



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Determinación de los compuestos volátiles del
geopropóleo producido por abejas *Meliponas* en
el Estado de Veracruz**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

PAULINA ITZEL LÓPEZ RIVERA



México D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dr. Arturo Navarro Ocaña
2do. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Supervisor Técnico

Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci

Sustentante

Paulina Itzel López Rivera



Contenido

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Tablas.....	ii
Lista de Figuras	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Abejas sin aguijón	3
2.1.1 Generalidades.....	3
2.1.2 Taxonomía.....	4
2.1.3 Características	5
2.1.4 Distribución.....	7
2.2 Geopropóleo.....	9
2.2.1 Definición	9
2.2.2 Usos y propiedades medicinales	10
2.2.3 Composición química.....	12
2.3 Microextracción en fase sólida (SPME)	16
2.3.1 Generalidades.....	16
2.3.2 Fundamentos	17
2.3.3 Procedimiento de la microextracción en fase sólida.....	18
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	24
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
4.1 Procedimientos generales.....	26
4.1.1 Material vegetal y procedimiento de extracción.....	26
4.1.2 Microextracción en fase sólida	27
4.1.3 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas	27
4.1.4 Identificación de los compuestos volátiles.....	29





4.2	Ensayo biológico.....	30
4.2.1.	Microorganismo de prueba	30
4.2.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	30
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	46
7.	PERSPECTIVAS	47
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48



Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grado centígrado
BHI	Infusión cerebro corazón
CAPE	Fenetil éster del ácido cafeico
CAR	Carboxen
CG	Cromatografía de gases
CHX	Gluconato de clorhexidina
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DB-5	5%-fenil-polimetilsiloxano
DVB	Divinilbenceno
EM	Espectrometría de masas
g	Gramo
h	Hora
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HS	Head Space (Espacio de cabeza)
IR	Índice de retención
km	Kilómetro
m	Metro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de Sodio
NIST	National Institute of Standards Technology
nm	Nanómetro
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTFE	politetrafluoroetileno
SPME	Microextracción en fase sólida
TOF	Tiempo de Vuelo
u	Unidad de masa atómica
UFC	Unidades formadoras de colonias
µg	Microgramo
µm	Micrómetro



Lista de Tablas

Tabla 1. Principales compuestos volátiles identificados en muestras de geopropóleo por otros grupos de trabajo

Tabla 2. Condiciones de análisis optimizadas

Tabla 3. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras

Tabla 4. Controles para el ensayo biológico.

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Melipona* mediante la metodología de Kovats



Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación simplificada de las abejas sin aguijón (*Meliponini*) de acuerdo con Michener

Figura 2. *Melipona beecheii*

Figura 3. A) Alas anteriores, donde se observa la reducción de las venas. Pt= ptesostigma; B) Pata posterior donde se muestran las siguientes estructuras: F=fémur, T=tibia, C=corbícula, P=penicillium, B=basitario y U=uñas simples.

Figura 4. Distribución de meliponinos en América Latina.

Figura 5. Esquema del dispositivo comercial de SPME (Martí et al., 2003).

Figura 6. Etapa de desorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.

Figura 7. Microextracción en fase sólida por el método de espacio de cabeza

Figura 8. Comparación del cromatograma de los estándares empleados (color rojo) con el obtenido para el geopropóleo del Estado de Veracruz (azul).

Figura 9. Comparación del espectro de masas obtenido para el benzaldehído con el de la biblioteca del equipo utilizado.

Figura 10. Comparación del espectro de masas obtenido para el canfeno con el de la biblioteca del equipo utilizado.

Figura 11. Cromatograma del geopropóleo producido por las abejas *Meliponas*

1. INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, la humanidad ha buscado en las plantas una alternativa para tratar los padecimientos que la aquejan, plantas cuyas propiedades terapéuticas han sentado las bases de la medicina empírica, la que se ha mantenido durante siglos sin que los conocimientos científicos modernos hayan podido prescindir de ellas [1].

El conocimiento de recursos naturales con fines medicinales, adquirido empíricamente por el ser humano a lo largo de miles de años, ha favorecido el desarrollo de diversas áreas como la terapéutica, la farmacéutica, la farmacología y la medicina, así como de la industria cosmética y de los alimentos. Aunque, sin duda, su mayor impacto lo ha tenido en el campo de las ciencias médicas y farmacéutica al identificar y desarrollar nuevos y potentes agentes medicinales [2].

En este contexto, es importante mencionar que el propóleo es uno de los remedios comúnmente utilizados en diferentes países, siendo aplicado para el tratamiento de heridas y quemaduras, para el dolor de garganta, úlceras estomacales, etc. Debido a su popularidad en la medicina tradicional, se ha convertido en el tema de intensos estudios farmacológicos y químicos de los últimos 30 años [3].

Estudios previos han probado que el geopropóleo presenta abundantes propiedades biológicas y farmacológicas tales como actividad inmunomoduladora, antiséptica, antineoplásica, antiinflamatoria, antioxidante, antibacterial, antiviral, antifúngica, entre otras [3, 4].

Sin embargo, en ausencia de estudios científicos sobre la composición química y/o actividad biológica, el uso popular de los propóleos de abejas sin aguijón en la medicina popular sigue estando basado en el conocimiento empírico [5].

En este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que consiste en la identificación de los compuestos volátiles presentes en una muestra de geopropóleo recolectada en el Estado de Veracruz, México.

2. ANTECEDENTES

2.1 Abejas sin aguijón

2.1.1 Generalidades

En el mundo existen aproximadamente 20, 000 especies de abejas. Aunque todas estas especies varían en tamaño, forma y estilo de vida, tienen como característica común su dependencia de las flores para abastecerse de energía (néctar) y de proteínas (polen). Las abejas sin aguijón, también llamadas meliponinos, a diferencia de la mayoría de las especies que se conocen, viven en colonias permanentes con una reina y miles de obreras [6]. Además, junto con las abejas melíferas (*Apis mellifera*), las abejas sin aguijón son las únicas que poseen un comportamiento altamente social (eusocialidad) [7].

