las muestras analizadas, y solo se identificó a la pinobanksina y la dihidroximetoxiflavanona en la muestra de *M. compressipes*.

En un estudio más reciente del geopropóleo producido por *Melipona quadrifasciata anthidioides* en el centro oeste del país en Mato Grosso del Sur se identificaron como componentes mayoritarios a flavonoides, diterpenos, triterpenos, di,tri-galoil y derivados de fenilpropanoil-heterósidos utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de diodos y espectrometría de masas en Tandem (HPLC-DAD-MS)³. Adicionalmente, en otro análisis realizado al geopropóleo producido por esta especie y de la misma zona utilizando HPLC y CG-MS se determinó que los componentes mayoritarios eran triterpenos, esteroides, flavonoides y ácidos fenólicos²⁹. Es importante mencionar además, que en geopropóleos producidos por *M. orbigny* de esta misma región se encontraron como componentes mayoritarios compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos².

En la zona nordeste de Brasil se han recolectado diferentes muestras de geopropóleo de *Melipona scutellaris*. En una muestra de la ciudad de Entre Ríos (Estado de Bahía) se aislaron e identificaron compuestos de tipo cumarina²⁷ y ésteres del ácido cinámico²⁷, también se describió en otro estudio que el propóleo producido por esta especie en la misma zona se caracterizó por la presencia de benzofenonas polipreniladas³⁰ que se han descrito previamente en otros propóleos³¹. Así mismo, las muestras producidas por *Melipona subnitida* en el estado de Paraíba se han caracterizado por la presencia de flavonoides y fenilpropanoides^{1,32}. También se ha encontrado en muestras de *Melipona fasciculata* Smith recolectadas en el estado de Maranhão en el municipio de Palmeirândia, que los componentes mayoritarios son triterpenos (cicloartanos, oleananos, β -amirinas, cicloursanos, ácido 3-oxo-urs-12-en-24-oico y el lanosterol), así como, ácidos grasos, azúcares, esteroides, ácidos orgánicos y alcoholes. En las muestras del municipio de Fernando Falcão no se observó la presencia de triterpenoides o esteroides, pero si una alta concentración de compuestos fenólicos como el ácido gálico y el ácido elágico³³. En otro estudio realizado en el sudeste del estado de Maranhão con este tipo de abeja, se identificaron 11 compuestos, entre los cuales resalta la presencia de ácidos fenólicos y taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) como componentes mayoritarios³⁴. Adicionalmente, el análisis de una muestra de geoprópolis producido por *Scaptotrigona postica* del estado de Maranhão utilizando HPLC-DAD-ESI-MS/MS (Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de diodos y espectrometría de masas) en modo ionización positivo permitió la identificación del ácido cafeicoquinico-O-arabinosido, flavonas-C-glucósidos (principalmente vicenina-2) y una pirrolizidina³⁵. Asimismo, en muestras de *Melipona interrupta* en la zona Boa vista de ramos, se aislaron y se caracterizaron por RMN a naringenina, aromadendrina, naringenina-4'-O- β -glucopiranosido y miricetina-3-O- β -7-glucopiranosido³⁶.

Por otra parte, en Venezuela se analizaron nueve muestras de geopropóleo (*M. favosa*, *M. compressipes*, *Scaptotrigona depilis*, *Paratrigona anduzei*) utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y se identificaron compuestos de tipo

benzofenonas polipreniladas en casi todas las muestras con excepción de la recolectada en Bolívar y que fue producida por *Paratrigona anduzei*, en la cual no se observó la presencia de compuestos fenólicos³⁷.

Finalmente, en México solo se tienen reportes sobre los componentes volátiles de muestras de geopropóleo. Pino y colaboradores³⁸ usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y una columna capilar de sílice fusionada, determinó la presencia de 120 compuestos volátiles en una muestra de *Melipona beecheii* en Yucatán. Los componentes mayoritarios fueron de tipo monoterpeno, diterpeno y sesquiterpeno. En estos resultados se resaltó la presencia de 99 compuestos previamente reportados en propóleos de abejas *Apis mellifera* y 92 volátiles reportados en abejas sin aguijón. Igualmente, se demostró que santolinatrieno, 6-metil-5-hepten-2-ona, α -felandreno, δ -3-careno, 4-isopropil-1-metilciclohexene, *p*-isopropenil tolueno, α -óxido de pineno, crisanteno, *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol, óxido de *cis*-limoneno, verbenil etil éter, germacreno A, α -dehidro-ar-himachaleno, β -vetiveneno y epóxido de humuleno I fueron los únicos compuestos que estuvieron presentes en las muestras producidas por abejas sin aguijón. Adicionalmente, en otro estudio realizado en nuestro grupo de investigación se encontraron 64 compuestos en el geopropóleo producido por esta misma especie en Coatepec, Veracruz. El estudio se realizó utilizando microextracción en fase sólida acoplado a cromatografía de gases con un detector de masas (SPME-GC-TOF-MS) y se describen como componentes mayoritarios β -fencheno, estireno y benzaldehído, además, de monoterpenos como la (*Z*)-ocimenona, α -pineno, *m*-cimeno, *trans*-isocarveol, limoneno, verbenona, β -pineno, α -canforeno, *m*-cimeno, *trans*-pinocamphone y *trans*-pulegol³⁹. En el Cuadro 1 se muestran los principales compuestos identificados en muestras de geopropóleo.

Cuadro 1. Compuestos identificados en estudios previos de geopropóleos recolectados en diferentes regiones del mundo.

Especie	Lugar de origen	Clase de compuesto	Método analítico	Referencia
<i>M.compressipes</i>	Piauí, Brasil	<p>Monoterpenos: α-pineno.</p> <p>Diterpenos: ácido dehidroabiético.</p> <p>Triterpenos: Friedooleanona-3-ona.</p> <p>Sesquiterpenos: Nerodiol, espatulenol, <i>t</i>-murolol.</p> <p>Ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico, ácido cinámico, ácido <i>cis-p</i>-cumárico, ácido <i>trans-p</i>-cumárico, metil-<i>p</i>-cumarato.</p> <p>Compuestos fenólicos: hidroquinona, etilfenol.</p> <p>Flavonoides: pinobanksina.</p> <p>Ácidos grasos: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido caprónico.</p> <p>Alcoholes fenólicos: 3-(2-OH fenil)-propanolol, 3-(4-OH-fenil)-propanolol, 1-feniletanol-2-feniletanol, alcohol bencílico.</p> <p>Ácidos fenólicos: benzaldehído.</p> <p>Cetonas: acetofenona.</p> <p>Cumarinas: cumarona.</p> <p>Hidrocarburos alifáticos: hidrocarburos con cadena de C₈-C₂₅.</p>	CG-EM	[28]

Cuadro 1. Compuestos identificados en estudios previos de geopropóleos recolectados en diferentes regiones del mundo (cont.).

Especie	Lugar de origen	Clase de compuesto	Método analítico	Referencia
<i>M. compressipes</i>	Piauí, Brasil	Hidrocarburos aromáticos: alquilbenzeno, alquilnaftalenos. Ácido inorgánico: ácido fosfórico. Azúcar: glucosa.	CG-EM	[28]
<i>M. compressipes</i>	Portuguesa, Venezuela	compuestos fenólicos: benzofenonas preniladas.	HPLC	[37]
<i>M. subnitida</i>	Paraná, Brasil	compuestos fenólicos: 6-O- <i>p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopiranososa, 6-O-cinnamoil-1- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil- β - <i>D</i> -glucopiranososa. Flavonoides 7- <i>O</i> -metil naringenina, 7- <i>O</i> -metil aromadendrina, 7,4'-di- <i>O</i> -metil aromadendrina, 4'- <i>O</i> -metil kaempferol, 3- <i>O</i> -metil quercetina, 5- <i>O</i> -metil aromadendrina, 5- <i>O</i> -metil kaempferol.	HPLC	[40] [32]
<i>M. fasciculata</i> Smith	Palmeirândia, Brasil	Triterpenos: ácido ursólico, ácido oleanólico, α -amirina, ácido 3-oxo-urs-12-en-24-oico, cicloursano, cicloartenol. Esteróides: lanosterol, acetato de lanosterol. Ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido protocatecuico. Ácidos grasos: ácido cítrico, ácido quínico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido melísico, ácido octenoico.	CG-MS	[33]

Cuadro 1. Compuestos identificados en estudios previos de geopropóleos recolectados en diferentes regiones del mundo (cont.).

Especie	Lugar de origen	Clase de compuesto	Método analítico	Referencia
<i>M. fasciculata</i> Smith	Palmeirândia, Brasil	Ácidos orgánicos: ácido glucónico, ácido glicónico. Ázucres: glucosa, galactosa, aucubina, arabinosa, fucosa, sorbosa, xilosa, ribosa. Alcoholes: arabitol, sorbitol, eritritol.	CG-MS	[33]
<i>M. fasciculata</i> Smith	Fernando Falcao, Brasil	Ácidos fenólicos: ácido gálico Galotaninos: ácido galoil hexahidroxidifénico glucosilado, trigaloilglucosa, hexahidroxidifénico-digaloilglucosa, dilactona del ácido valónico Elagitaninos: ácido dihidroxifénico glucosilado, di- ácido dihidroxifénico	HPLC- DAD-ESI- MS	[34]
<i>M. interrupta</i>	Voa Vista de Ramos, Brasil	Flavonoides: 4'-O- β -D-glucopiranosido de naringenina, 3-O- β -glucopiranosido de miricetina, 5,7,4'-trihidroxi flavonona, 3,5,6,7,4'-pentahidroxi flavonol.	RMN	[36]
<i>M. scutellaris</i>	Ciudad de entre ríos, Brasil	Compuestos fenólicos: benzofenonas preniladas.	CG-MS, RP-HPLC	[30]

Cuadro 1. Compuestos identificados en estudios previos de geopropóleos recolectados en diferentes regiones del mundo (cont.).

Especie	Lugar de origen	Clase de compuesto	Método analítico	Referencia
<i>M. scutellaris</i>	Ciudad de entre Ríos, Brasil	<p>Compuestos fenólicos: 5,7-dihidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-propilcumarina.</p> <p>5,7-dihidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-cumarina, mameigina, hidroximameigina, mammeisina, cinamoiloxi-mammeisina, mammeina.</p>	RMN	[27]
<i>Scaptotrigona postica</i>	Maranhão, Brasil	<p>Compuesto fenólico: Catequin-3-O-galato, cafeoil glucósido, ácido 3,5-dicafeoil-quínico, ácido cafeicoquinico-O-arabinósido.</p> <p>Flavonoides: 7-metoxi-5-hidroxi-8-C-flavona ramnósido, apigenin-6,8-di-C-malonil glucósido dihexósido, apigenin-di-C-malonil trihexósido, acacetin-8-C-arabinósido-7-O-ramnósido, vicenin-2-catequin arabinósido, catequin ramnósido, apigenin-6,8-di-C-arabinósido glucósido, crisin-8-C-ramnósido-7-O-ramnósido, luteolin-8-C-cafeoil ramnósido.</p> <p>Alcaloides: metoxi echimidina, etoxi echimidina.</p>	RPHPLC-DAD-ESI-MS/MS	[35]

Cuadro 1. Compuestos identificados en estudios previos de geopropóleos recolectados en diferentes regiones del mundo (cont.).

Especie	Lugar de origen	Clase de compuesto	Método analítico	Referencia
<i>Scaptotrigona depilis</i>	Mato Grosso del Sur, Brasil	<p>Triterpenos: β-amirina, α-amirina, acetato de β-amirina</p> <p>Fitoesteroles: β-sitosterol</p> <p>Ácidos fenólicos: ácidos cinámicos, ácido benzoico, ácido ferúlico</p> <p>Compuestos fenólicos: ácido-<i>p</i>-cumárico, vanilina</p> <p>Vitaminas: α-tocoferol</p>	CG-MS HPLC	[29]
<i>Scaptotrigona depilis</i>	Nueva Esparta, Venezuela	Compuestos fenólicos: benzofenonas preniladas	CLAE-MS	[37]
<i>M. orbigny</i>	Mato grosso del sur, Brasil	<p>Flavonoides: naringenina, metil-aromadendrina, aromadendrina</p> <p>Triterpenos</p> <p>Compuestos fenólicos: <i>O</i>-cumaroil-<i>O</i>-galoil-hexósido, <i>O</i>-cumaroil-<i>O</i>-galoil-hexósido, di-<i>O</i>-galoil-<i>O</i>-cumaroil-hexósido, <i>O</i>-cinamoil-<i>O</i>-galoil-hexósido, di-<i>O</i>-galoil-<i>O</i>-cinamoil-hexósido, di-<i>O</i>-cumaroil-hexósido.</p>	HPLC-DAD-MS	[2]
<i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	Mato grosso del sur, Brasil	<p>Triterpenos: β-amirina, α-amirina, acetato-β-amirina</p> <p>Flavonoides: apigenina, quercetina, luteolina</p>	CG-MS HPLC	[29]

Cuadro 1. Compuestos identificados en estudios previos de geopropóleos recolectados en diferentes regiones del mundo (cont.).

Especie	Lugar de origen	Clase de compuesto	Método analítico	Referencia
<i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	Mato grosso del sur, Brasil	<p>Fitoesteroles: β-sitosterol, estigmasterol, taraxasterol</p> <p>Ácidos fenólicos: ácido vinílico, ácido cinámicos, ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido cafeico</p> <p>compuestos fenólicos: ácido-<i>p</i>-cumárico, vanilina</p> <p>Vitaminas: α-tocoferol</p>	CG-MS HPLC	[29]
<i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	Mato grosso del Sur, Brasil	<p>Flavonoides: aromadetrina, naringenina, metilaromadetrina.</p> <p>Compuestos fenólicos: cumaroil-galoil-hexósido, digaloil-cumaroil-hexósido, cinamoil-galoil-hexósido, digaloil-cinamoil-hexósido, dicumaroil-hexósido, dicumaroil-galoil-hexósido, cinamoil-cumaroil-hexósido, cinamoil-cumaroil-galoil-hexósido</p> <p>diterpenos</p>	HPLC-DAD-MS	[3]
<i>Tetragona clavipes</i>	Paraná, Brasil	<p>Ácidos grasos: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido caprónico, ácido láurico, ácido araquidónico, ácido láctico, ácido hidracrilíco.</p>	CG-EM	[28]

1.6 Actividades biológicas del geopropóleo

En las últimas décadas, en varios estudios ha demostrado las acciones biológicas y farmacológicas de diferentes tipos de geoprópoleos, tales como su actividad antinociceptiva, anti-inflamatoria, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiproliferativa, antitumoral, antimutagénica y actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer humano (Cuadro 2), revelando el interés de los investigadores por este producto y su potencial uso en el desarrollo de nuevos fármacos.

Cuadro 2. Actividades biológicas de geopropóleos producidos por abejas sin aguijón.

Especie de abeja	Actividad biológica	Microorganismo	Referencia
<i>M. scutellaris</i>	Antibacteriana	<i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus</i>	[30] [27]
	Antiproliferativa	<i>faecalis</i> , <i>Actinomyces</i> <i>naeslundii</i>	[41] [42]
	Antifúngica Gastroprotector	<i>Candida albicans</i>	
<i>M. favora orlinge</i> <i>M. marginata</i>, <i>Plebeia remota</i> <i>Plebeia spp.</i> <i>Scaptotrigona</i> <i>bipunctata</i> <i>Plebeia droryana</i> <i>Tetragonisca</i> <i>angustula</i> <i>Nanotrigona</i> <i>testacularis</i> <i>Lestrimellata spp</i> <i>Tetragona clavipes</i>	Antibacteriana Antifúngica	<i>S. aureus</i> , <i>Candida</i> <i>albicans</i>	[41]
<i>M. compressipes</i> <i>fasciculata</i>	Antibacteriana	<i>S. mutans in vivo</i>	[43]

Cuadro 2. Actividades biológicas de geopropóleos producidos por abejas sin aguijón (cont.).

Especie de abeja	Actividad biológica	Microorganismo	Referencia
<i>M. fasciculata</i> Smith	Antimicrobiana Antifúngica Fungistático Anti-inflamatorio Antitumoral Inmunomoduladora Antioxidante Citotóxico	<i>S. mutans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Pythium insidiosum</i>	[26] [8] [44] [34] [11]
<i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	Antibacteriano Antifúngico Antioxidante Anti-inflamatorio	<i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> resistente a metilina, <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecalis</i> resistente a vancomicina, <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> resistente a cefalosporina, <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. aeruginosa</i> resistente a imipenem. <i>Candida albicans</i>	[7] [3]
<i>M. subnitida</i> Duce	Antinociceptiva Antioxidante		[40] [32]
<i>M. mondury</i>	Antioxidante Antiproliferativa Antibacteriana	<i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> resistente a metilina, <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	[45]
<i>Scaptotrigona</i> sp.	Antitumoral Antiproliferativo	Tumor de Ehrlich	[46] [9]
<i>M. orbigny</i>	Antibacteriano Anti fúngico Antioxidante Antimutagénico Anti-inflamatorio	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. neoformans</i> <i>C. albicans</i> , <i>C. albicans</i> resistente Anfotericina B, <i>C. neoformans</i> ,	[2] [47]

1.7 Generalidades de *Leishmania*

1.7.1 Infección por *Leishmania*

La leishmaniasis es una enfermedad tropical y subtropical infecciosa provocada por 20 especies de protozoarios del género *Leishmania*. Esta enfermedad se trasmite a los seres humanos por la picadura de moscas hembras infectadas del género *Flebótomos* y *Lutzomyia*, dependiendo del tipo especie que lo causa puede afectar la piel, mucosas, tejidos y órganos internos⁴⁸. Por otra parte, la leishmaniasis se contempla como un problema de salud pública a nivel mundial y según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la sexta enfermedad tropical más importante, ya que afecta alrededor de 12 millones de personas en 88 países, además, se estima que hay aproximadamente 1.5-2 millones de nuevos casos cada año y 350 millones de personas en riesgo de infección⁴⁹.