En Mesoamérica, las abejas sin aguijón llegaron a cultivarse de manera sistemática; de hecho, en el estado de Yucatán, la meliponicultura (cultivo de las abejas sin aguijón) data desde la época de los mayas; cuando el cultivo de estas abejas se relacionaba fuertemente a las costumbres religiosas, existiendo incluso un dios de las abejas meliponas llamado *Ah Mucen Kab* [7].

Se sabe también, que durante el apogeo de la cultura maya, el cultivo de abejas sin aguijón alcanzó un grado de sofisticación comparado al del cultivo de *Apis mellifera* en la Europa de ese entonces. Incluso se conocían los métodos de reproducción y cuidado de las colonias, así como su mantenimiento; por lo que llegaron a tenerse colonias de abejas sin aguijón en concentraciones de miles. Siendo la miel y la cera obtenidos productos muy apreciados en el ámbito económico en Mesoamérica [7].

Los productos de las abejas sin aguijón han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional maya. La miel se ha empleado para tratar afecciones de los ojos, oídos, problemas respiratorios, digestivos y de la piel. No obstante, es en tiempos recientes que estas propiedades curativas y antibióticas de los productos

producidos por las abejas sin aguijón han empezado a ser estudiadas y valoradas fuera de las comunidades campesinas [8].

2.1.2 Taxonomía

La tribu *Meliponini* se clasifica dentro de la familia *Apidae* y subfamilia *Apinae* [9] y agrupa a todas aquellas abejas conocidas como “abejas sin aguijón” [10].

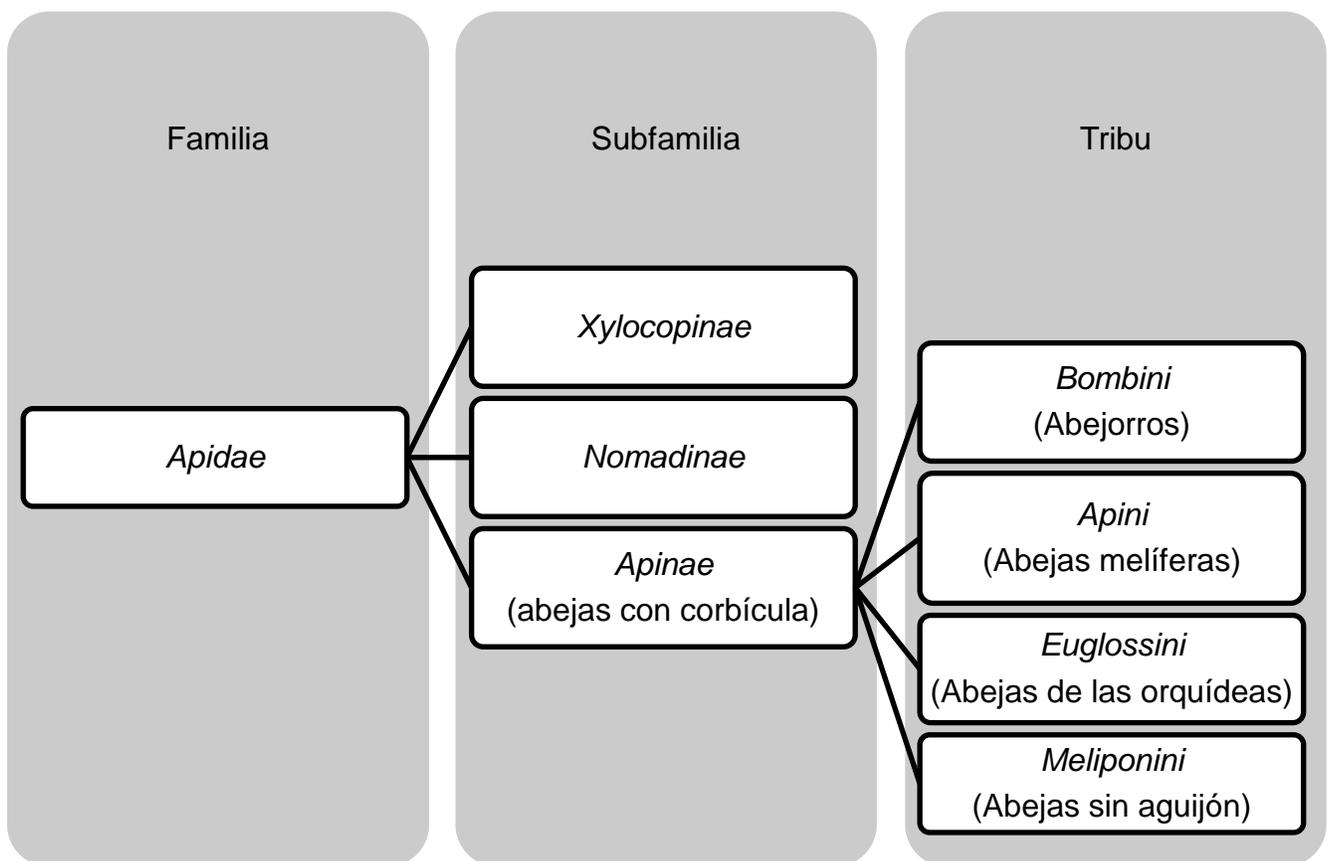


Figura 1. Clasificación simplificada de las abejas sin aguijón (*Meliponini*) de acuerdo con Michener

Existe la hipótesis de una separación temprana en la evolución de la tribu *Meliponini* de los otros tres grupos que conforman la subfamilia *Apinae* (Figura 1). Lo cual, apoyaría también el surgimiento dual de un comportamiento eusocial en *Apinae*, mientras que las similitudes entre las abejas melíferas y las abejas sin

aguijón serían producto de la convergencia evolutiva más que de la existencia de un ancestro común [8].

Una característica notoria del grupo de las abejas sin aguijón, comparada con las abejas melíferas, es precisamente la gran diversidad de especies que difieren no sólo en su morfología sino también en sus hábitos de anidación y de alimentación. A pesar de tales diferencias, todas las abejas sin aguijón o meliponinos poseen características anatómicas que las ubican dentro de un mismo grupo [8].

2.1.3 Características

La característica anatómica principal de estas abejas es precisamente la carencia de un aguijón funcional [7]. Además poseen una estructura pilosa en forma de cepillo en el extremo más ancho de la tibia, conocida como *penicillium* [8], alas con venación débil o reducida y ojos desnudos. Además construyen nidos muy característicos para albergar a sus crías con entradas generalmente conspicuas, las cuales, en algunos casos, sirven para identificar especies. Por otro lado, no todas las abejas sin aguijón utilizan polen como fuente de proteína; puesto que existen también algunas especies con hábitos necrófagos. El tamaño promedio de cada individuo varía desde 2 mm hasta 1.5 cm [7].



Figura 2. *Melipona beecheii*

De acuerdo con sus características anatómicas y de comportamiento, las abejas sin aguijón mexicanas se dividen en dos grandes grupos, el de las Meliponas y el de las Trigonas; aunque esta división no es estrictamente taxonómica, se utiliza con fines prácticos para facilitar su clasificación.

Algunas características correspondientes a cada grupo son las siguientes:

- a) Abejas Meliponas:** Tienen dimensiones corporales de aproximadamente 1 cm; son abejas robustas con mucha pilosidad en el cuerpo. El pterostigma es débil y sus alas anteriores no sobrepasan la longitud total de su cuerpo.

- b) Abejas Trigonas:** Son abejas pequeñas de estructura aerodinámica y cuerpo alargado, brillante, con escaso pelo. Las alas anteriores sobrepasan la longitud del abdomen y tiene un pterostigma grande.

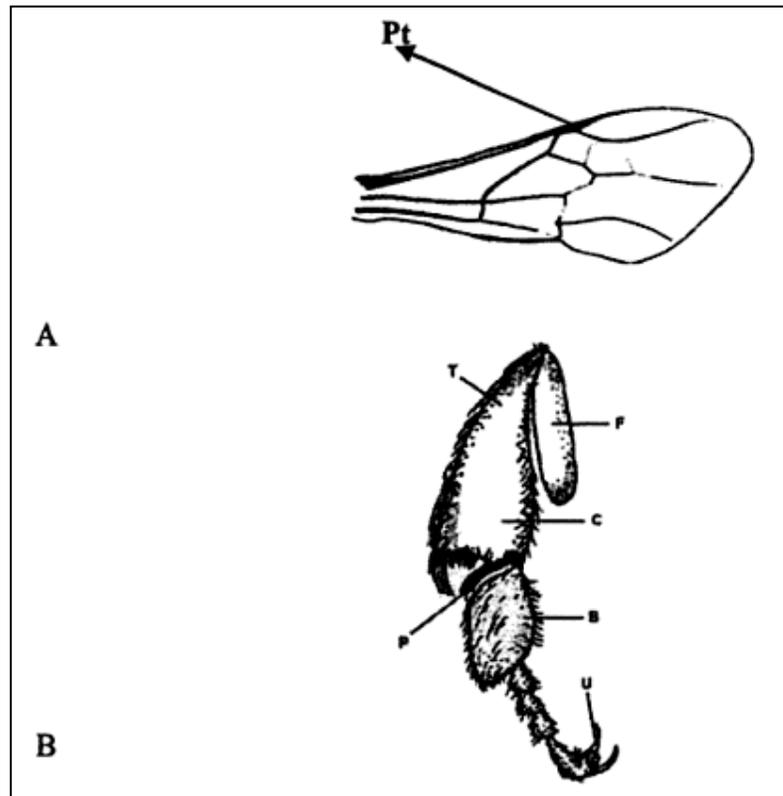


Figura 3. A) Alas anteriores, donde se observa la reducción de las venas. Pt= ptesostigma; B) Pata posterior donde se muestran las siguientes estructuras: F=fémur, T=tibia, C=corbícula, P=penicillium, B=basitario y U=uñas simples.

2.1.4 Distribución

Las abejas sin aguijón habitan únicamente las regiones tropicales del planeta. En la actualidad se tiene conocimiento de la existencia de aproximadamente 400 especies distribuidas en unos 50 géneros. Reportándose en el continente americano la existencia de al menos 300 especies, de las cuales, 46 se encuentran en México [8].

De acuerdo a su distribución geográfica, las abejas sin aguijón pueden dividirse en tres grupos [11]:

- 1) Amplia distribución tropical y subtropical
- 2) Distribución asociada al bosque tropical perennifolio
- 3) Especies endémicas



Figura 4. Distribución de meliponinos en América Latina.

El número de colonias de abejas sin aguijón en las selvas tropicales puede fluctuar entre 10 y 100 por km², lo que demuestra su importancia numérica en este tipo de ecosistemas. Además, se estima que entre 30 y 40% de las especies vegetales en el trópico son visitadas por este tipo de abejas en busca de néctar y polen, moviendo así grandes cantidades de biomasa. Asimismo, muchas especies

vegetales dependen de las visitas de los meliponinos para su polinización, siendo por tanto de vital importancia en el mantenimiento de las selvas [10].

2.2 Geopropóleo

El término propóleo deriva del griego *pro* (“en frente de”, “en la entrada de”) y *polis* (“comunidad” o “ciudad”), y su significado es “en defensa de la colmena”. El propóleo es un material resinoso recolectado por las abejas obreras de la corteza de numerosas especies de árboles tales como el abedul, el álamo, el pino, el sauce y la palma, así como de exudados de las plantas. Una vez recolectado, este material es enriquecido con secreciones enzimáticas y salivales y es utilizado por las abejas para cubrir las paredes de sus colmenas, rellenar grietas o huecos y embalsamar cadáveres de insectos invasores [13].

En algunos países tropicales existe cierto tipo de abejas sin aguijón que recolectan el material resinoso de las plantas y lo mezclan con cera de abeja y componentes del suelo para formar el geopropóleo [13]; término que es utilizado para distinguir el producto producido por las abejas sin aguijón del propóleo producido por las abejas del género *Apis mellifera* [14].

2.2.1 Definición

Las abejas de la tribu *Meliponini* elaboran una sustancia conocida como geopropóleo, el cual es llamado así debido a que, junto con las resinas provenientes de plantas y las ceras secretadas por las abejas, contiene componentes orgánicos e inorgánicos provenientes del suelo [14], lo cual lo provee de distintas características fisicoquímicas [15].