1.7.2 Distribución en México

La leishmaniasis en México se conoce desde la época prehispánica y se ha descrito en todas sus formas clínicas, sin embargo, predominan ampliamente la cutánea pura y la cutáneo condral conocida popularmente como “úlceras de los chicleros”, que es producida por *Leishmania mexicana*^{50,51,52}. Las zonas endémicas en el país corresponden al sur del estado de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Coahuila, Nuevo León, Morelos y Jalisco⁵¹. A continuación, se enumeran los tipos de *Leishmania* que se han descrito en el país y su distribución:

- a) **Leishmaniasis cutánea localizada** (L.C.L): Tabasco, Sinaloa, Durango, Nayarit, Michoacán, Jalisco, Oaxaca, Veracruz-Llave, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.
- b) **Leishmaniasis cutánea difusa** (L.C.D): Tabasco, Quintana Roo, Michoacán, Guerrero, Coahuila de Zaragoza y Veracruz-Llave.
- c) **Leishmaniasis visceral** (L.V): Morelos, Oaxaca, Guerrero, Chiapas y Ciudad de México.

d) **Leishmaniasis mucocutánea (L.M):** Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Campeche.

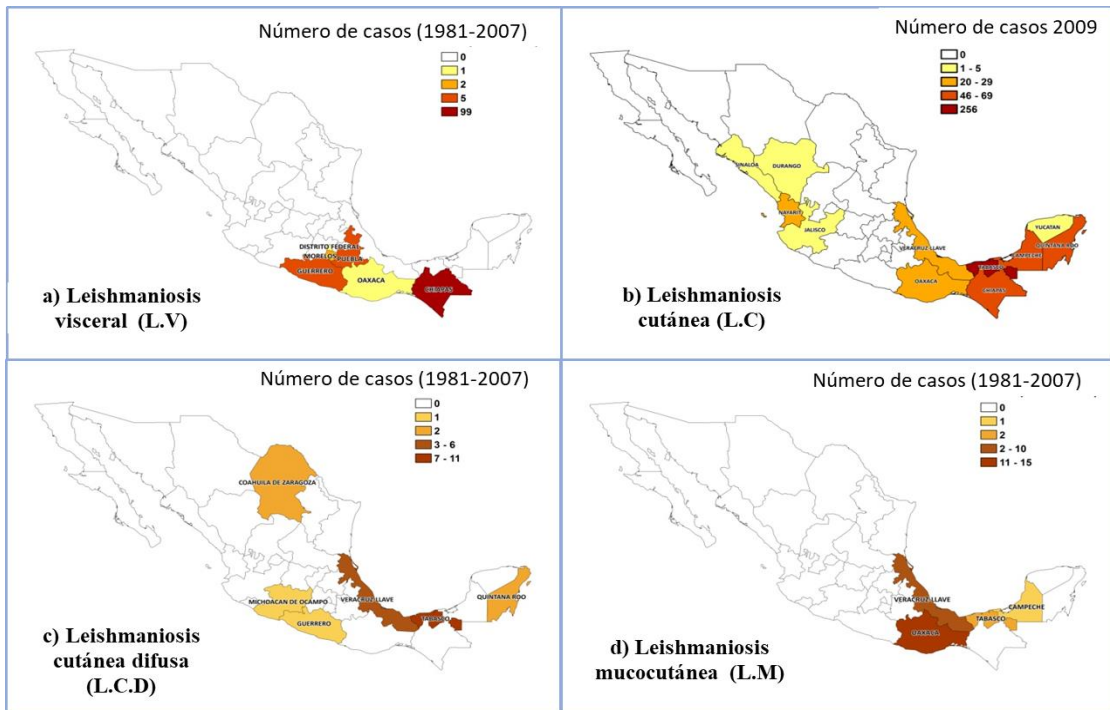


Figura 5. Distribución de las diferentes formas clínicas de leishmaniasis en México⁵³

Hay que mencionar, además, que en el país se han descrito tres especies de leishmania: *L. mexicana* que produce las formas cutáneas y difusa, es la más frecuente en el país, *L. chagasi* que genera la forma visceral y la *L. braziliensis* que causa la forma cutánea y mucocutánea⁵⁴.

En el 2018, la OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud) informó que la leishmaniasis cutánea y mucosa en el país tuvo una tasa de incidencia de 5.97 casos por cada 100,000 habitantes y se reportan 447 nuevos casos por año, que corresponden a 444 casos de leishmaniasis de tipo cutánea (99.3%) y 3 de mucosa (0.7%). Adicionalmente, se registró que el 81.7% de los casos corresponden al sexo masculino, adicionalmente, el 95.5% de los casos afecta a niños menores de 10 años⁵⁵.

1.7.3 Ciclo de vida

Leishmania presenta dos etapas de desarrollo en el ciclo de su vida, una etapa como promastigote que se replica en el intestino de un flebótomo y una etapa amastigote que se desarrolla intracelularmente en el huésped mamífero. El ciclo comienza cuando la hembra de la mosca de arena, que actúa como vector, inocular la forma infectiva del parásito (promastigote) al hospedero vertebrado. Luego, los promastigotes invaden el retículo endotelial de las células, transformándose en amastigote (de morfología redondeada u ovalada que miden 2-5 μm , sin flagelo), se multiplica activamente, se libera por lisis del macrófago e infecta nuevos macrófagos. El ciclo continúa cuando un nuevo mosquito pica al hospedero infectado, ingiriendo células parasitadas, en el tubo digestivo del mosquito el parásito se transforma en promastigote (de morfología alargada y con un flagelo), se multiplica activamente y, tras un periodo, migra hacia la faringe completando el ciclo⁵⁶ Figura 6.

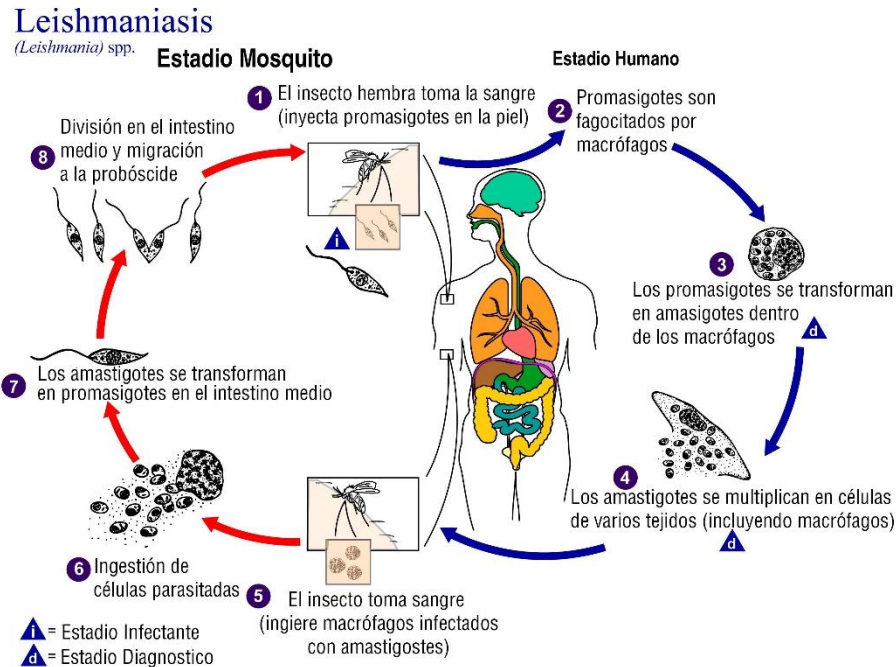


Figura 6. Ciclo de vida de *Leishmania*⁵⁷.

1.7.4 Tratamiento

Actualmente, no se cuenta con vacunas para tratar la leishmaniosis y para el tratamiento de esta enfermedad se usan fármacos que son costosos, tóxicos y que poseen numerosos efectos secundarios (Cuadro 3), así mismo, algunos de estos parásitos ya presentan una resistencia hacia estos medicamentos reduciendo su eficacia.

Cuadro 3. Información general en el tratamiento de leishmaniasis^{48,49,50}

Fármaco	Dosis	Eficacia	Ventajas	Desventajas
Antimoniales pentavalentes	15-20 mg/kg de peso por 21-28 días	35-95% (dependiendo del área)	Bajo costo, puede ser usado en combinación con anfotericina.	Naúseas, dolor abdominal, mialgias, inflamación pancreática, arritmia cardíaca y hepatitis.
Anfotericina B	0.75-1 mg/kg/día por 15-20 días, diariamente o alternadamente	>90%	Efectivo con bajo perfil de toxicidad	Fiebre con escalofríos, tromboflebitis toxoidales graves como miocarditis, hipotasemia severa, disfunción renal e incluso la muerte.
Paromomicina	15 mg/día por 21 días o 20 mg/kg por 17 días	94% India, 46-85% África	Bajo costo, efectivo	Ototoxicidad, hepatotoxicidad, erupciones cutáneas, nefrotoxicidad grave.

Cuadro 4. Información general en el tratamiento de leishmaniasis^{48,49,50} (cont.)

Fármaco	Dosis	Eficacia	Ventajas	Desventajas
Pentadamina	Tratamiento de corta duración	35-96% (dependiendo de la especie de Leishmania)	Eficaz para varias especies de leishmania	Mialgias, dolor en el lugar de la infección, náuseas, dolor de cabeza, alta tasa de hiperglucemia, como consecuencia de daño pancreático; hipotensión, taquicardia.
Miltefosina	100-150 mg/día durante 28 días	Asia (India), 94% África, 60-93%	Muy potente, tratamiento oral para L.V	Trastornos gastro intestinales, toxicidad renal, posiblemente teratogénico (contraindicado en el embarazo).

Por otra parte, en la medicina tradicional para el tratamiento de la leishmaniasis se usan extractos de plantas (que pueden ser administrados por vía oral o mediante preparaciones tópicas)⁵⁸, sustancias químicas y ácidos, tratamientos a base de calor, derivados del petróleo, entre otros^{59,60}, pese a que algunas de estas alternativas pueden ser eficaces, también generan efectos secundarios indeseables como cicatrices permanentes. Sin embargo, en estudios recientes se ha descrito que metabolitos secundarios de plantas poseen actividad leishmanicida como alcaloides, iridoides, terpenos, flavonoides, fenólicos, quinonas, flavonoides, esteroides, entre otros⁶¹.

Productos de abejas, como el própoley y el geoprópoley, poseen diferentes compuestos bioactivos que pueden usarse como alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis. En los últimos años las investigaciones con estos productos de las

abejas han revelado diversas actividades biológicas, especialmente antimicrobiana, antiparasitaria y antioxidante, así mismo una composición química compleja.

Selma y colaboradores (2007)¹² evaluaron muestras de propóleo contra *Leishmania amazonensis*, demostrando que reducen la carga parasitaria al monitorear el porcentaje de células infectadas y el número de parásitos intracelulares. Ambas muestras fueron recolectadas en el estado de Paraná (**BRG** y **BRPG**) y contienen como componentes mayoritarios conilferaldehídos, cabe destacar que la muestra de **BRPG** presentó altas concentraciones de compuestos prenilados. Los extractos etanólicos a una concentración de 25 µg/mL y después de 72 horas reducen el 78% de los macrófagos infectados. Adicionalmente, el propóleo recolectado en Algaos (**BRV**), se caracterizó por una presencia mayoritaria de compuestos prenilados y benzofenonas: Los ensayos biológicos utilizando como organismo de prueba *L. amazonensis* se demostró que a una concentración de 6 µg/mL y después de 72 horas de incubación se redujo en un 84.5% el porcentaje de macrófagos infectados sin observarse cambios significativos a mayores concentraciones.

En otro estudio realizado con propóleos procedentes de Brasil (estado de Minas Gerais) y Bulgaria se evaluaron sus efectos contra cuatro especies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* y *L. major*, asociadas con diferentes formas clínicas de leishmaniasis. En los extractos etanólicos de Bulgaria (**Et-Bul**) se determinó por medio de cromatografía de gases de alta resolución y alta temperatura acoplado a espectrometría de masas (HT-HRGC-MS) que los componentes mayoritarios eran flavonoides (pinostrobina, pinocembrina, crisina y una serie de pinobanksinas) además de ácidos aromáticos, ésteres y ácidos grasos; mientras que en los extractos de Brasil (**Et-Br**) los componentes mayoritarios fueron amirinas, dietilmetil-succinato, isobutilquinolina, acetato de geranilo y presentó una baja concentración de flavonoides. El extracto Et-Bul presentó una actividad sobresaliente contra *L. major* (CI₅₀= 7.2 mg/mL), *L. amazonensis* (CI₅₀= 29.3 mg/mL) y *L. chagasi* (CI₅₀= 53.9 mg/mL) pero no un efecto significativo contra *L. braziliensis* (CI₅₀= 142.2 mg/mL). Por otra parte, en el Et-Br si presentó un efecto significativo contra *L. major* (CI₅₀= 48.2mg/mL),

L. chagasi (CI₅₀= 49.9 mg/mL), *L. braziliensis* (CI₅₀= 48.6 mg/mL) pero no contra *L. amazonensis* (CI₅₀= 229.3 mg/mL). Los autores indican que la actividad leishmanicida está relacionada con la presencia de compuestos de tipo flavonoides en el ET-Bul y amirinas en el ET-Bra¹³.

Karina y colaboradores (2008)⁶², realizaron la evaluación *in vitro* e *in vivo* del extracto etanólico del propóleo verde obtenido de Oliveira en el Estado de Minas Gerais (ET-BPE) contra *L. braziliensis*, el ensayo *in vitro* se realizó tanto en promastigotes como amastigotes y se usó como control positivo anfotericina B, por otra parte en el ensayo *in vivo* se trabajó con 4 grupos de ratones macho Balb/C dependiendo del tipo de administración: (1) oralmente con (1.5 mg/kg por día del ET-BPE), (2) tópicamente (1.5 mg/kg por día del ET-BPE), (3) oralmente y tópicamente con la misma concentración que los grupos anteriores, (4) como control positivo se empleo glucantime intraperitonealmente (20 mg/kg por día) y el grupo control negativo (5) usando NaCl 0.9%. Primeramente, se identificaron los ácidos caféico y *p*-cumárico, la aromadendrina-4'-metil-eter, el ácido 3-prenil-*p*-cumárico y al ácido 3,5-difenil-*p*-cumárico por HPLC como componentes mayoritarios del ET-BPE. En el análisis *in vitro* se observó que el extracto tuvo un efecto significativo (CI₅₀= 18.3 µg/mL) en promastigotes, sin embargo con amastigotes no se observó un efecto, por otro lado, en los ensayos *in vivo* con el tratamiento oral y ET-BPE se observó una reducción significativa en el diámetro de la lesión en un 78.6% en comparación con el control negativo después de 90 días de tratamiento. El tratamiento tópico con ET-BPE también redujo el diámetro de la lesión en un 84.3%. A su vez, en el ensayo simultaneo oral y tópico, con la misma dosis, se observó una reducción del 90% del diámetro de las lesiones, mientras que con el control positivo solo se observó una reducción del diámetro en un 57.7%. Los autores indican que el modo de acción anti-leishmania del propóleo aún no es muy claro, sin embargo, se sugiere que su efecto puede estar asociado a la activación y en el aumento de la capacidad fagocítica de los macrófagos.

Duran *et al.* 2008¹⁵, evaluó la actividad antileishmanicida del propóleo de Adana contra promastigotes de diferentes cepas de *Leishmania tropica* aisladas clínicamente (KD,

ID, AM, FY). En el estudio se usaron diferentes concentraciones del propóleo en DMSO (25, 50, 100, 250, 500 y 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y como control positivo glucantamine. En los experimentos se observó que a una concentración mayor a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del propóleo los parásitos sufrieron cambios en su morfología en comparación con los parásitos del control. Adicionalmente, a concentraciones mayores de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del propóleo y después de 72 horas se inhibió significativamente la proliferación de los parásitos.

2.OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Aislar los componentes mayoritarios y determinar la actividad antioxidante, antibacteriana y leishmanicida del extracto etanólico de un geopropóleo recolectado en Cuetzalan, Puebla.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Preparar el extracto etanólico del geopropóleo.
- ✓ Realizar el fraccionamiento del extracto etanólico para la posterior separación y purificación de los compuestos mediante procesos de partición y cromatográficos.
- ✓ Determinar la estructura molecular de los compuestos aislados utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- ✓ Evaluar la capacidad antioxidante del extracto etanólico *in vitro*.
- ✓ Evaluar el efecto del extracto etanólico y los compuestos mayoritarios en un panel de bacterias de importancia médica.
- ✓ Evaluar el efecto *in vitro* que ejercen el extracto etanólico y los compuestos mayoritarios sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Recolección del material

La muestra de un geopropóleo producido por la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana* (Figura 7) fue colectada por el biólogo Jorge Jiménez el 27 de abril de 2017 en el meliponario ubicado en la localidad de Coapan-Santiago Yancuittlaplan Municipio Cuetzalan del progreso (Estado de Puebla), este material se dejó en refrigeración a 4°C para su posterior análisis.



Figura 7. Geopropóleo de *Scaptotrigona mexicana*.

3.2 Obtención del extracto etanólico

Se tomaron 113 g de geopropóleo y se pulverizaron, posteriormente se adicionaron 500 mL de etanol: agua (90:10) y se sumergió en un baño ultrasónico (BRANSON 2510) a una frecuencia de 40 kHz por 60 minutos a temperatura ambiente. Este proceso de extracción se realizó por triplicado. Finalmente, el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el extracto concentrado (100.92 g) y se conservó a 4°C. Posteriormente, una porción del 90 g y se resuspendió en 500 mL de la mezcla de etanol:agua (90:10) se realizó el reparto líquido-líquido utilizando 500 mL de hexano. Este proceso se realizó por triplicado (Cuadro 4).

Cuadro 5. Rendimiento del reparto líquido-líquido del extracto de etanol del geopropóleo.