Figura 5. Muestra de Geopropóleo. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com.pbidi.unam.mx:8080/science/article/pii/S037887411200520X#f0025>

2.2.2 Usos y propiedades medicinales

El propóleo no es solamente un material de construcción, es el "arma química" más importante de las abejas contra los microorganismos patógenos y es utilizado como un remedio por los seres humanos desde tiempos remotos. Esta resina sigue siendo uno de los remedios más utilizados en diferentes países, siendo aplicado para el tratamiento de heridas y quemaduras, para el dolor de garganta, úlceras estomacales, etc. Debido a su popularidad en la medicina tradicional, se ha convertido en el tema de intensos estudios farmacológicos y químicos en los últimos 30 años [16].

El propóleo se ha utilizado ampliamente desde la antigüedad. Los egipcios se beneficiaron de sus propiedades para evitar la putrefacción al embalsamar a sus muertos. Se utilizó también como agente antiséptico y cicatrizante por los médicos griegos y romanos. Los incas emplearon el propóleo como un agente antipirético y en las farmacopeas de Londres del siglo XVII aparece como una droga oficial. En la actualidad su uso continúa como un remedio tradicional y está

disponible ya sea en forma pura o en combinación con otros productos naturales en cosméticos y como componente en algunos alimentos [17].

Se ha demostrado además que el propóleo posee diversas propiedades biológicas y farmacéuticas que incluyen actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, analgésica, anticariogénica, antioxidante, citotóxica, hepatoprotectora y propiedades inmunomoduladoras y nociceptivas, entre otras [18-26].

La actividad farmacológica atribuida al propóleo, normalmente se refiere al producto elaborado por *Apis mellifera*, la especie más común en algunos países [27]. Sin embargo, algunas de esas actividades también han sido observadas en el propóleo producido por otras especies de abejas, incluyendo a los miembros de la tribu *Meliponini* [28,29].

Sin embargo, aunque el geopropóleo es utilizado en la medicina tradicional de manera similar al propóleo producido por *A. mellifera* [13] para curar heridas, para el tratamiento de la gastritis y como agente antibacteriano [7], se conoce muy poco sobre su composición química y su actividad biológica [30].

La diversidad en cuanto a la actividad farmacológica demostrada puede deberse a variaciones en la composición química, como se ha observado en otro tipo de propóleos [14,31]. La fuente botánica, el origen geográfico y las subespecies de abejas están relacionados con la variabilidad química del geopropóleo [32]; la cual es uno de los problemas relativos a la normalización de este producto abeja [3].

2.2.3 Composición química

La composición química del propóleo es altamente variable ya que depende de los diferentes tipos de árboles y plantas del sitio de recolección (características fitogeográficas), lo que dificulta su estandarización [17].

Su composición química incluye flavonoides, ácidos aromáticos, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos grasos, terpenos, esteroides, aminoácidos, polisacáridos, hidrocarburos, alcoholes, hidroxibencenos, y algunos otros compuestos en trazas [33, 34]. Contiene también algunos componentes volátiles, resinas, bálsamo vegetal, polen y cera de abeja [34,35]. Además se encuentran presentes metabolitos secundarios de plantas que contribuyen a la actividad biológica, a pesar de que sólo se encuentran en pequeñas concentraciones [35].

Se han realizado estudios que muestran que el propóleo de zonas templadas, especialmente el propóleo Europeo, contiene predominantemente compuestos fenólicos, incluyendo numerosos flavonoides [36]. Un estudio por Bankova y colaboradores (2002) en diez muestras de propóleo de Bulgaria, Italia y Suiza pone en evidencia el contenido de pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina y ésteres de los ácidos cafeico y ferúlico [37].

En el propóleo Brasileño se han encontrado derivados prenilados del cromano y del ácido cumárico [38], derivados isoprenilados de benzofenona fueron aislados del propóleo Cubano [39]. El propóleo de las islas Canarias muestra un perfil químico particular con lignanos furofuránicos [40]. Mientras que en propóleos provenientes de Chile se han aislado compuestos como pinocembrina, acacetina, galangina, izalpina y preniletina [41], así como galangina, ácido cafeico, ácido *p*-cumarico ácido ferúlico y fenetil éster del ácido cafeico (CAPE) [42].

Varias propiedades biológicas del propóleo producido por *A. mellifera* se han descrito, así como la composición de diferentes propóleos, pero se sabe poco acerca de los geopropóleos producidos por las abejas sin aguijón [43].

Sin embargo, previamente se han identificado algunos compuestos fenólicos presentes en el geopropóleo de *Melipona fasciculata* [34, 44, 45], ácidos fenólicos en el caso de *Scaptotrigona bipunctata* [25], derivados del ácido *p*-cumárico en *Tetragonisca angustula* [46] y benzofenonas preniladas en el geopropóleo de la abeja venezolana *Scaptotrigona depilis* [47].

En un estudio realizado por Velikova y colaboradores (2000) se analizaron 21 muestras de geopropóleo de Brasil proveniente de 12 especies diferentes de abejas sin aguijón y se observó la presencia de compuestos tales como diterpenos, triterpenos y ácido gálico [25]. Por otro lado, Bankova y colaboradores (2000) identificaron más de 50 sustancias, en su mayoría compuestos fenólicos en el geopropóleo de Brasil producido por *M. compressipes*, *M. quadrifasciata anthidiodes* y *Tetragona clavipes* [34].

En cuanto a los compuestos volátiles Pino y colaboradores (2006) realizaron un análisis de una muestra de geopropóleo producida por *Melipona beecheii* obtenida en el estado de Yucatán, en México, reportando como compuestos mayoritarios los indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales compuestos volátiles identificados en muestras de geopropóleo por otros grupos de trabajo

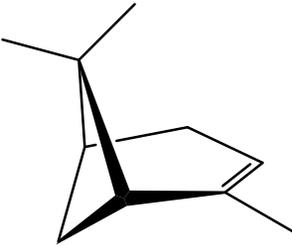
Compuesto	Estructura	Referencia
α-pineno		Pino y cols. 2006

Tabla 1. Principales compuestos volátiles identificados en muestras de geopropóleo por otros grupos de trabajo (continuación)

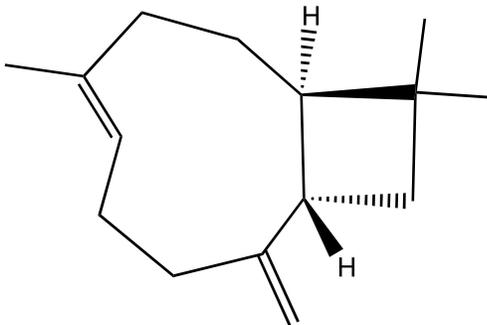
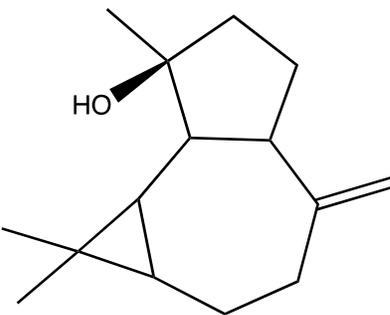
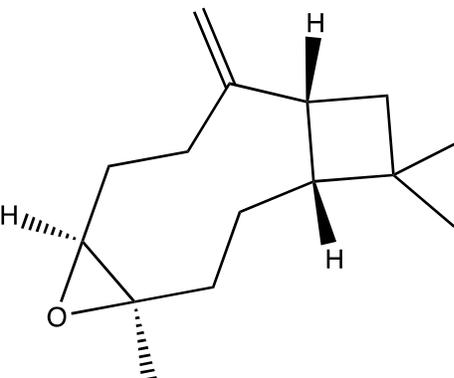
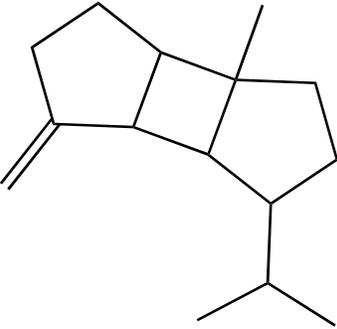
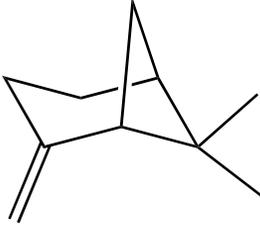
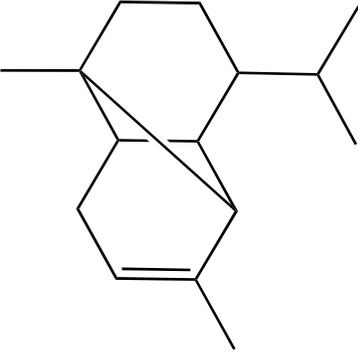
Compuesto	Estructura	Referencia
β -cariofileno		Pino y cols. 2006
espatulenol		Pino y cols. 2006
óxido de cariofileno		Pino y cols. 2006

Tabla 1. Principales compuestos volátiles identificados en muestras de geopropóleo por otros grupos de trabajo (continuación)

Compuesto	Estructura	Referencia
β -bourboneno		Pino y cols. 2006
β -pineno		Pino y cols. 2006
α -copaeno		Pino y cols. 2006

2.3 Microextracción en fase sólida (SPME)

2.3.1 Generalidades

La microextracción en fase sólida (SPME, Solid-Phase Microextraction) fue desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1990. Es una técnica que integra muestreo, extracción, concentración e introducción de la muestra en un único paso libre de disolvente. Los analitos en la muestra se extraen y concentran directamente en la fibra de extracción. Razones por las que este método ofrece diversas ventajas como la reducción de costos, el ahorro de tiempo, la disminución del uso de disolventes y mejora los límites de detección [48]. Además, es fácilmente transportable y ofrece la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas, sólidas o líquidas [49].

Esencialmente, la SPME consta de dos etapas: 1) La adsorción del soluto desde la matriz de la muestra a algún material adsorbente y 2) La transferencia de los analitos a un sistema cromatográfico, ya sea de líquidos o gases [50].

Esta técnica ha sido utilizada rutinariamente en combinación con la cromatografía de gases (CG) y la espectrometría de masas (EM) siendo aplicada con éxito a una amplia variedad de compuestos, especialmente para la extracción de compuestos orgánicos volátiles en muestras biológicas, en alimentos [51] y en el análisis de esencias florales, impurezas de procesos farmacéuticos, agentes químicos tóxicos, pesticidas organoclorados, compuestos volátiles presentes en vinos y quesos, contaminantes en muestras de agua, entre otras [50].

2.3.2 Fundamentos

El equipo utilizado para la SPME es un dispositivo muy simple (Figura 5). Consta de una fibra de soporte y de una fibra retráctil de sílice fundida recubierta de un material adsorbente (tal como polidimetilsiloxano (PDMS)) [51]. Debido al pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa.

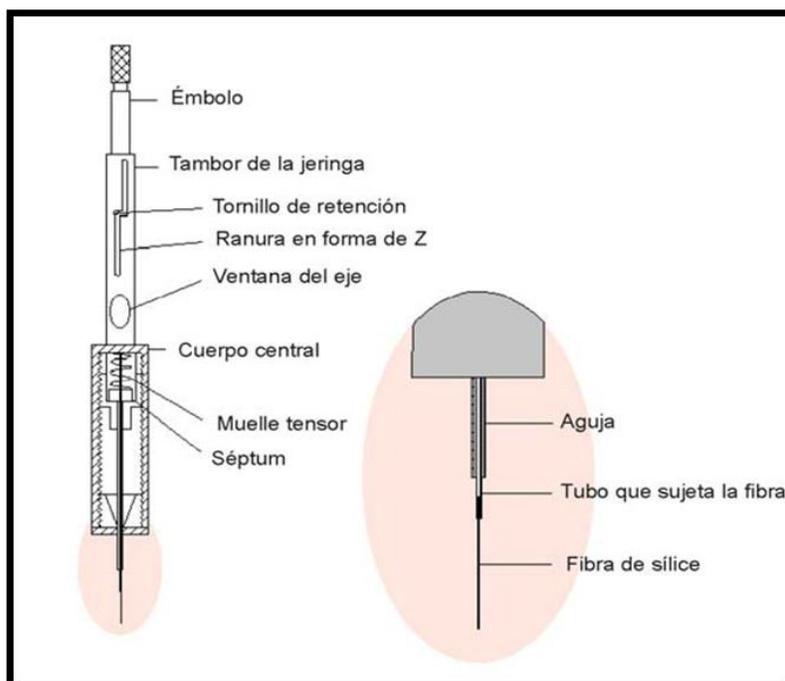


Figura 5. Esquema del dispositivo comercial de SPME (Martíet *al.*, 2003).