Repartos	Peso [g]
1 ^{er} reparto hexano	40.1
2 ^{do} reparto hexano	11.6
3 ^{er} reparto hexano	9.5

3.3 Determinación de contenido de fenoles totales

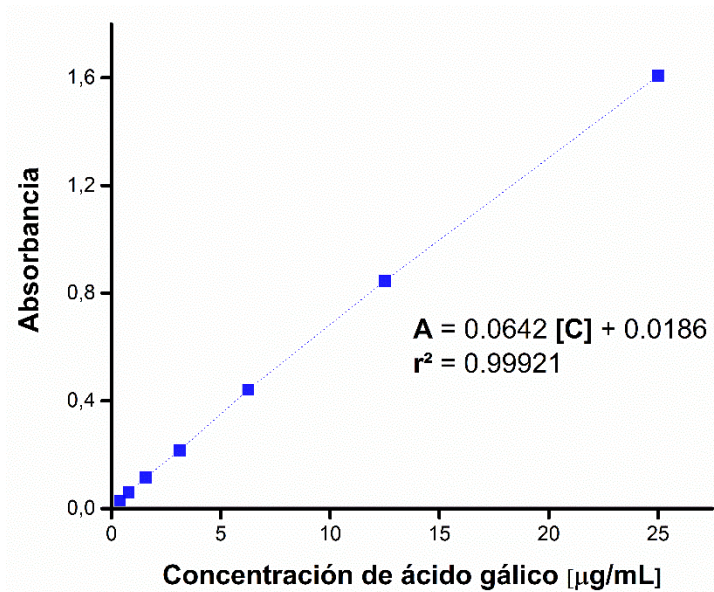
Para la cuantificación de fenoles se usó el método de Folin-Ciocalteu. Este ensayo consiste en la transferencia de electrones en un medio alcalino de compuestos fenólicos a la mezcla de complejos ácidos fosfomolibdico/fosfotúngstico para generar un complejo de color azul cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de fenoles presente en la muestra y se determina espectroscópicamente alrededor de 760 nm⁶³.

3.3.1 Curva de calibración de fenoles y preparación de las muestras de geopropóleo

Con el fin de expresar los resultados como equivalentes de ácido gálico (mg EAG/ mg de extracto), se construyó una curva de calibración con este reactivo. Para la curva se preparó una disolución de ácido gálico (Sigma-Aldrich) con una concentración de (790 µg/mL), luego se procedió a realizar las diluciones seriadas usando una placa de 96 pozos, tomando 100 µL de la solución madre y mezclándola con 100 µL de agua. Posteriormente, a cada uno de los pozos conteniendo 100 µL de la solución de ácido gálico se le adicionaron 20 µL de la disolución de Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma Aldrich) y se dejó cinco minutos en la oscuridad. Finalmente, se agregó a cada uno de los pozos 80 µL de una solución de Na₂CO₃ al 8% (*m/v*) y se dejó la reacción en la oscuridad durante una hora, después de este periodo se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Epoch Biotek) para microplacas. La curva de calibración se generó en un intervalo de concentraciones entre 24.6 µg/mL-0.38 µg/mL. En la Gráfica

1 se presenta la curva de calibración que se adecua a la ecuación de una recta, esto se verificó con el coeficiente de correlación lineal ($R^2 = 0.999$).

El extracto etanólico se trató de la misma forma que el ácido gálico y se realizaron las diluciones pertinentes para determinar el contenido total de fenoles a partir de la curva de calibración. Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones y se expresan como mg equivalentes de ácido gálico/gramo de extracto (EAG/g).



Gráfica 1. Curva de calibración de fenoles

3.5 Determinación del contenido de flavonoides

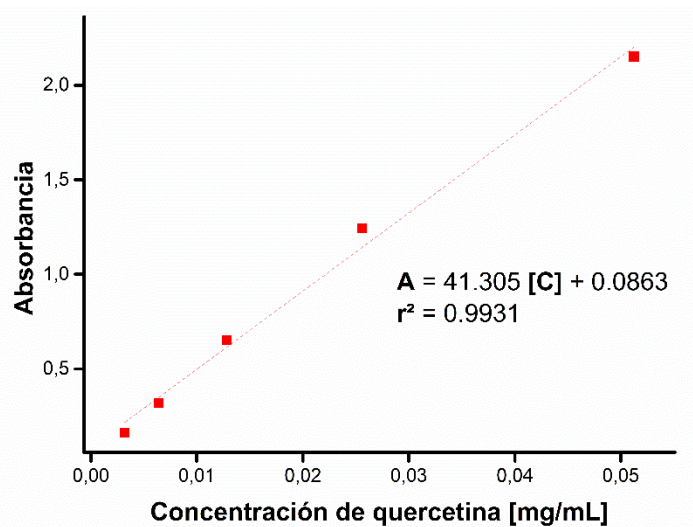
El contenido de flavonoides totales en la muestra de geopropóleo se calculó utilizando el método de Kumazawa. Este procedimiento consiste en la formación de complejos estables de flavonoide-aluminio⁶⁴.

3.5.1 Curva de calibración y preparación de las muestras de geopropóleo

Con el fin de expresar los resultados como equivalentes gramos de quercetina (mg equivalentes de quercetina/g muestra extracto), se realizó la curva de calibración a partir de una solución stock de quercetina con una concentración de 0.41 mg/mL, de esta solución se tomó una alícuota de 100 μL y se mezclaron con 100 μL de etanol. Como paso siguiente, con esta disolución madre se realizaron diluciones seriadas en

una placa de 96 pozos tomando una alícuota de 100 μL para obtener soluciones en un rango de concentración de 0.05 a 3.0×10^{-3} mg/mL. Posteriormente, a cada uno de los pozos se le adicionaron 100 μL de AlCl_3 , observándose una coloración amarilla. Esta mezcla se mantuvo por 15 minutos en ausencia de luz y, por último, se midió la absorbancia a 420 nm. La curva de calibración indica una relación lineal entre las dos variables trabajadas y un coeficiente de correlación lineal ($R^2= 0.993$). En la Gráfica 2 se presenta la curva de calibración obtenida para esta determinación.

Para la cuantificación del extracto etanólico se tomaron 10 mg y se disolvieron en 1 mL de metanol y se aplicó el mismo tratamiento que la quercetina. La determinación de la muestra se realizó por triplicado y los resultados se informan como el valor promedio de las determinaciones y se expresaron en mg equivalentes de quercetina/gramo de extracto (mg EQ/g).



Gráfica 2. Curva de calibración de flavonoides.

3.6 Determinación de la capacidad antioxidante

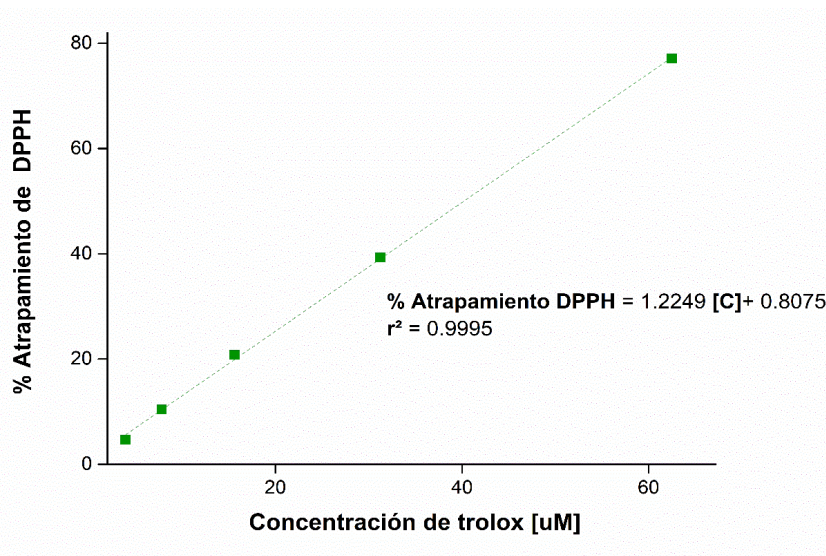
La eliminación del radical α, α -difetil- β -picrilhidrazilo (DPPH) es un ensayo utilizado para evaluar el potencial antioxidante de un extracto, compuesto u otras fuentes biológicas⁶⁵. Este método consiste en la medición de la capacidad de eliminación del radical por parte de un antioxidante. El electrón impar del átomo de nitrógeno en DPPH

se reduce al recibir un átomo de hidrógeno del antioxidante, dando lugar a la forma reducida con la pérdida del color violeta.

La actividad antioxidante del extracto se midió mediante la capacidad de eliminación del radical DPPH. Primero se realizó una curva de calibración usando Trolox (Gráfica 3), mediante diluciones seriadas de concentraciones en el rango de 62.5 μM . a 3.90 μM . Luego se tomaron 100 μL del extracto etanólico y se mezclaron con 100 μL de la solución de DPPH. Después de una hora de reacción se midió la absorbancia a 517 nm. Para el análisis de los resultados las absorbancias se convirtieron en porcentaje de la actividad antioxidante (%AA) según la ecuación:

$$\%AA = 100 - \{(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) \times 100 / Abs_{control}\}$$

A partir de estos datos se construyó la curva analítica para la muestra, con el porcentaje de actividad antioxidante (%AA) versus concentración del extracto, donde a través de la ecuación de regresión lineal se calculó la concentración capaz de secuestrar el 50% (CI_{50}) de los radicales libres de DPPH.



Gráfica 3. Curva de calibración de trolox.

3.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Los microorganismos de prueba usados para determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de geopropóleo fueron *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

3.7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad antibacteriana del extracto etanólico se examinó por la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Esta se define como la concentración más baja del extracto o sustancia que puede inhibir el crecimiento visible del microorganismo después de incubar por 24 horas. Para determinar la CMI se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos y se realizaron diluciones seriadas del extracto (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.97 µg/mL) y se usó como medio de cultivo caldo de la infusión de cerebro-corazón BHI (Merck KGaA), luego se adicionó a cada una de las diluciones 20 µL de suspensión de bacteria y se dejó incubar por 24 horas a 37°C. Por otra parte, cada una de las cepas bacterias utilizadas se ajustó a 0.5 (1×10^6 UFC/mL) en la escala de McFarland.

3.8 Purificación, detección e identificación de compuestos

Con la fracción de hexano obtenida del reparto del extracto total del geopropóleo se realizaron fraccionamientos consecutivos mediante cromatografía en columna abierta y posteriormente, empleando cromatografía en capa fina preparativa. Los compuestos aislados se evaluaron para determinar sus actividades biológicas.

Como primer paso, se realizó un fraccionamiento secundario de la fracción de hexano mediante cromatografía de columna abierta, como adsorbente gel de sílice y el sistema de elución consistente en una mezcla de hexano:diclorometano:acetato de etilo en gradiente de polaridad y finalmente metanol. El fraccionamiento se resume en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción de hexano del geopropóleo por cromatografía en columna abierta.

Fracción	Composición del eluyente	Peso (g)
F1 - F5	hexano:diclorometano (1:1→7:3)	21.98
F6 - F10	hexano:diclorometano (1:3→0:1)	8.46
F11 - F15	diclorometano:metanol (9:1→4:1)	4.96
F16 - F20	diclorometano:metanol (4:1→7:3)	3.26

Cada una de las fracciones obtenidas se monitorearon mediante cromatografía de capa fina utilizando cromatoplasmas (Kiesegel 60 F₂₅₄), detección con luz ultravioleta a longitudes de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) y la adición de un agente cromógeno (anisaldehído sulfúrico) y posterior calentamiento: Las fracciones se agruparon y por el perfil presentado se decidió continuar con el estudio de las fracciones F1 y F12.

La fracción F1 se sometió a cromatografía de columna utilizando como soporte gel de sílice impregnada con una solución de nitrato de plata al 10% (AgNO₃) y como sistema de elución una mezcla de hexano:diclorometano:acetato de etilo; se obtuvieron 150 fracciones, de las cuales, la fracción 98-100 (27.3 mg) reveló la presencia de dos compuestos mayoritarios. Estos compuestos se resolvieron mediante cromatografía de capa fina preparativa con gel de sílice y la elución sucesiva con mezclas de hexano:diclorometano en porciones de 8:2, 8:4, 8:6. Este proceso permitió la obtención de los compuestos **C1a** y **C1b** (9.7 mg).

La fracción F12 también se trabajó con cromatografía de columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de polaridad creciente de diclorometano:acetato de etilo. Se obtuvieron 273 fracciones, de las cuales, la fracción 180-183 (42.6 mg) se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa con un sistema de elución de diclorometano:acetato de etilo (4:1). El proceso permitió la purificación del compuesto **C2** (17 mg).

Por otro lado, se tomaron 2.93 g del extracto etanólico obtenido de la partición y se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía de columna utilizando gel de sílice y como sistema de elución una mezcla de polaridad creciente, hexano: diclorometano:acetato de etilo obteniéndose 150 fracciones, de las cuales, la fracción combinada 68-70 (40.2 mg) se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa con un sistema de elución de diclorometano:acetato de etilo (98:2), con la cual se eluyó una vez y se obtuvo el compuesto **C3** (13 mg). Por último, la fracción 110-116 (90.2 mg) se purificó por cromatografía con el sistema diclorometano: acetato de etilo y se obtuvo los compuestos **C4a** y **C4b** (30 mg).

3.9 Evaluación de la actividad leishmanicida del extracto etanólico y compuestos mayoritarios

Usando tubos estériles de 5 mL, los extractos se resuspendieron en DMSO y se diluyeron en medio 199 (Biowest, Cat.n° S1650-500) para obtener las concentraciones finales de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto etanólico y 400, 350, 300, 250 y 200 $\mu\text{g/mL}$ para la fracción de hexano. Luego, se añadieron a cada uno de los tubos $1 \times 10^6/\text{mL}$ de promastigotes de *L. mexicana* y se dejaron incubando a 25°C, además, se usó como control negativo promastigotes y medio. La actividad leishmanicida se evaluó después de 72 h con el conteo del número total de promastigotes vivos, en una cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico ZEISS. Los resultados se expresan como la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento del parásito en un 50% (CI_{50}) y representan la media de las muestras por cuadruplicado analizadas en cuatro ensayos idénticos.

Los parásitos usados en los ensayos se obtuvieron de un paciente de Tabasco, que presentaba una infección por *L. mexicana* de tipo cutánea localizada (Candona). Adicionalmente, para estos experimentos los parásitos se cosecharon y se lavaron a partir del día 5 de cultivo (fase estacionaria).

3.9.1 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante regresión no lineal para obtener los valores de CI_{50} . Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Mann-Whitney para comparar el número de parásitos de cada concentración probada con respecto al control. Las diferencias fueron significativas cuando el valor de p fue inferior a 0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad antioxidante y antibacteriana

El contenido de fenoles y flavonoides en propóleos es un parámetro de calidad del material vegetal, así como su potencial de actividad biológica. La Norma Oficial Mexicana de Propóleo NOM-0003-SAG/GAN-2017 establece las especificaciones de producción, características físicas, químicas y antimicrobianas, que deben cumplir los propóleos y sus extractos para su procesamiento y comercialización en el país. El contenido de fenoles y flavonoides del extracto etanólico del geopropóleo recolectado fue de 6.29 mg EAG/g y 0.72 mg EQ/g, respectivamente (Tabla 1). Estos valores son inferiores a los que establece la Norma Mexicana (cantidad mínima de fenoles 50 mg EAG/g y para flavonoides 5mg EQ/g). Adicionalmente, esta muestra no cumple con el parámetro de actividad antioxidante, teniendo una concentración mínima inhibitoria mayor a la establecida ($CI_{50} = 100 \mu\text{g/ml}$), por lo tanto, este geopropóleo no cumple con los parámetros de calidad de la NOM-0003-SAG/GAN-2017.

Tabla 1. Resultados de la determinación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante.

Fenoles totales mg EAG/g extracto	Flavonoides totales mg EQ/g extracto	DPPH CI_{50} mg/mL
6.29	0.72	0.55

Se ha observado que las abejas sin aguijón producen geopropóleos para sellar su colmena, como defensa contra microorganismos y para prevenir la descomposición de criaturas que han sido asesinadas por las abejas después de la invasión de la colmena⁶⁶. En estudios previos se ha demostrado que los propóleos y geopropóleos producidos por *A. mellifera* y Meliponas, respectivamente, poseen potencial antimicrobiano^{67,68}. En este estudio la actividad antibacteriana del geopropóleo producido por *S. mexicana* se determinó utilizando tres bacterias de importancia médica y el método de microdilución en placa de 96 pozos. En la Tabla 2 se presentan

las concentraciones mínimas inhibitorias determinadas para cada una de las bacterias probadas. Por otra parte, del extracto etanólico se observó una actividad inhibitoria leve del crecimiento de la bacteria *S. mutans* con una concentración de 500 µg/mL, contra la bacteria *S. aureus* a una concentración de 1000 µg/mL, mientras que con *P. aeruginosa* no se observó una inhibición a concentraciones menores a 1000 µg/mL. Además, no se observó inhibición del crecimiento de las bacterias *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. mutans* a la concentración límite de 1000 µg/mL con la fracción de hexano.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico y la fracción de hexano obtenidos del geoprópoleo.

Muestra	Concentración mínima inhibitoria (CMI)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Fracción de hexano	>1000	>1000	>1000
Extracto etanólico	500	1000	>1000

En otras investigaciones se ha demostrado que los extractos de geopropoleos poseen una actividad antibacteriana contra *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecalis*, *E.coli*, *P. aeruginosa*^{2,5,7,3,43}. Así mismo, se ha encontrado que el propóleo es menos eficiente contra las bacterias Gram-negativas que contra las Gram-positivas, dado que las primeras poseen una pared celular más compleja y superior contenido lipídico, lo que puede explicar su resistencia al geoprópoleo^{44,69}. Por otra parte, es importante mencionar que un estudio utilizando la fracción de menor polaridad de un geoprópoleo producido por *M. scutellaris* sobre la formación de biofilms por *S. mutans*, no observó un decremento en el número de células viables, pero sí hubo una reducción de la producción de polisacáridos y proteínas (responsables de la formación del biofilm) que condujo a un cambio estructural de la matriz y una reducción de la biomasa. Por lo que se concluyó que este geoprópoleo puede contener sustancias bioactivas prometedoras para controlar la placa oral, para prevenir la caries dental y la

enfermedad relacionada con la biocapa oral⁷⁰. La actividad biológica que han demostrado otras muestras de geopropóleos con estas bacterias pueden ser atribuidas a la diferencia de composición química y las concentraciones de los compuestos, por otra parte, puede haber diferencias en la actividad antibacteriana de los extractos de propóleos dependiendo de la especie de abeja sin aguijón que lo produzca.