El principio en el que se basa la SPME generalmente es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra [56]. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra [49]. Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en el espacio de cabeza o *headspace* [49].

Posteriormente, los solutos absorbidos son transferidos desde la fibra adsorbente a un sistema donde los solutos son desorbidos por la alta temperatura del inyector de un cromatógrafo de gases, para después pasar en forma gaseosa a la columna cromatográfica. El éxito de esta técnica depende de la elección de las condiciones que favorezcan la adsorción de los solutos en la fibra utilizada y de que la subsecuente liberación sea tan rápida y completa como sea posible para su posterior análisis cromatográfico [52].

2.3.3 Procedimiento de la microextracción en fase sólida

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra recubierta del adsorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra. Como se ha comentado en el apartado anterior, existen dos formas básicas de realizar la extracción en SPME: extracción por inmersión directa o bien del espacio de cabeza [49].

a) Extracción

En cualquier caso, la aguja se inserta en la posición apropiada (por ejemplo, a través de un septo en el espacio de cabeza), la aguja que protege la fibra es retraída y la fibra se expone a la muestra ya sea en un líquido o en fase gaseosa [52]. El recubrimiento de polímero actúa como una esponja, concentrando los analitos por procesos de absorción y adsorción [48]. La cantidad de solutos en la capa de SPME poco a poco llega a un equilibrio con su entorno, lo que representa la cantidad máxima de soluto que puede ser adsorbida [52]. La cinética del proceso de extracción de la SPME depende de una serie de parámetros (por ejemplo el espesor de película, la agitación de la muestra, la temperatura, etc.) [51].

En una microextracción, la cantidad de analito absorbido en una fibra recubierta se puede expresar con la siguiente ecuación:

$$m = \frac{KV_f C_0 V_s}{KV_f + V_s}$$

donde V_f es el volumen de la película de la fibra, V_s es el volumen de la disolución de la que se extrae, y C_0 es la concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$) de la disolución que se extrae. K es el coeficiente de reparto del soluto entre la película y la disolución. La ecuación supone que el volumen de la muestra es mucho mayor que el volumen de la capa de SPME [53]. Los recubrimientos para SPME tienen típicamente espesores de aproximadamente 10-100 μm [52].

b) Transferencia

Después del muestreo, la fibra se retrae en la aguja de metal (como protección mecánica), y el siguiente paso en realizarse es la transferencia del analito desde la fibra hasta el cromatógrafo. Una vez que la aguja se introduce en un cromatógrafo de gases la fibra se expone dentro de la guía caliente del inyector.

c) Desorción

Una vez en su lugar dentro del cromatógrafo, el analito se desorbe térmicamente de la fibra, y se introduce sin división durante un tiempo fijo [53]. La fibra se inserta en el inyector del cromatógrafo de gases (d) que se encuentra a temperatura suficientemente elevada para que, al bajar de nuevo el émbolo de la jeringa (e), de forma instantánea se desorban los analitos entrando en la columna cromatográfica. Es la forma de desorción más ampliamente utilizada [65].

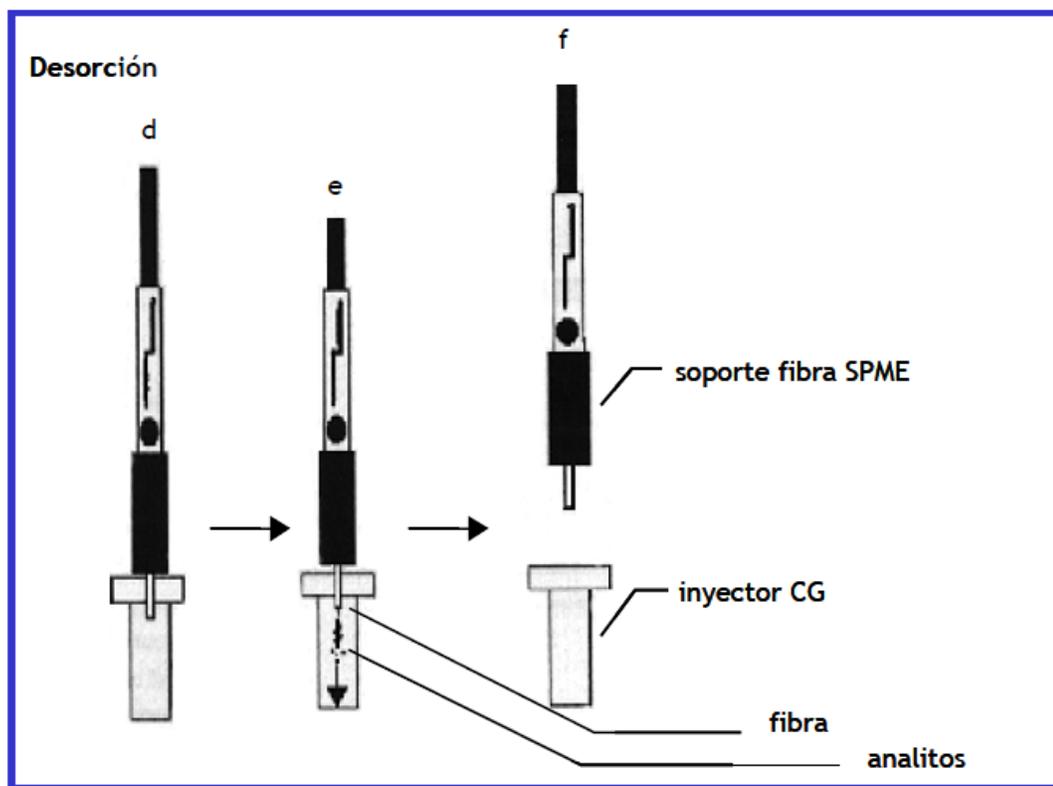


Figura 6. Etapa de desorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.

2.3.4 Variables que afectan el proceso de SPME

El proceso de SPME se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción. Entre estas variables se encuentra la agitación de la muestra, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio de cabeza por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio. Otros parámetros importantes son el tiempo y la temperatura de extracción, así como la modificación de las condiciones de la muestra, y los parámetros que afectan la etapa de desorción. Estos últimos dependen de la técnica analítica que se utilice a continuación para llevar a cabo la separación y cuantificación de los analitos [49].