4.2 Componentes mayoritarios aislados del geopropóleo producido por *Scaptotrigona mexicana* y elucidación estructural

La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó utilizando RMN mono (¹H, ¹³C) y bidimensional (HSQC, HMBC y COSY). Los datos espectroscópicos se compararon con los datos reportados en la literatura.

A partir del extracto etanólico del geopropóleo producido por *Scaptotrigona mexicana* se aislaron triterpenoides (Figura 8).

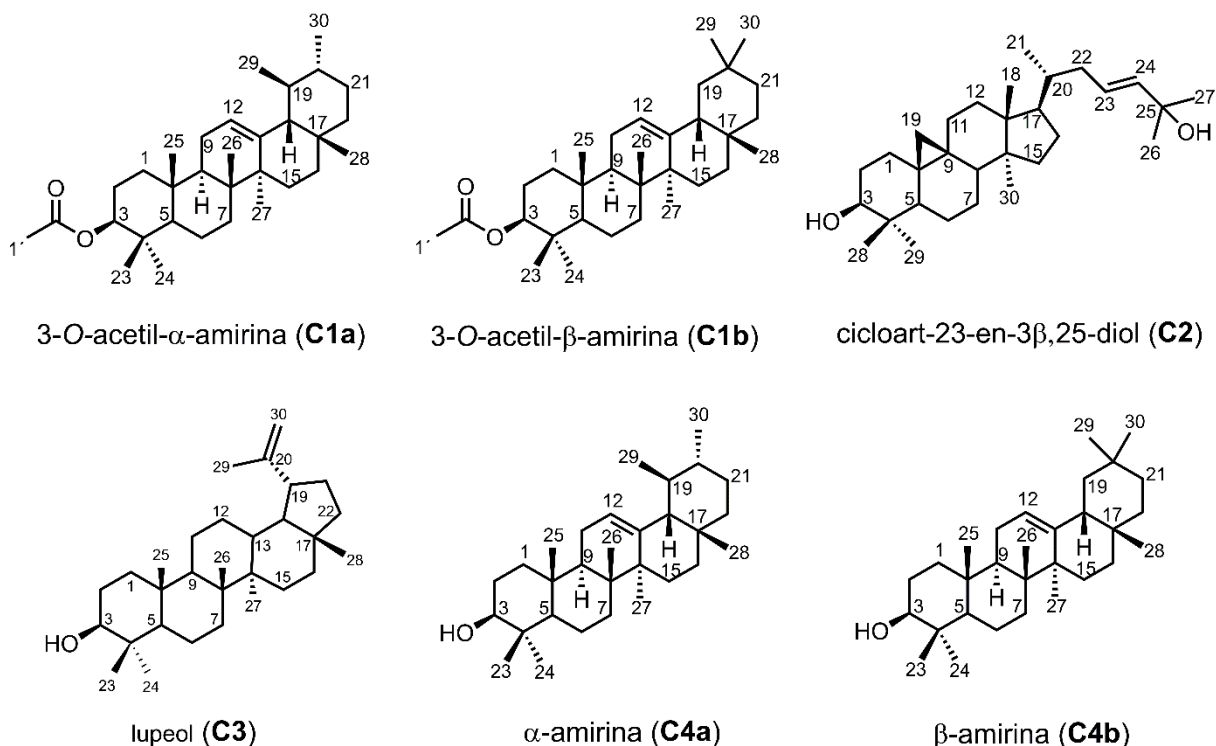


Figura 8. Estructura de los triterpenoides aislados en geopropóleo producido por *Scaptotrigona mexicana*.

4.2.1 Mezcla de 3-O-acetil- α -amirina (C1a) y 3-O-acetil- β -amirina (C1b)

Este compuesto se aisló como un sólido blanco que en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 1, anexos) presentó 32 señales de carbono, que fueron asignadas con la ayuda del espectro HSQC a nueve metilos y siete metinos, seis carbonos cuaternarios, nueve metilenos y un carbonilo. El espectro de RMN ^1H presentó un protón oleofínico a campo bajo en δ_{H} 5.12 ppm (1H, t, $J= 3.63$, H-12 y H-13) junto con las señales de los carbonos δ_{C} 124.47 (CH, C-12) y 139.78 (C, C-13), respectivamente⁷¹. Adicionalmente, se observaron las señales para un protón oxigenado (Espectro 2, anexos) en δ_{H} 4.50 (m, H-3) y metilo a campo bajo en 2.05 (s, H-1'). Por otra parte, en el espectro de RMN ^{13}C se observaron las señales en δ_{C} 171.17 y 21.47 asignables al carbono de carbonilo y al metilo de un acetilo. Además, se observó la presencia de dos dobletes en δ_{H} 0.79 y 0.93 correspondientes a los metilos 29 y 30 de la molécula.

3-O-acetil- α -amirina (C1a) RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3): δ_{H} 5.12 (t, $J= 3.6$ Hz, 1H, H-12), 4.50 (m, 1H, H-3), 2.05 (s, 3H, H-1'), 1.33 (m, 1H, H-19), 1.06 (s, 3H, H-27), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.98 (s, 3H, H-25), 0.92 (d, $J= 6.2$ Hz, 3H, H-30), 0.87 (s, 6H, H-23 y H-24), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.79 (d, $J= 6.2$ Hz, 3H, H-29). RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3): δ_{C} 171.17 (s, C-2'), 139.78 (s, C-13), 124.47 (s, C-12), 81.11 (s, C-3), 59.21 (s, C-18), 55.41 (s, C-5), 47.79 (s, C-9), 42.22 (s, C-14), 41.68 (s, C-22), 40.18 (s, C-8), 39.80 (s, C-19), 39.76 (s, C-20), 38.61 (C-1), 38.04 (s, C-4), 37.29 (s, C-10), 33.90 (s, C-17), 33.01 (s, C-7), 31.40 (s, C-21), 28.90 (s, C-28), 28.24 (s, C-16), 28.22 (s, C-23), 26.75 (s, C-15), 23.75 (s, C-2), 23.52 (s, C-11), 23.37 (s, C-27), 21.55 (s, C-30), 21.47 (s, C-1'), 18.39 (s, C-6), 17.66 (s, C-29), 17.01 (s, C-26), 16.89 (s, C-24), 15.89 (s, C-25).

En el espectro (Espectro 3, Anexo) también se observó la señal correspondiente al protón H-12 de la **3-O-acetil- β -amirina (C1b)**, en una proporción de α/β (1/0.76) (Figura 9). Otras señales observadas en δ_{H} 4.46 ppm (m, H-3) y 2.05 ppm (s, H-2') son congruentes con la presencia del acetilo en C-3.

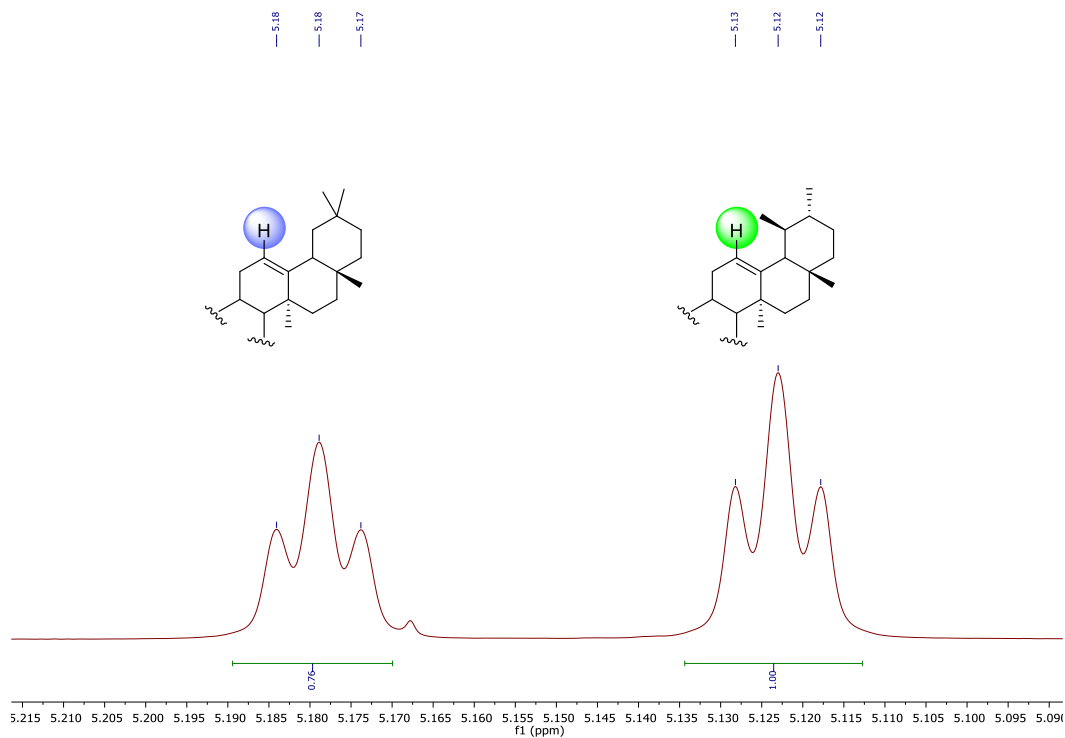


Figura 9. Proporción de los isómeros α/β de la 3-O-acetil-amirina en el espectro de RMN ^1H .

3-O-acetil- β -amirina (C1b) RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3): δ_{H} 5.18 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-12), 4.46 (m, 1H, H-3), 2.05 (s, 3H, H-1'), 1.67 (m, 2H, H-19), 1.13 (s, 3H, H-27), 0.97 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-25), 0.87 (s, 3H, H-23), 0.86 (s, 9H, H-29, H-30, H-24), 0.83 (s, 3H, H-28). RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3): δ_{C} 171.18 (s, C-2'), 145.37 (s, C-13), 121.79 (s, C-12), 81.10 (s, C-3), 55.40 (s, C-5), 47.70 (s, C-9), 46.93 (s, C-19), 41.86 (s, C-14), 39.96 (s, C-8), 38.41 (s, C-21), 37.97 (s, C-4), 37.86 (s, C-1), 36.99 (s, C-7), 36.94 (s, C-10), 34.88 (s, C-22), 33.48 (s, C-30), 32.73 (s, C-17), 31.24 (s, C-20), 28.55 (s, C-28), 28.22 (s, C-23), 27.07 (s, C-16), 26.28 (s, C-15), 26.10 (s, C-27), 23.84 (s, C-29), 23.72 (s, C-2), 23.68 (s, C-11), 21.47 (s, C-1'), 18.41 (s, C-6), 16.95 (s, C-26), 16.89 (s, C-24), 15.71 (s, C-25).

En un estudio previo realizado por Bandeira y colaboradores (2007)⁷² utilizando la mezcla de 3-O-acetil- α -amirina se demostró que este tipo de compuestos tiene actividad anti-inflamatoria.

4.2.2 Cicloart-23-en-3 β ,25-diol (C2)

Este compuesto se aisló como un sólido blanco y su espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4, anexos) reveló la presencia de 30 señales de carbono asignadas con la ayuda del espectro HSQC a siete metilos y siete metinos, seis carbonos cuaternarios y diez metilenos. El espectro de RMN ^1H revela la presencia en δ_{H} 5.59 de una señal que integró para dos protones asignable a un doble enlace ubicado en los carbonos C-23 (δ_{C} 125.75) y C-24 (δ_{C} 139.50) de la cadena lateral. Adicionalmente, se observaron a campo alto las señales características para un ciclopropilo en δ_{H} 0.55 (1H, dd, $J= 4.3$ Hz, H-19) y 0.33 ppm (1H, dd, $J= 4.3$ Hz, H-19). Por otra parte, en el espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY, se visualizaron las conectividades entre los protones vecinales y se observó que el protón oleofínico en δ_{H} 5.59 presentaba un acoplamiento con las señales en δ_{H} 2.16 y 2.18 asignables a los protones del metileno 22. En el espectro de HSQC estas señales correlacionan con la señal en δ_{C} 39.18. Adicionalmente, en el espectro HMBC la señal en δ_{H} 5.59 presentaba un acoplado con la señal C-25 (δ_{C} 70.75). A su vez, este carbono presentaba un cuadro de conectividad con la señal en δ_{H} 1.31 (s, 6H, H-29 y H-30) asignable a los protones de los metilos 29 y 30. **Cicloart-23-en-3 β ,25-diol (C2)** RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 5.59 (m, 2H, H-23 y H-24), 3.28 (dd, $J= 11.2, 4.4$ Hz, 1H, H-3), 1.31 (s, 6H, H-26 y H-27), 0.96 (s, 6H, H-29 y H-18), 0.88 (s, 3H, H-30), 0.86 (d, $J= 6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.81 (s, 3H, H-28), 0.55 (d, $J= 4.2$ Hz, 1H, H-19a), 0.33 (d, $J= 4.2$ Hz, 1H, H-19b). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 139.50 (C-24), 125.75 (C-23), 78.98 (C-3), 70.89 (C-25), 52.15 (C-17), 48.97 (C-14), 48.11 (C-8), 47.24 (C-5), 45.45 (C-13), 40.63 (C-4), 39.18 (C-22), 36.53 (C-20), 35.72 (C-15), 32.93 (C-1), 32.11 (C-12), 30.53 (C-2), 30.12 (C-19), 30.03 (C-25, C-26), 28.22 (C-7), 26.59 (C-16), 26.24 (C-10), 26.15 (C-11), 25.58 (C-29), 21.26 (C-6), 20.13 (C-9), 19.44 (C-30), 18.43 (C-21), 18.23 (C-18), 14.15 (C-28).

En un estudio realizado por Shamsabadipour y colaboradores (2013)⁷³ se demostró que este compuesto tiene una actividad antiviral contra anti herpes simple (HSV-1) con una $\text{CI}_{50}= 86.63 \mu\text{g/mL}$. Además, se ha descrito que este compuesto tiene actividad anti-inflamatoria⁷⁴

4.2.3 Lupeol (C3)

A partir del espectro de ^1H (espectro 7, anexos) se identificaron las señales características de un triterpeno pentacíclico tipo lupano, se observaron siete señales simples correspondientes a los grupos metilos en δ_{H} 0.78, 0.82, 0.84, 0.93, 0.95, 1.01 y 1.72. Adicionalmente, se observaron señales en δ_{H} 4.68 (d, $J = 2.3$ Hz, H-30a), δ_{H} 4.56 (dd, $J = 2.4, 1.4$ Hz, 1H, H-30b) características de un grupo propenilo. Estas señales presentaban en el espectro de HSQC acoplamiento con las correspondientes a los carbonos en δ_{C} 109.44 (C-30) y 151.13 (C-20). Además, se observó que la señal en δ_{H} 3.19 ppm (dd, 4.8 y 11.6 Hz, H-3) correlacionaba con el C-3 (δ_{C} 76.36). En el espectro de RMN ^{13}C se observó la presencia de 30 señales de carbono que fueron asignadas con el auxilio del espectro de HSQC a siete metilos, seis metinos, seis carbonos cuaternarios y 11 metilenos. **Lupeol (C3)** RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 4.68 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-30a), 4.56 (dd, $J = 2.4, 1.4$ Hz, 1H, H-30b), 3.38 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-3), 2.37 (td, $J = 11.1, 5.9$ Hz, 1H, H-19), 1.67 (s, 3H, H-29), 1.01 (d, $J = 9.2$ Hz, 3H, H-25), 0.95 (s, 3H, H-27), 0.93 (s, 3H, H-23), 0.84 (s, 3H, H-26), 0.81 (s, 3H, H-24), 0.78 (s, 3H, H-28). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} 151.13 (C-20), 109.44 (C-30), 76.36 (C-3), 50.29 (C-9), 49.11 (C-5), 48.38 (C-18), 48.14 (C-19), 43.12 (C-17), 43.01 (C-14), 41.12 (C-8), 40.12 (C-22), 38.11 (C-13), 37.64 (C-4), 37.38 (C-10), 35.69 (C-16), 34.23 (C-1), 33.35 (C-7), 29.95 (C-21), 28.39 (C-23), 27.49 (C-15), 25.50 (C-2), 25.20 (C-12), 22.26 (C-24), 20.89 (C-11), 19.41 (C-29), 18.39 (C-6), 18.12 (C-28), 16.08 (C-25), 16.04 (C-26), 14.75 (C-27).

Se ha descrito al lupeol en diversas plantas, algunas fuentes vegetales ricas en este compuesto son las raíces de la zanahoria, la pulpa del mango, las semillas de pepino, soja y melón, las plantas de ursi y Aloe vera, además, se ha encontrado en muestras de propóleo⁷⁵. Por otra parte, en la medicina tradicional plantas que poseen este compuesto activo se han empleado para el tratamiento de tumores, curar trastornos del sistema reproductivo, la inflamación del útero y el ovario, el alivio del dolor de dientes, para la diabetes, la fiebre, entre otras. Adicionalmente, se ha demostrado que

posee diferentes actividades biológicas tales como anticancerígenas, antiprotozoarias y anti-inflamatorias⁷⁶. Por otro lado, también se ha demostrado que este compuesto tiene actividad leishmanicida significativa contra *L. donovani* con valores de CI_{50} de 65 $\mu\text{g/mL}$. y 15 $\mu\text{g/mL}$ contra las formas de promastigote y amastigote, respectivamente⁷⁷.