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido a la automedicación y al uso indiscriminado de algunos antibióticos, la prevalencia de organismos patógenos resistentes es cada vez mayor. Además, las infecciones causadas por bacterias multirresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad, implicando también la aparición de tratamientos más costosos, peligrosos e invasivos. Estas razones han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas a partir de fuentes naturales que permitan combatir procesos infecciosos que afectan a la mayor parte de la población.

En este sentido, el geopropóleo representa una opción viable para el desarrollo de nuevos tratamientos contra diversas enfermedades debido a sus propiedades antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, analgésicas, anticariogénicas, antioxidantes, citotóxicas, hepatoprotectoras, inmunomoduladoras y nociceptivas. Este tipo de propóleo es producido por abejas sin aguijón y es una mezcla de exudados de plantas, cera de abeja y suelo. Sin embargo, no existen estudios sobre la composición química de los geopropóleos mexicanos.

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

- Realizar una búsqueda exhaustiva de las diferentes publicaciones sobre los geopropóleos.
- Establecer las mejores condiciones analíticas de extracción para la muestra de geopropóleo utilizando la técnica MEFS-EC-CG-EM-TV (HS-SPME-GC-MS-TOF)
- Realizar la determinación de los componentes volátiles del geopropóleo utilizando la técnica de MEFS-EC-CG-EM-TV (HS-SPME-GC-MS-TOF).

- Implementar la metodología de Kovats para identificar los compuestos volátiles presentes en el geopropóleo.
- Determinar la actividad biológica de los compuestos mayoritarios identificados en el geopropóleo.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos generales

4.1.1 Material vegetal y procedimiento de extracción

Las muestras de geopropóleo producidas por las abejas de los géneros *Melipona* y *Scaptotrigona* fueron recolectados manualmente en el mes de julio del 2011 en Coatepec, Veracruz, México. La recolección estuvo a cargo del MVZ. Ángel López Ramírez del Departamento de Conejos, Abejas y Especies pequeñas de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM. El geopropóleo fue molido (*Melipona*: 131.6819 g) y se extrajo utilizando un método de maceración con etanol como disolvente durante un período de 72 horas. Al término de las extracciones, los extractos se filtraron, se combinaron y concentraron a sequedad.

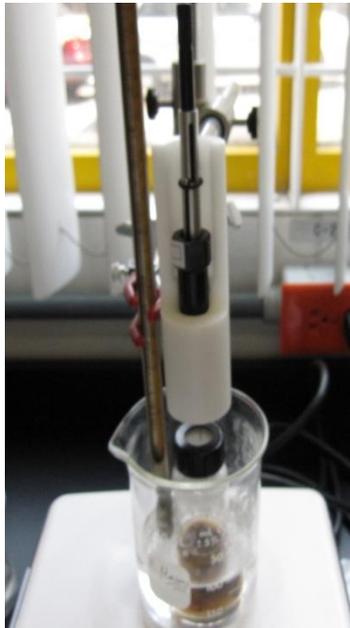


Figura 7. Microextracción en fase sólida por el método de espacio de cabeza

4.1.2 Microextracción en fase sólida

Para realizar la microextracción se empleó la fibra de Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 2cm 50/30 μ m); la cual fue activada siguiendo las instrucciones del fabricante (Supelco). Previo a cada proceso de microextracción se realizó una corrida blanco. Posteriormente, para realizar cada microextracción se emplearon aproximadamente 5 g de la muestra de geopopóleo, 5 mL de agua y 20 mg de NaCl, los cuales fueron colocados en un vial de 40 mL con septum de politetrafluoroetileno (PTFE). El vial cerrado herméticamente fue sometido a agitación, a una temperatura de entre 45-50°C y la fibra elegida se expuso en el espacio de la cabeza del vial para la adsorción de los analitos durante 90 minutos (Figura 7). Después de ello, se retiró la fibra del vial para introducirla dentro del inyector del cromatógrafo por 3 minutos para su desorción y análisis. Este proceso se realizó por triplicado.

4.1.3 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

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

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

Tabla 2. Condiciones de análisis optimizadas.

Técnica de preparación de la muestra	Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa (HS-SPME)
Microfibra utilizada	2cm 50/30µm DVB/CAR/PDMS Marca Supelco Lote P340030 No. Cat. 573-48-U
Tiempo de exposición de la fibra	90 minutos
Temperatura de la muestra	45-50°C (baño de agua)
Posición de la fibra en la extracción	En fase gaseosa (Headspace)
Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos

Tabla 3. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.

Marca y modelo del equipo	LECO Pegasus 4D
Técnica analítica	CG-EM-TOF
Temperatura del inyector	300°C
Cromatógrafo de gases	Agilent 6890N
Columna capilar (fase)	DB5 10 m x 0,18 mm di x 0,18 µm
Programación de la temperatura del horno	40°C (1 minuto), 20°C/minuto hasta 300°C (5 minutos)
Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
Flujo del gas acarreador	1 mL/minuto

Temperatura de la línea de transferencia	250°C
Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)
Adquisición espectral	20 espectros/Segundo
Retraso/encendido del filamento	0 minutos
Intervalo masas	33-400 u
Temperatura de la cámara de ionización	200°C
Compuesto de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)

4.1.4 Identificación de los compuestos volátiles

La identificación de los compuestos volátiles se realizó en primer lugar por comparación de los espectros de masas obtenidos con los encontrados en la base de datos NIST (National Institute of Standards Technology). Por otra parte, se implementó la metodología de Kovats para determinar los índices de retención y realizar la identificación de los compuestos al comparar los índices con los descritos en la biblioteca NIST y en Adams (2007) [62].

4.2 Ensayo biológico

4.2.1. Microorganismo de prueba

El microorganismo de prueba utilizado para determinar la actividad bacteriana de los extractos etanólicos de las muestras de geopropóleo fue *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), el cual es el principal agente causal de caries. Para el crecimiento óptimo la bacteria, se utilizó como medio de cultivo el caldo de la infusión de cerebro-corazón (BHI).