4.2.4 Mezcla de α -amirina (C4a) y β -amirina (C4a)

La mezcla de compuestos se aisló en forma de un sólido blanco y los espectros de RMN (Espectros 8 y 9, anexos) fueron casi idénticos a los de la mezcla **1a/1b** (3-O-acetil- α/β -amirina). La principal diferencia era la ausencia de las señales correspondientes al grupo acetilo ubicado en C-3. Las señales de dos dobles enlaces permitieron determinar que se trataba de una mezcla de α -amirina (δ_{H} 5.13) y β -amirina (δ_{H} 5.18) en una proporción de α/β (1/0.18) (Figura 10). **α -amirina (C4a)** RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.13 (t, 1H, $J= 3.6$ Hz, 1H, H-12), 3.22 (dd, 1H, $J= 10.8, 5.1$ Hz, 1H, H-3), 1.07 (s, 2H, 3H, H-27), 1.01 (s, 3H, 3H, H-26), 1.00 (s, 3H, H-24), 0.95 (s, 3H, H-25), 0.92 (d, $J= 5.1$ Hz, 3H, H-30), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.79 (s, 4H, H-23), 0.78 (s, 1H, H-29). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 139.71 (C-13), 124.53 (C-12), 79.19 (C-3), 59.17 (C-18), 55.29 (C-5), 47.83 (C-9), 42.19 (C-14), 41.65 (C-22), 40.13 (C-8), 39.78 (C-19), 39.74 (C-20), 38.90 (C-1, C-4), 37.02 (C-10), 33.89 (C-17), 33.05 (C-7), 31.39 (C-21), 28.89 (C-28), 28.26 (C-24), 28.22 (C-16), 27.39 (C-2), 26.74 (C-15), 23.49 (C-11), 23.40 (C-27), 21.56 (C-30), 18.48 (C-6), 17.62 (C-29), 16.99 (C-26), 15.82 (C-25), 15.77 (C-23).

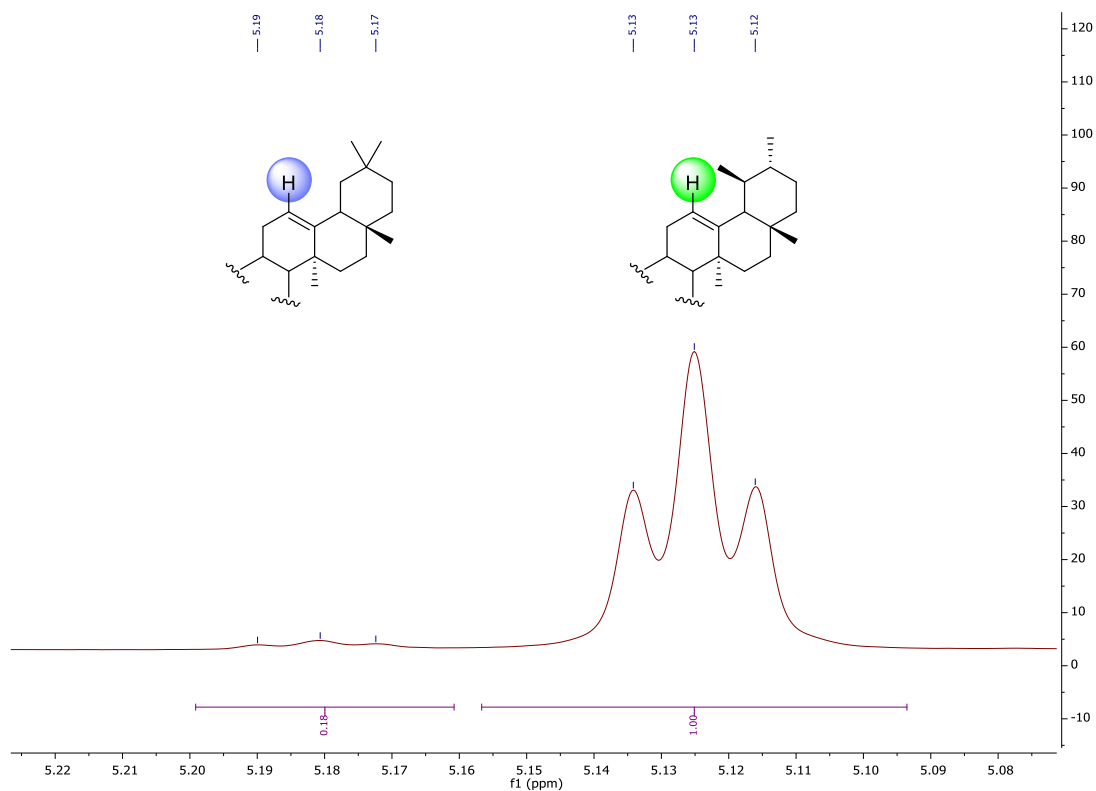


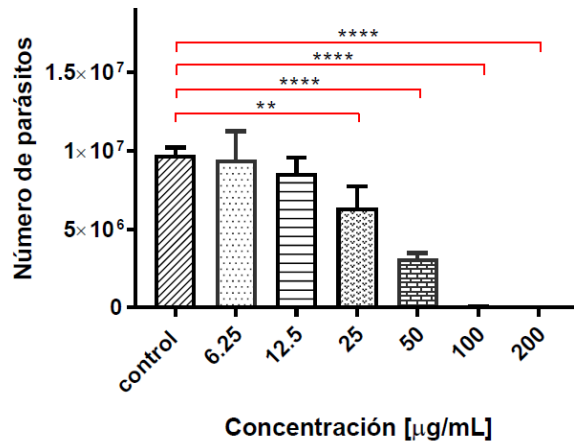
Figura 10. Proporción de isómeros α/β amirina en el espectro de RMN ^1H

Los triterpenos α/β -amirina se encuentran en diversas plantas medicinales y en materiales vegetales como hojas, corteza, resinas, maderas y se han descrito como unos de los principales componentes de muestras de geopropóleos en Brasil, estos compuestos poseen diferentes actividades biológicas tales como acciones analgésicas, antimicrobiana, antifúngico, anti-inflamatorias⁷⁸. Adicionalmente, se ha atribuido que estos compuestos pueden tener un efecto leishmanicida, ya que en un estudio realizado con el extracto hexánico de *Brosimum glaziovii* (Moraceae) que contenía como componentes mayoritarios α/β -amirina y acetato de β -amirina reveló una alta actividad contra promastigotes de *L. amazonensis* con un $\text{CI}_{50} = 4.0 \mu\text{g/mL}$ ⁷⁹. En otro estudio realizado con el compuesto puro de α -amirina también se demostró que tiene una actividad moderada contra amastigotes de *L. donovani* ($\text{CI}_{50} = 7.9 \mu\text{g/mL}$)⁸⁰.

En los estudios realizados de geoprópolis se han identificado diferentes tipos de compuestos dependiendo del tipo de abeja que lo producía y el lugar de origen, esto confirma que la composición química de los geoprópolis es muy variable. Adicionalmente, en la literatura no se encuentra ningún informe sobre la composición química del geoprópolis producido por *Scaptotrigona mexicana*, por esta razón, es importante establecer cuál es su composición química y cuáles son sus propiedades biológicas asociadas. Cabe resaltar, además, que los geoprópolis producidos por abejas sin aguijón presentan una gran variación incluso entre muestras de la misma región, ya que recolectan material de plantas cercanas a sus colmenas, lo que puede explicar las diferencias en su composición química y actividades farmacológicas de dichas muestras.

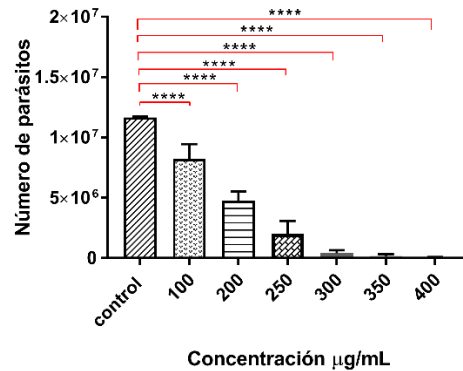
4.3 Actividad biológica contra la Leishmania

Cuando se analizó el efecto que ejerce el extracto etanólico *in vitro* contra la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*, se pudo observar que, al comparar el número de parásitos vivos contra la concentración del extracto, éste tuvo un efecto dosis-dependiente. Adicionalmente, el análisis estadístico reveló que solo hay diferencias significativas a concentraciones mayores de 25 µg/mL con respecto al control ($p < 0.05$), también se puede observar que a esta concentración hay una sobrevida del 65%, mientras que con las concentraciones mayores a 100 µg/mL ya no se observó sobrevida, atribuyéndose un efecto leishmanicida; sin embargo, aunque no se encontró una diferencia significativa con las concentraciones de 12.5 y 6.25 µg/mL, se observó que hay una tendencia hacia la disminución del número de parásitos (Gráfica 4).



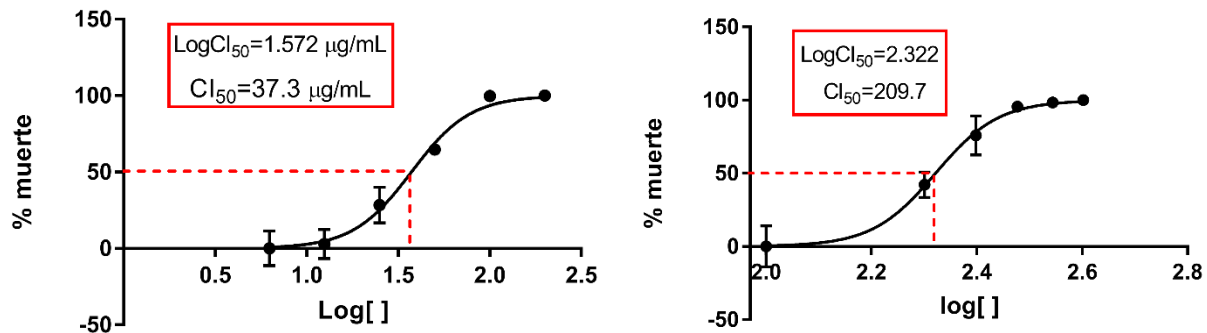
Gráfica 4. Curva dosis-respuesta del efecto *in vitro* del extracto etanólico en promastigotes de *L. mexicana*, a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL. Las barras representan el promedio de parásitos vivos ± DS de cuatro experimentos independientes y los asteriscos (****) la diferencia significativa $p < 0.0001$ con respecto al control; (**) la diferencia significativa $p < 0.01$ con respecto al control.

Con respecto al análisis del efecto que ejerce la fracción de hexano sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*, se pudo observar que también tiene un efecto dosis-dependiente, por otro lado, el análisis estadístico reveló que todas las concentraciones probadas presentan una diferencia significativa con respecto al control ($p > 0.05$), interesantemente se pudo observar que con las concentraciones de 100, 200 y 250 µg/mL la viabilidad de los promastigotes fue de 64 %, 41% y 25% respectivamente, mientras que con las concentraciones mayores a 300 µg/mL se observó un efecto leishmanicida con un porcentaje de muerte mayor al 95% (Gráfica 5).



Gráfica 5. Curva dosis-respuesta del efecto *in vitro* de la fracción de hexano en promastigotes de *L. mexicana*, a concentraciones de 100, 200, 250, 300, 350 y 400 µg/mL. Las barras representan el promedio de parásitos vivos ± DS de cuatro experimentos independientes y los asteriscos (****) la diferencia significativa $p < 0.0001$ con respecto al control.

Para calcular los valores de CI_{50} del extracto etanólico y la fracción de hexano se realizó una regresión no lineal de las curvas dosis respuesta de cada una de las muestras. En el extracto etanólico el CI_{50} calculado fue de 37.3 µg/mL (Gráfica 6a), mientras que la partición de hexano mostró una menor actividad con un CI_{50} de 209.7 µg/mL (Gráfica 6b), esto nos sugiere que el extracto etanólico contiene una mayor concentración de los compuestos activos contra los promastigotes de *L. mexicana*.



Gráfica 6. CI_{50} del extracto etanólico (a) y de la fracción de hexano (b) sobre *L. mexicana* a partir de la curva de porcentaje de muerte de promastigotes contra el logaritmo de la concentración.

Como control positivo se utilizó el fármaco glucantime y el valor de CI_{50} para los promastigotes de *Leishmania mexicana* fue de 4025.78 $\mu\text{g/mL}$. Por otra parte, es importante destacar que el valor de CI_{50} obtenido para el extracto etanólico del geoprópoleo de *Scatotrígona mexicana* es comparable al reportado para el extracto de diclorometano de las partes aéreas de *lantana camara var. aculeata (L.) con un $CI_{50}=42.6^{81}$* contra promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Diferentes autores han demostrado que muestras de propóleo^{12,13,62,15} presentan actividad leishmanicida tanto en promastigotes como amastigotes en diferentes especies de *leishmania* como *L. major*, *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. amazonensis* y *L. chagas*. La actividad de este propóleo se ha podido atribuir a la presencia de diferentes tipos de compuestos como flavonoides, compuestos prenilados, benzofenonas, triterpenoides en los que se destaca la α/β -amirina, pero también se ha asociado a un efecto sinérgico entre los diferentes tipos de compuestos presentes en los extractos.

Como se presentó anteriormente, los componentes mayoritarios aislados en el extracto etanólico fueron α -amirina y lupeol, adicionalmente, en la partición de hexano también se aislaron compuestos de tipo triterpeno como el acetato de α/β -amirina y el cicloart-23-en-3 β ,25-diol. La actividad leishmanicida observada en el extracto etanólico y la partición de hexano se podría asociar a la presencia de estos compuestos, sin embargo, estos no se pudieron evaluar contra promastigotes de *L. mexicana* debido a la poca solubilidad en el medio que presentó la α/β -amirina (C4a, b) y 3-O-acetil- α/β -amirina (C1a, b); por otro lado, el cicloart-23-en-3 β ,25-diol (C2) y lupeol (C3) aislados estaban en bajas cantidades.

En resumen, estos resultados indican que el extracto etanólico y la partición de hexano del geoprópoleo obtenido de *Scaptotrígona mexicana* presentó un efecto sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana* (Gráfica 5 y Gráfica 6), por lo tanto, este extracto puede ser una fuente prometedora de compuestos naturales para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para tratar la leishmaniasis. Además, se deben

seguir realizando otras pruebas biológicas *in vivo* y continuar con el fraccionamiento para identificar los compuestos activos.

5. CONCLUSIONES

- Los componentes mayoritarios aislados a partir del extracto derivado del geopropóleo de *Scaptotrigona mexicana* fueron los triterpenoides cicloart-23-en-3 β ,25-diol, lupeol y las mezclas de α/β - amirina y 3-O-acetil- α/β -amirina.
- El contenido de fenoles y flavonoides en el extracto etanólico del geopropóleo fue de 6.29 mg EAG/g de extracto y 0.72 mg EQ/g de extracto, respectivamente. De acuerdo con los valores establecidos por la Norma Oficial Mexicana de propóleo (NOM-0003-SAG/GAN-2017), que establece los parámetros de calidad de propóleos con valores de 50 mg EAG/g para fenoles y 5 mg EQ/g para flavonoides, este geopropóleo no cumple con los parámetros de calidad establecidos.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de la fracción de hexano fueron mayores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ para las bacterias *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*; del extracto etanólico fueron mayores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ con *S. aureus*, *P. aeruginosa* y 500 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans*. Estos resultados son congruentes con los descritos previamente en la literatura para geopropóleos brasileños^{82,47,83}.
- El extracto etanólico de geopropóleo producido por *Scaptotrigona mexicana* presenta un efecto *leishmanicida contra promastigotes de L. mexicana*, dicha actividad puede estar asociada a la presencia de los compuestos mayoritarios, 3-O-acetil- α/β -amirina, cicloart-23-en-3 β ,25-diol, lupeol y la mezcla de α/β -amirina cuya actividad contra leishmania ha sido reportada en la literatura.

6. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico del extracto etanólico del geopropóleo producido por *S. mexicana* con el fin de obtener los compuestos mayoritarios.
- Evaluar el efecto *in vivo* que ejerce el extracto etanólico del geopropóleo producido por *Scaptotrigona mexicana* sobre la lesión cutánea generada por *L. mexicana*

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Silva, T. M. S.; De Souza, S. A.; Dias, T. L. M. F.; Silva, T. M. G.; Falcão, R. A.; Moreira, M. S. A.; Silva, E. M. S.; Camara, C. A. Chemical Composition, Antinociceptive and Free Radical-Scavenging Activities of Geopropolis from *Melipona subnitida ducke* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology* **2014**, 61 (4), 560–565.
- (2) Santos, H.; Campos, J.; Santos, C.; Balestieri, J.; Silva, D.; Carollo, C.; de Picoli Souza, K.; Estevinho, L.; dos Santos, E. Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18 (5), 953.
- (3) dos Santos, C. M.; Campos, J. F.; dos Santos, H. F.; Balestieri, J. B. P.; Silva, D. B.; de Picoli Souza, K.; Carollo, C. A.; Estevinho, L. M.; dos Santos, E. L. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 2017, 1–13.
- (4) Franchin, M.; Da Cunha, M. G.; Denny, C.; Napimoga, M. H.; Cunha, T. M.; Koo, H.; De Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases the Mechanical Inflammatory Hypernociception by Inhibiting the Production of IL-1 β and TNF- α . *J. Ethnopharmacol.* **2012**, 143 (2), 709–715.
- (5) Maria, J.; Ferreira, S.; Paredes-gamero, E. J. Antimicrobial , Antioxidant and Cytotoxic Activities of Propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera , Apidae). **2014**, 65 (August 2015), 374–380.
- (6) Dutra, R. P.; Abreu, B. V. de B.; Cunha, M. S.; Batista, M. C. A.; Torres, L. M. B.; Nascimento, F. R. F.; Ribeiro, M. N. S.; Guerra, R. N. M. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata smith*. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (12), 2549–2557.
- (7) Velikova, M.; Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Chemical Composition and Biological Activity of Propolis from Brazilian Meliponinae. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **2000**, 55 (9–10), 785–789.
- (8) 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.* **2016**, 47 (4), 863–869.
- (9) Borges, K. S.; Brassesco, M. S.; Scrideli, C. A.; Soares, A. E. E.; Tone, L. G. Antiproliferative Effects of Tubi-Bee Propolis in Glioblastoma Cell Lines. *Genet. Mol. Biol.* **2011**, 34 (2), 310–314.
- (10) Raujo, M.; Bufalo, M.; Conti, B.; Fernandez, A.; Trusheva, B.; Bankova, V.; Sforcin, J. The Chemical Composition and Pharmacological Activities of Geopropolis Produced by *Melipona fasciculata smith* in Northeast Brazil. *J. Mol. Pathophysiol.* **2015**, 4 (1), 12.
- (11) Bartolomeu, A. R.; Frión-Herrera, Y.; Da Silva, L. M.; Romagnoli, G. G.; De Oliveira, D. E.; Sforcin, J. M. Combinatorial Effects of Geopropolis Produced by *Melipona fasciculata smith* with Anticancer Drugs against Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, 81, 48–55.
- (12) Ayres, D. C.; Marcucci, M. C.; Giorgio, S. Effects of Brazilian Propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memrias do Inst. Oswaldo Cruzias do Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, 102 (2), 215–220.
- (13) Machado, G. M. D. C.; Leon, L. L.; Castro, S. L. de. Activity of Brazilian and Bulgarian Propolis against Different Species of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, 102 (1), 73–77.
- (14) Pontin, K.; Da Silva Filho, A. A.; Santos, F. F.; Silva, M. L. A. E.; Cunha, W. R.; Nanayakkara, N. P. D.; Bastos, J. K.; De Albuquerque, S. *In vitro* and *in vivo* Antileishmanial Activities of a Brazilian Green Propolis Extract. *Parasitol. Res.* **2008**, 103 (3), 487–492.
- (15) Duran, G.; Duran, N.; Culha, G.; Ozcan, B.; Oztas, H.; Ozer, B. *In vitro* Antileishmanial Activity of Adana Propolis Samples on *Leishmania tropica*: A Preliminary Study. *Parasitol. Res.* **2008**, 102 (6), 1217–1225.
- (16) Michener, C. D. The Bees of the World. In *The bees of the world*; Johns Hopkins University Press, Ed.; Baltimore, 2007; pp 66–75.
- (17) Ayala Barajas, R. Revision de Las Abejas Sin Aguijon de Mexico (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mex.* **1999**, 123 (106), 1–123.
- (18) Arnold, N.; Zepeda, R.; Vásquez, D.; Aldasoro, M. *Las Abejas Sin Aguijón y Su*

- Cultivo En Oaxaca , México Con Catálogo de Especies Las Abejas Sin Aguijón y Su Cultivo En Oaxaca , México Con Catálogo de Especies*, Primera ed.; Sur, C. E. de E. C. de la F., Ed.; El Colegio de la Frontera Sur: México, 2018.
- (19) Forestal, C. N. Por la supervivencia <https://www.gob.mx/conafor/articulos/por-la-supervivencia> (accessed Nov 14, 2018).
- (20) Ayala, R.; Gonzalez, V. H.; Engel, M. S. Mexican Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, Distribution, and Indigenous Knowledge. In *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees*; Vit, P., Pedro, S. R. M., Roubik, D., Eds.; Springer New York: New York, NY, 1986; Vol. 231, pp 135–152.
- (21) González-Acereto, J. A. La Importancia de La Meliponicultura En México, Con Énfasis En La Península de Yucatán. *Bioagrociencias* **2012**, *5* (1), 34–41.
- (22) Quezada-Euán, J. J. G.; de Jesús May-Itzá, W.; González-Acereto, J. A. Meliponiculture in Mexico: Problems and Perspective for Development. *Bee World* **2001**, *82* (4), 160–167.
- (23) Araujo, M.; Bufalo, M.; Conti, B.; Fernandez, A.; Trusheva, B.; Bankova, V.; Sforcin, J. The Chemical Composition and Pharmacological Activities of Geopropolis Produced by *Melipona fasciculata smith* in Northeast Brazil. *J. Mol. Pathophysiol.* **2015**, *4* (1), 12.
- (24) Wagh, V. D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2013**, *2013*, 1–11.
- (25) Kuropatnicki, A. K.; Szliszka, E.; Krol, W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 1–11.
- (26) Liberio, S. A.; Pereira, A. L. A.; Dutra, R. P.; Reis, A. S.; Araújo, M. J. A. M.; Mattar, N. S.; Silva, L. A.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R. F.; Guerra, R. N. M.; 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.* **2011**, *11* (1), 108.
- (27) da Cunha, M.; Rosalen, P.; Franchin, M.; de Alencar, S.; Ikegaki, M.; Ransom, T.; Beutler, J. Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med.* **2015**, *82* (03), 190–194.
- (28) Bankova, V.; Christov, R.; Marcucci, C.; Popov, S. Constituents of Brazilian

- Geopropolis. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **1998**, 53 (5–6), 402–406.
- (29) Bonamigo, T.; Campos, J. F.; Alfredo, T. M.; Balestieri, J. B. P.; Cardoso, C. A. L.; Paredes-Gamero, E. J.; de Picoli Souza, K.; dos Santos, E. L. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 2017, 1–12.
- (30) da Cunha, M. G.; Franchin, M.; Galvão, L.; de Ruiz, A.; de Carvalho, J. E.; Ikegaki, M.; de Alencar, S. M.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Stingless Bee *Melipona scutellaris* Geopropolis. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, 13 (1), 23.
- (31) de Castro Ishida, V. F.; Negri, G.; Salatino, A.; Bandeira, M. F. C. L. A New Type of Brazilian Propolis: Prenylated Benzophenones in Propolis from Amazon and Effects against Cariogenic Bacteria. *Food Chem.* **2011**, 125 (3), 966–972.
- (32) 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, 1–5.
- (33) Batista, M. C. A.; Abreu, B. V. de B.; Dutra, R. P.; Cunha, M. S.; Amaral, F. M. M. do; Torres, L. M. B.; Ribeiro, M. N. de S. 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.* **2016**, 46 (3), 315–322.
- (34) Dutra, R. P.; Abreu, B. V. de B.; Cunha, M. S.; Batista, M. C. A.; Torres, L. M. B.; Nascimento, F. R. F.; Ribeiro, M. N. S.; Guerra, R. N. M. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata smith*. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (12), 2549–2557.
- (35) Coelho, G. R.; Mendonça, R. Z.; Vilar, K. de S.; Figueiredo, C. A.; Badari, J. C.; Taniwaki, N.; Namiyama, G.; Oliveira, M. I. de; Curti, S. P.; Evelyn Silva, P.; 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**, 2015, 1–10.
- (36) Costa da Silva, E. C.; Muniz, M. P.; Nunomura, R. de C. S.; Nunomura, S. M.; Carvalho Zilse, G. A. Constituintes Fenólicos e Atividade Antioxidante Da Geopropolis de Duas Espécies de Abelhas Sem Ferrão Amazônicas. *Quim. Nova* **2013**, 36 (5), 628–633.
- (37) Tomás Barberan, F.; García Viguera, C.; Vit Olivier, P.; Ferreres, F.; Tomás Lorente, F. Phytochemical Evidence for the Botanical Tropical Propolis From Venezuela Origin Of. *Phytochemistry* **1993**, 34 (1), 191–196.
- (38) Pino, J. A.; Marbot, R.; Delgado, A.; Zumárraga, C.; Sauri, E. Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, 18 (1), 53–56.
- (39) Torres-González, A.; López-Rivera, P.; Duarte-Lisci, G.; López-Ramírez, Á.; Correa-Benítez, A.; Rivero-Cruz, J. F. Analysis of Volatile Components from *Melipona beecheii* Geopropolis from Southeast Mexico by Headspace Solid-Phase Microextraction. *Nat. Prod. Res.* **2016**, 30 (2), 237–240.
- (40) Silva, T. M. S.; De Souza, S. A.; Dias, T. L. M. F.; Silva, T. M. G.; Falcão, R. A.; Moreira, M. S. A.; Silva, E. M. S.; Camara, C. A. Chemical Composition, Antinociceptive and Free Radical-Scavenging Activities of Geopropolis from *Melipona subnitida ducke* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology* **2014**, 61 (4), 560–565.
- (41) Velikova, M.; Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Chemical Composition and Biological Activity of Propolis from Brazilian Meliponinae. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **2000**, 55 (9–10), 785–789.
- (42) Ribeiro-Junior, J. A.; Franchin, M.; Cavallini, M. E.; Denny, C.; Alencar, S. M. De; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, 2015.
- (43) Duailibe, S. A. de C.; Gonçalves, A. G.; Ahid, F. J. M. Effect of a Propolis Extract on *Streptococcus mutans* Counts *in vivo*. *J. Appl. Oral Sci.* **2007**, 15 (5), 420–423.
- (44) Araujo, M.; Bufalo, M.; Conti, B.; Fernandez, A.; Trusheva, B.; Bankova, V.;

- Sforcin, J. The Chemical Composition and Pharmacological Activities of Geopropolis Produced by *Melipona fasciculata smith* in Northeast Brazil. *J. Mol. Pathophysiol.* **2015**, 4 (1), 12.
- (45) dos Santos, T. L. A.; Queiroz, R. F.; Sawaya, A. C. H. F.; Lopez, B. G. C.; Soares, M. B. P.; Bezerra, D. P.; Rodrigues, A. C. B. C.; de Paula, V. F.; Waldschmidt, A. M. *Melipona mondury* Produces a Geopropolis with Antioxidant, Antibacterial and Antiproliferative Activities. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, 89 (3 suppl), 2247–2259.
- (46) Araújo, M. J. A. M.; Dutra, R. P.; Costa, G. C.; Reis, A. S.; Anne, K. M.; Libério, S. A.; Maciel, M. C. G.; Silva, L. A.; Guerra, R. N. M.; Ribeiro, M. N. S.; et al. Efeito Do Tratamento Com Própolis de *Scaptotrigona Aff postica* Sobre o Desenvolvimento Do Tumor de Ehrlich Em Camundongos. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, 20 (4), 580–587.
- (47) Campos, J. F.; dos Santos, U. P.; Macorini, L. F. B.; de Melo, A. M. M. F.; Balestieri, J. B. P.; Paredes-Gamero, E. J.; Cardoso, C. A. L.; de Picoli Souza, K.; Dos Santos, E. L. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Propolis from *Melipona orbigny* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.* **2014**, 65, 374–380.
- (48) Steverding, D. The History of Leishmaniasis. *Parasit. Vectors* **2017**, 10 (1), 82.
- (49) Pigott, D. M.; Bhatt, S.; Golding, N.; Duda, K. A.; Battle, K. E.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Balard, Y.; Bastien, P.; Pratlong, F.; et al. Global Distribution Maps of the Leishmaniasis. *Elife* **2014**, 2014 (3), 1–21.
- (50) Vargas Martínez, F.; Torres Guerrero, E.; Arenas, R.; Quintanilla Cedillo, M. R. Leishmaniasis En México. *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana*. 2011, pp 163–183.
- (51) Sosa Ávila, E. J.; Caro Lozano, J.; Zúñiga Carrasco, I. R. Perfil Epidemiológico de La Leishmaniasis: Una Enfermedad Olvidada En México. *Enfermedades Infecc. y Microbiol.* **2014**, 34 (1), 31–36.
- (52) Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M. R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. Leishmaniasis: A Review. *F1000Research* **2017**, 6 (May), 1–15.
- (53) Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Boer, M. den. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.

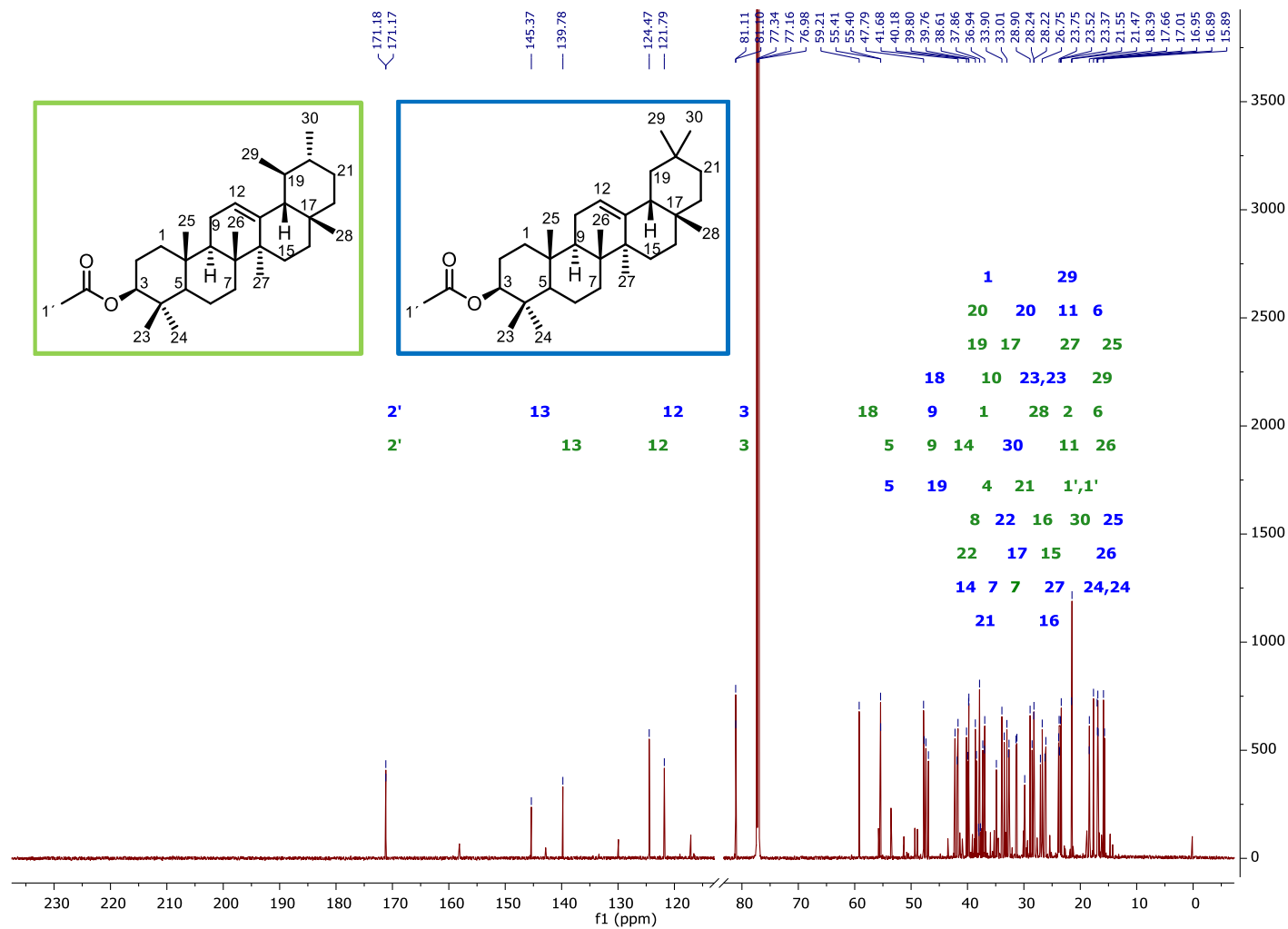
- PLoS One* **2012**, 7 (5), 1–12.
- (54) Subsecretaria de prevención y promoción de la salud. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ManualLeishmaniasis2015.pdf> (accessed Nov 20, 2018).
- (55) Pan American Health Organization. Leishmaniasis. Informe Epidemiológico de las Américas, febrero 2018 <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34111> (accessed Dec 11, 2018).
- (56) Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: Complexity at the Host–pathogen Interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 9 (8), 604–615.
- (57) da Silva, A. J. Leishmaniasis <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=3400> (accessed Nov 14, 2018).
- (58) Alamilla-Fonseca, L. N.; Delgado-Domínguez, J.; Zamora-Chimal, J.; Cervantes-Sarabia, R. B.; Jiménez-Arellanes, A.; Rivero-Cruz, J. F.; Becker, I. Leishmania Mexicana Cell Death Achieved by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis: Learning from Maya Healers. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, 211 (October 2018), 180–187.
- (59) Luisa Vázquez, M.; Kroege\$, A.; Lipowskyl, R.; Alzate, A. C. Conceptos Populares Sobre La Leishmaniasis Cutánea En Colombia Y Su Aplicabilidad En Programas De Control. *Bol Sanit Panam* **1991**, 110 (5).
- (60) Pineda Reyes, R.; Llanos Cuentas, A.; Dancuart, M. Tratamientos Tradicionales Utilizados En Un Área Endémica de Leishmaniasis Cutánea En El Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* **2015**, 32 (4), 761–765.
- (61) Singh, N.; Mishra, B. B.; Bajpai, S.; Singh, R. K.; Tiwari, V. K. Natural Product Based Leads to Fight against Leishmaniasis. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (1), 18–45.
- (62) Pontin, K.; Da Silva Filho, A. A.; Santos, F. F.; Silva, M. L. A. E.; Cunha, W. R.; Nanayakkara, N. P. D.; Bastos, J. K.; de Albuquerque, S. *In vitro* and *in vivo* Antileishmanial Activities of a Brazilian Green Propolis Extract. *Parasitol. Res.* **2008**, 103 (3), 487–492.
- (63) Ainsworth, E. A.; Gillespie, K. M. Estimation of Total Phenolic Content and Other Oxidation Substrates in Plant Tissues Using Folin–Ciocalteu Reagent. *Nat.*

- Protoc.* **2007**, 2 (4), 875–877.
- (64) Pękal, A.; Pyrzyńska, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* **2014**, 7 (9), 1776–1782.
- (65) Kedare, S. B.; Singh, R. P. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, 48 (4), 412–422.
- (66) Bankova, V.; Castro, S. De; Marcucci, M. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin Review. *Apidologie* **2000**, 31 (1), 3–15.
- (67) Maurício, J.; Bankova, V. Propolis: Is There a Potential for the Development of New Drugs? *J. Ethnopharmacol. J.* **2011**, 133, 253–260.
- (68) da Cunha, M. G.; Franchin, M.; Galvão, L. C. C.; de Ruiz, A. L. T. G.; de Carvalho, J. E.; Ikegaki, M.; de Alencar, S. M.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Stingless Bee *Melipona scutellaris* Geopropolis. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, 13.
- (69) Sforcin, J. .; Fernandes, A.; Lopes, C. A. .; Bankova, V.; Funari, S. R. . Seasonal Effect on Brazilian Propolis Antibacterial Activity. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, 73 (1–2), 243–249.
- (70) Cunha, M. G. Da; Franchin, M.; Galvão, L. C. D. C.; Bueno-Silva, B.; Ikegaki, M.; De Alencar, S. M.; Rosalen, P. L. Apolar Bioactive Fraction of *Melipona Scutellaris* Geopropolis on *Streptococcus mutans* Biofilm. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, 2013.
- (71) Okoye, N. N.; Ajaghaku, D. L.; Okeke, H. N.; Ilodigwe, E. E.; Nworu, C. S.; Okoye, F. B. C. Beta-Amyrin and Alpha-Amyrin Acetate Isolated from the Stem Bark of *Alstonia boonei* Display Profound Anti-Inflammatory Activity. *Pharm. Biol.* **2014**, 52 (11), 1478–1486.
- (72) Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Costa, S. M. O.; Santos, H. S. dos. Obtention of Derivatives from the Alpha- and Beta-Amyrin Triterpenoid Mixture: ¹³C NMR Data. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, 17 (2), 204–208.
- (73) Shamsabadipour, S.; Ghanadian, M.; Saeedi, H.; Reza Rahimnejad, M.; Mohammadi-Kamalabadi, M.; Ayatollahi, S. M.; Salimzadeh, L. Triterpenes and Steroids from *Euphorbia denticulata lam.* with Anti-Herpes Simplex Virus Activity. *Iran. J. Pharm. Res.* **2013**, 12 (4), 759–767.

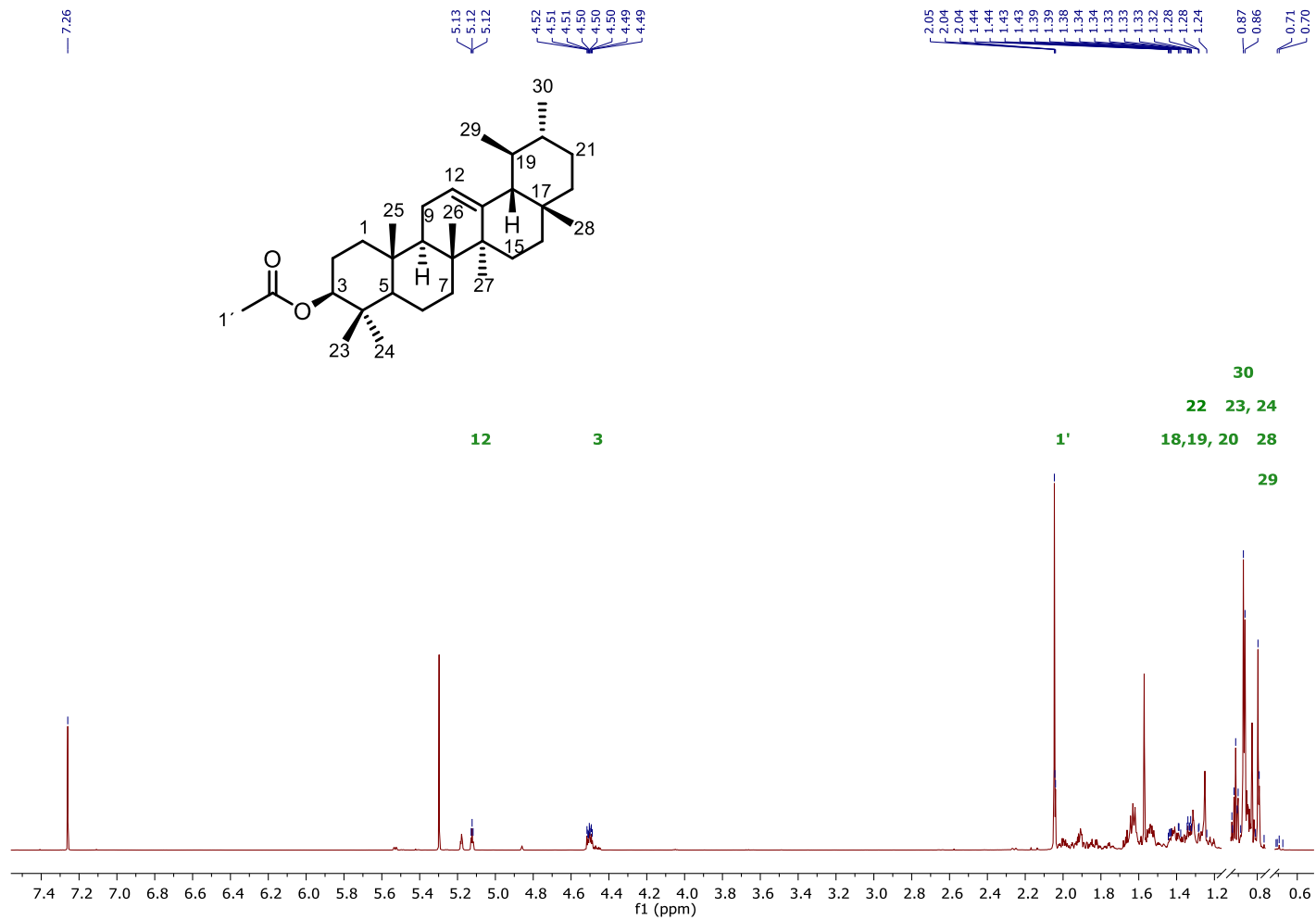
- (74) Eldeen, I. M. S.; Van Heerden, F. R.; Van Staden, J. Biological Activities of Cycloart-23-Ene-3,25-Diol Isolated from the Leaves of *Trichilia dregeana*. *South African J. Bot.* **2007**, *73* (3), 366–371.
- (75) Huang, S.; Zhang, C. P.; Wang, K.; Li, G. Q.; Hu, F. L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* **2014**, *19* (12), 19610–19632.
- (76) Wal, A.; Rai, A.; Wal, P.; Sharma, G. Biological Activities of Lupeol. *Syst. Rev. Pharm.* **2011**, *2* (2), 96.
- (77) Das, A.; Jawed, J. J.; Das, M. C.; Sandhu, P.; De, U. C.; Dinda, B.; Akhter, Y.; Bhattacharjee, S. Antileishmanial and Immunomodulatory Activities of Lupeol, a Triterpene Compound Isolated from *Sterculia villosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50* (4), 512–522.
- (78) Vázquez, L. H.; Palazon, J.; Navarro-ocaña, A. The Pentacyclic Triterpenes α,β -Amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. **2014**, No. May.
- (79) Coqueiro, A.; Regasini, L. O.; Leme, G. M.; Polese, L.; Nogueira, C. T.; Cistia, M. L. Del; Graminha, M. A. S. Leishmanicidal Activity of *Brosimum glaziovii* (*Moraceae*) and Chemical Composition of the Bioactive Fractions by Using High-Resolution Gas Chromatography and GC-MS. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (10), 1839–1847.
- (80) Mwangi, E. S. K.; Keriko, J. M.; Machocho, A. K.; Wanyonyi, A. W.; Malebo, H. M.; Chhabra, S. C.; Tarus, P. K. Antiprotozoal Activity and Cytotoxicity of Metabolites from Leaves of *Teclea trichocarpa*. *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4* (9), 726–731.
- (81) Delgado-Altamirano, R.; López-Palma, R. I.; Monzote, L.; Delgado-Domínguez, J.; Becker, I.; Rivero-Cruz, J. F.; Esturau Escofet, N.; Vázquez-Landaverde, P. A.; Rojas-Molina, A. Chemical Constituents with Leishmanicidal Activity from a Pink-Yellow Cultivar of *Lantana camara* var. *aculeata* (L.) Collected in Central Mexico. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (En prensa).
- (82) dos Santos, T. L. A.; Queiroz, R. F.; Sawaya, A. C. H. F.; Lopez, B. G. C.; Soares, M. B. P.; Bezerra, D. P.; Rodrigues, A. C. B. C.; de Paula, V. F.; Waldschmidt, A. M. *Melipona mondury* Produces a Geopropolis with Antioxidant, Antibacterial and Antiproliferative Activities. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, *89* (3 suppl), 2247–2259.

- (83) Campos, J. F.; Santos, U. P. dos; Rocha, P. dos S. da; Damião, M. J.; Balestieri, J. B. P.; Cardoso, C. A. L.; Paredes-Gamero, E. J.; Estevinho, L. M.; de Picoli Souza, K.; Santos, E. L. dos. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 2015, 1–11.

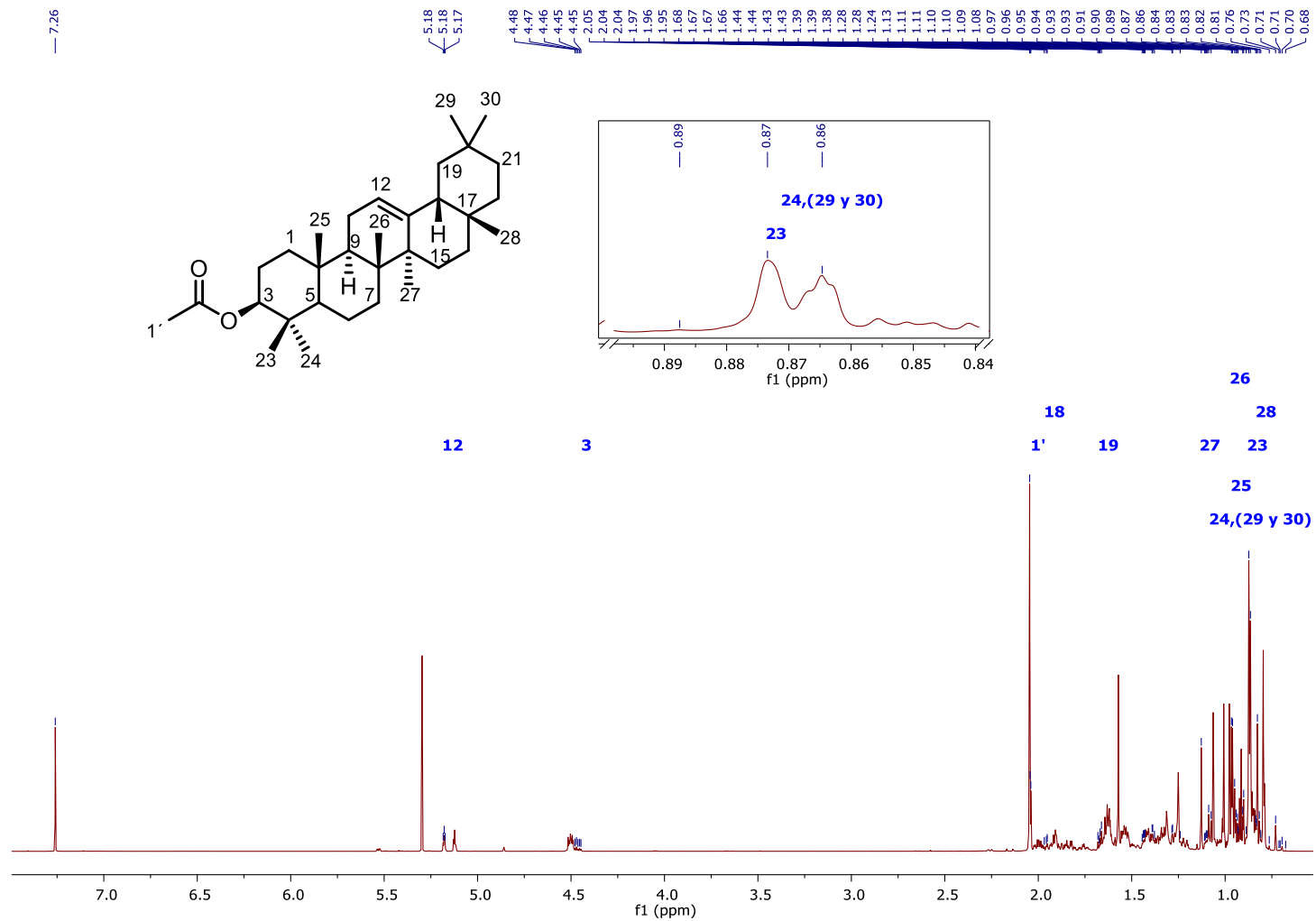
8. ANEXOS



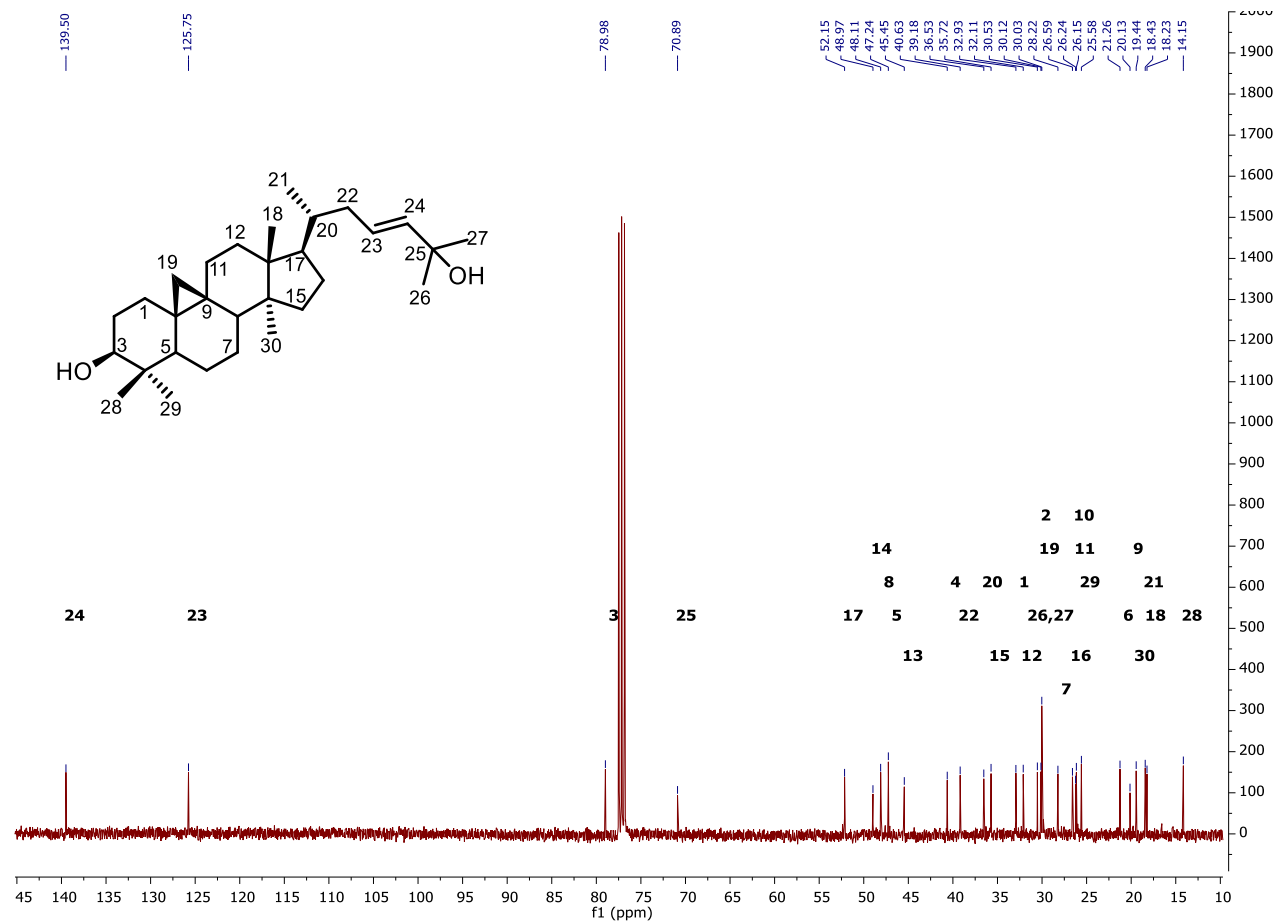
Espectro 1. RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3) del acetato de α -amirina (C1a) en verde y acetato de β -amirina (C1b) azul.



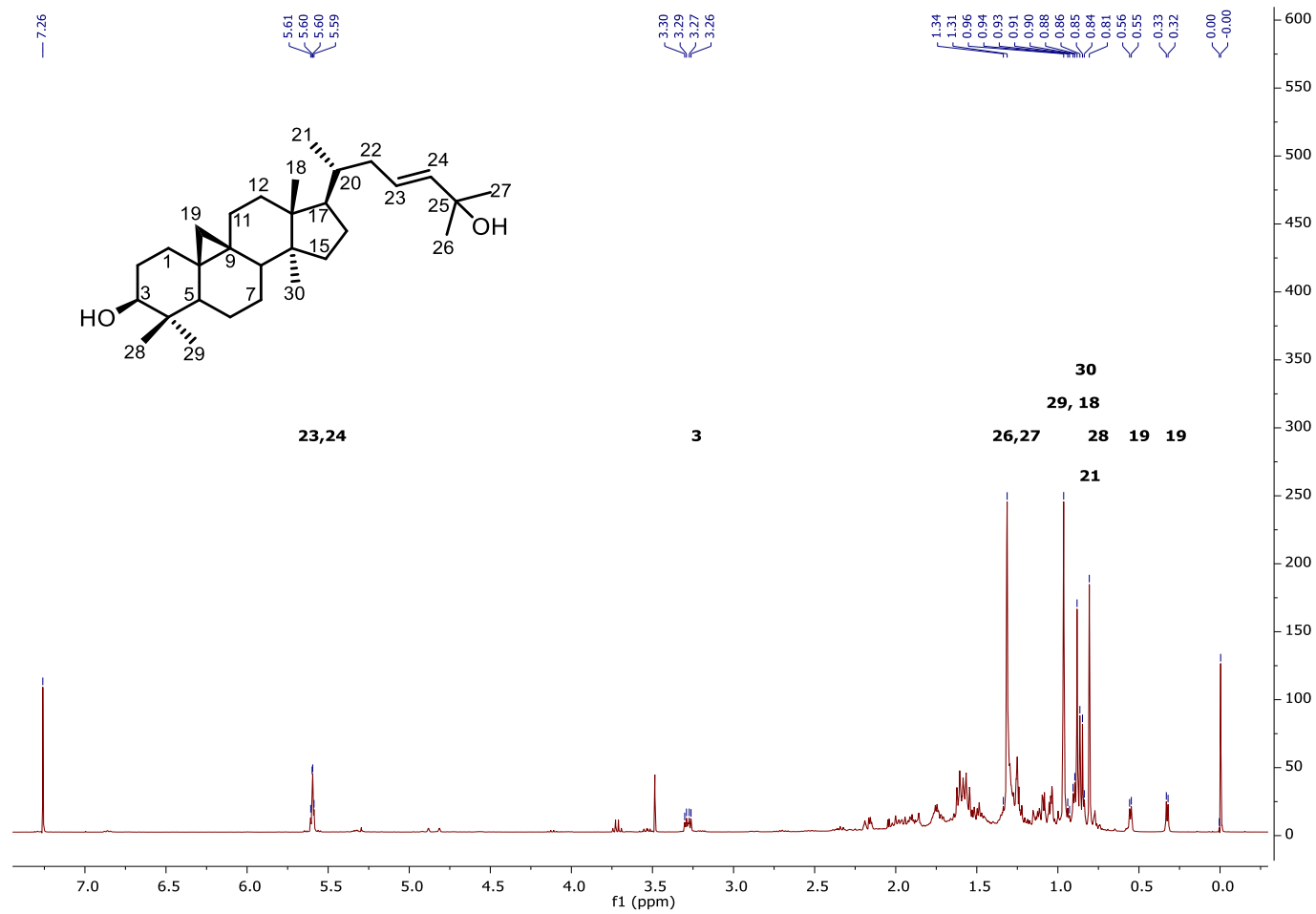
Espectro 2. RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) del acetato de α/β -amirina (C1a, b), en verde se observan las señales correspondientes acetato de α -amirina (C1a)



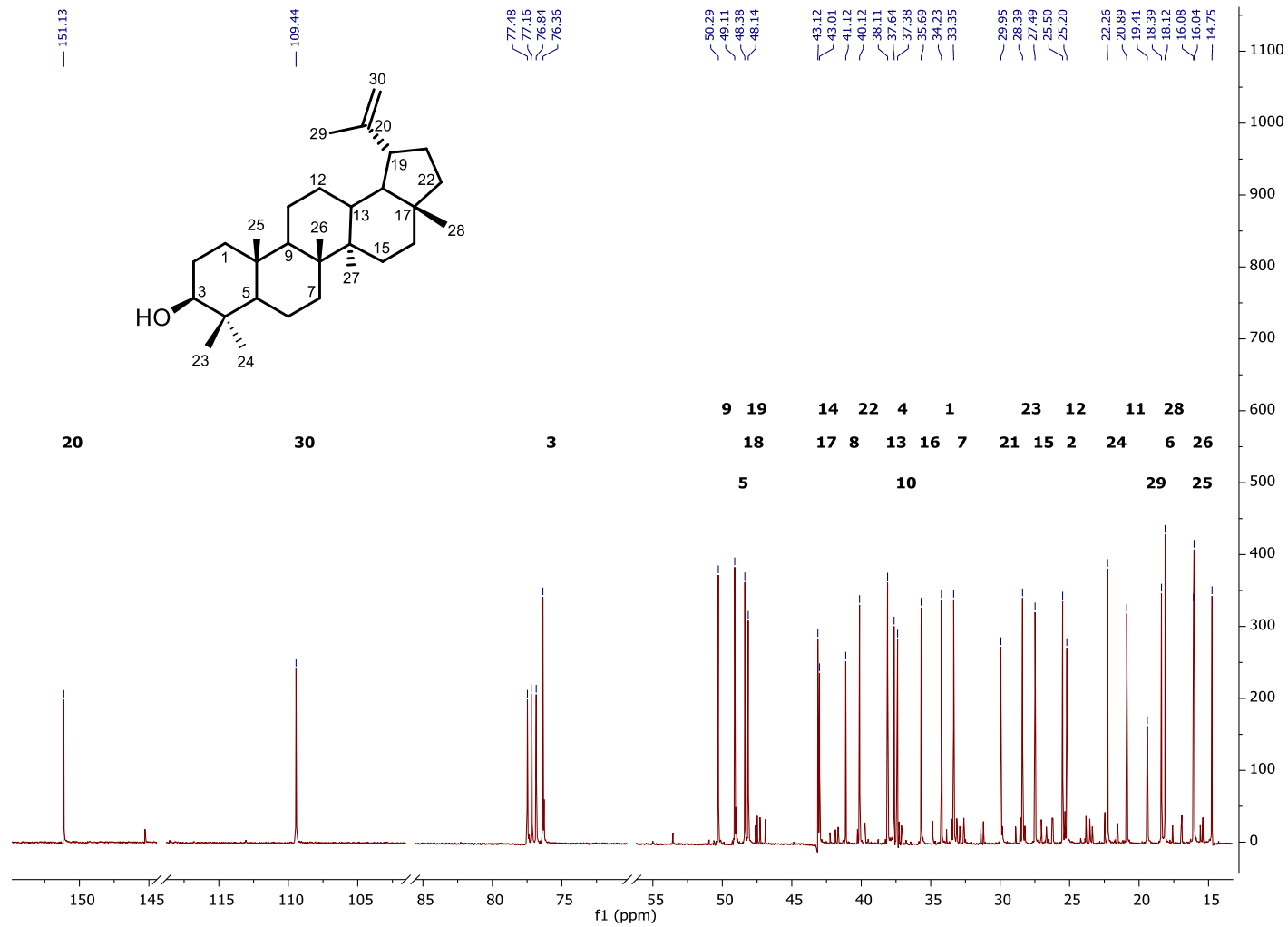
Espectro 3. RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) del acetato de α/β-amirina (**C1a, b**), en azul se observan las señales correspondientes acetato de β-amirina (**C1b**)



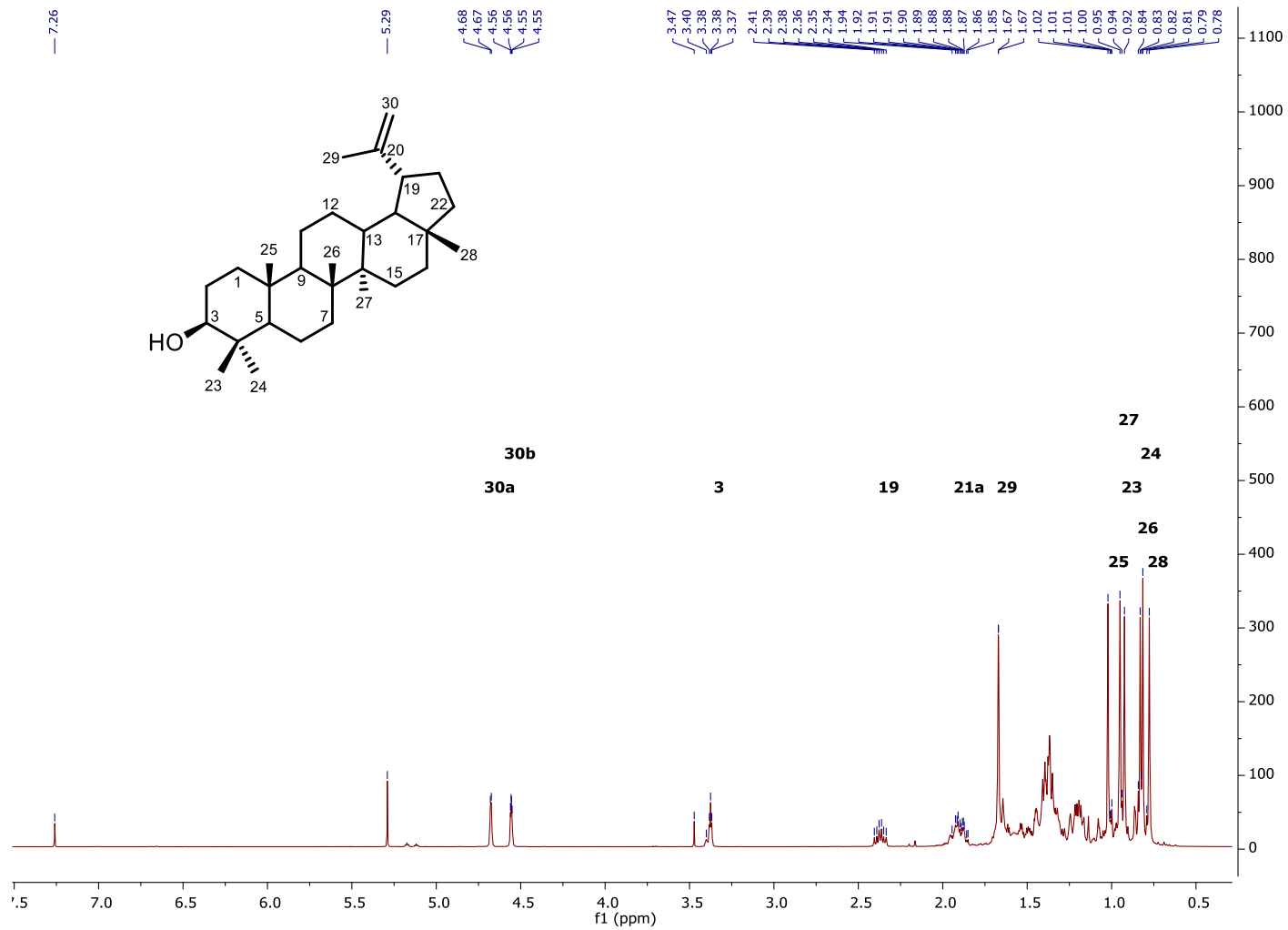
Espectro 4.RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del cicloart-23-en-3 β ,25-diol (C2)



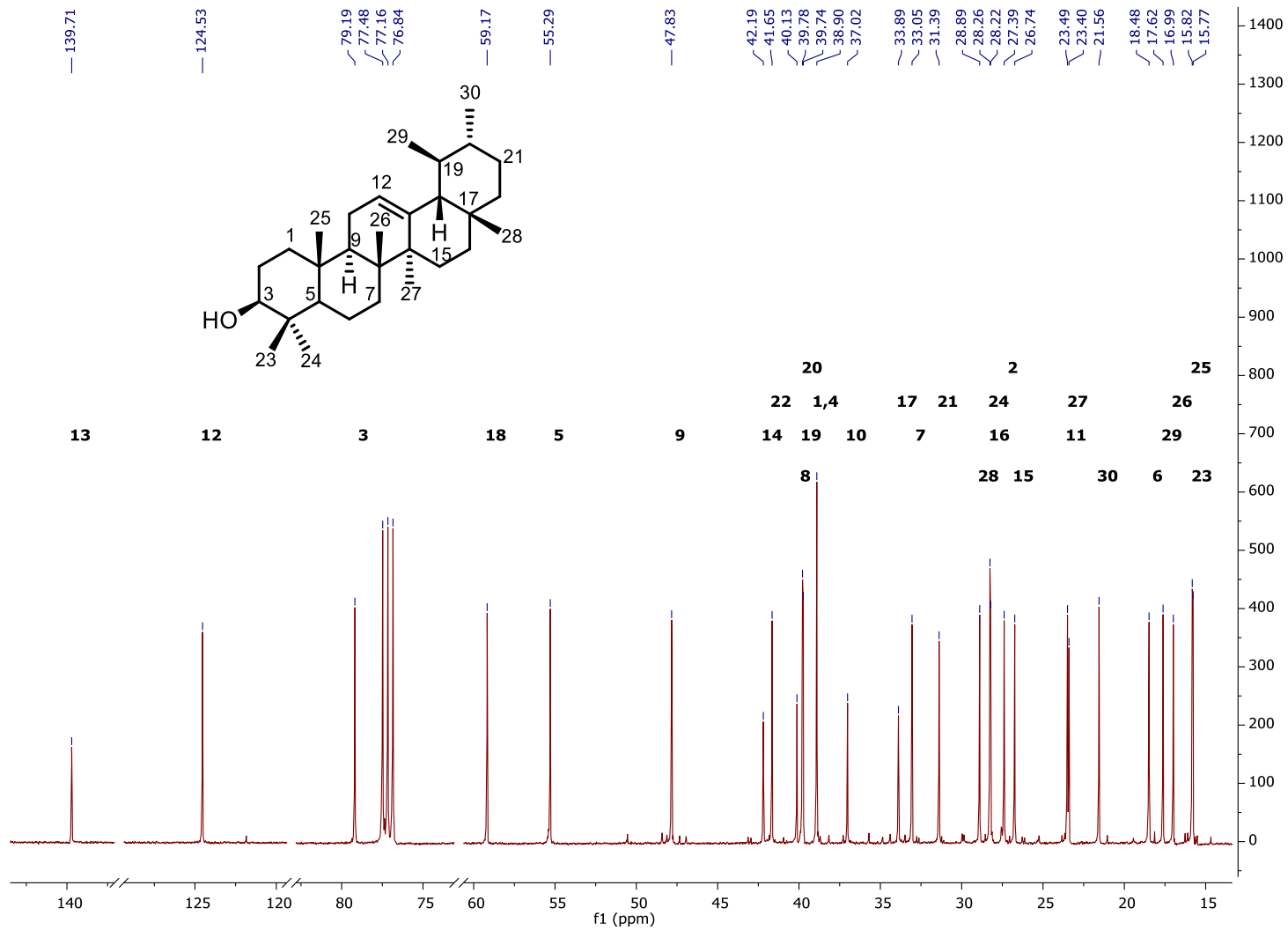
Espectro 5. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del cicloart-23-en-3 β ,25-diol (C2)



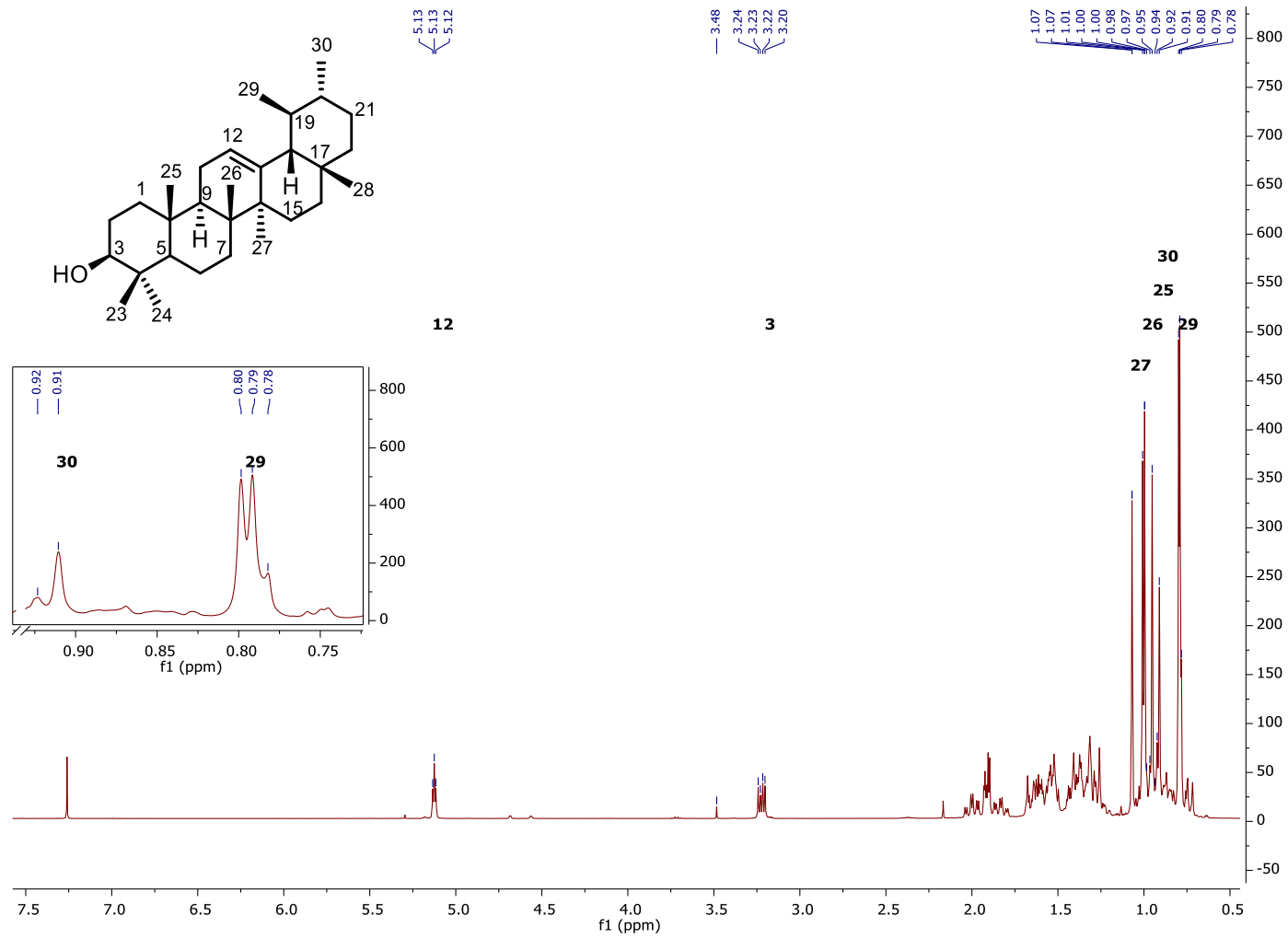
Espectro 6. RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) del lupeol (C3)



Espectro 7. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del lupeol (C3)



Espectro 8. RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de α/β-amirina (C4a,b)



Espectro 9. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de α/β -amirina (C4a,b)