4.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad antibacteriana de los compuestos y extractos, se determinó mediante un ensayo de microdilución en placa de 96 pozos. Se utilizó una cepa de *S. mutans* conservada en glicerol a -64°C . Previamente, se incubó el cultivo bacteriano por 24 h, en caldo BHI, para reactivar la cepa, después se resembró en caldo BHI, y se cultivó por 4 horas, posteriormente, la suspensión de células se ajustó utilizando un espectrofotómetro (marca Agilent, modelo 8453E) a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. En cada pozo se colocó el medio de cultivo (100 μL), y en el primer canal se adicionó el compuesto de prueba (100 μL), del cual se realizaron diluciones seriadas. Después se agregó medio de cultivo con 1% de sacarosa (80 μL). Posteriormente se adicionó 1×10^6 UFC/mL de *S. mutans* (20 μL). La CMI se determinó por duplicado para cada compuesto o fracción de prueba, utilizando diferentes controles como se muestra en la Tabla 4. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una incubadora Labnet 211DS.

Tabla 4. Controles para el ensayo biológico.

Control	Medio de cultivo	Compuesto de prueba	Condiciones
Control de disolvente*	Con inóculo	-	37°C
Control negativo	Con inóculo	-	37°C
Blanco	Sin inóculo	-	37°C
Control positivo	Con inóculo	gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12%	37°C

*El disolvente utilizado fue agua: DMSO (80:20); -: sin compuesto de prueba

La bacteria *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente ($A_{660\text{ nm}}$) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas. El valor de CMI para *S. mutans* se determinó como la concentración mínima del compuesto de prueba que inhibe el crecimiento bacteriano en el pozo de dilución.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recientemente, se ha intensificado el estudio de los componentes volátiles y aceites esenciales derivados de especies vegetales como agentes de control bacteriano [54]. Esta tendencia obedece a que los aceites esenciales contienen constituyentes con actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas [55]. Otras actividades importantes de los aceites son las espasmolíticas, antinociceptivas y antioxidantes, entre otras. Además, los aceites esenciales poseen propiedades inmunomoduladoras, psicotrópicas, acaricidas y expectorantes [54]. Recientemente, se les ha descrito a los compuestos volátiles actividades antivirales y propiedades supresoras del cáncer [55]. Debido a estas propiedades los aceites esenciales poseen numerosas aplicaciones en la medicina y la aromaterapia [56].

En el curso de la historia los aceites esenciales han sido utilizados en la medicina tradicional por sus propiedades antibacterianas. Por esta razón, las plantas y materiales vegetales que los contienen se usan para el tratamiento de enfermedades infecciosas desde tiempos antiguos, aun cuando no se tenía conocimiento de la existencia de los microorganismos [56].

Las plantas medicinales y materiales vegetales como los propóleos se siguen utilizando hasta la fecha, sin embargo, la investigación de los compuestos activos es posible utilizando técnicas analíticas modernas. En un principio estos estudios consistían en el aislamiento de los aceites esenciales y su caracterización utilizando la cromatografía de gases (CG) y de líquidos de alta resolución (HPLC) combinadas con la espectrometría de masas [57]. Sin embargo, en ninguno de los casos los métodos pueden utilizar las matrices íntegras directamente. En general, los métodos analíticos involucran procesos tales como el muestreo, para la preparación de la muestra, separación, detección y análisis de datos. Por otra parte, es importante mencionar que estos análisis consumen gran cantidad de tiempo y el 80 % del tiempo se gasta en el muestreo y los pasos

concernientes a la preparación de la muestra como la extracción, la concentración, fraccionamiento y aislamiento de los analitos. Con la finalidad de conseguir métodos prácticos y confiables para el análisis de matrices complejas, tales como los alimentos y materiales vegetales, se han desarrollado numerosos métodos como la destilación por arrastre de vapor, la extracción con disolventes orgánicos o fluidos supercríticos y la extracción en fase sólida. Sin embargo, estos métodos presentan algunos inconvenientes, tales como ser tediosos y consumidores de tiempo, además de requerir grandes volúmenes de muestras y disolvente [57, 58]. Además de que algunos de estos métodos causan una pérdida parcial de los analitos debido a que en el proceso la temperatura volatiliza algunos compuestos, como es en el caso de la destilación y la extracción Soxhlet [67, 68].

Por las razones mencionadas previamente, se desarrolló la microextracción en fase sólida (SPME) por Pawliszyn y colaboradores en 1990 [57]. Esta técnica de preparación de la muestra relativamente nueva involucra la utilización de una fibra de sílica fusionada recubierta en su exterior por diferentes fases estacionarias. En este método el analito es directamente extraído y concentrado en el recubrimiento de la fibra. Las mayores ventajas que posee la SPME es el ahorro de tiempo, de disolvente y la mejora en los límites de detección [58]; sin la pérdida de analitos que debido a la temperatura conlleva un proceso de extracción (destilación, Soxhlet, etc.) [67,68].

La muestra de geopropóleo de las abejas sin aguijón se obtuvo a partir de un meliponario ubicado en Coatepec, Veracruz en el mes de junio de 2011. La flora natural que existe en esta zona del estado está compuesta principalmente por vegetación del bosque mesófilo montaña de donde destacan especies como el alamillo (*Populus tremula*), palo de baqueta (*Ulmus mexicana*), palo barranco (*Mirandaceltis monoica*), álamo (*Populus mexicana*), cedro (*Cedrela odorata*) y ocozote (*Liquidambar styraciflua*) [59].

La primera parte de este estudio consistió en la obtención de las condiciones óptimas para llevar a cabo el análisis de la muestra de geopropóleo.

Resultados y Discusión

En esta fase se realizaron pruebas para determinar la temperatura y el tiempo de extracción óptimos.

Los compuestos volátiles del geopropóleo se determinaron utilizando la técnica de HS-SPME-CG-EM-TOF utilizando una fibra gris (DVB/CAR/PDMS). En la Tabla 5 se resumen los compuestos separados, las abundancias relativas y los tiempos de retención para cada uno de los compuestos separados en una columna DB-5.

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Melipona* mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Área	T.R. (s)	IK _E ^a	IK _T ^a	Método ident. ^b	Peso	Fórmula
1	hexanal	0.6410± 0.12	104.044	803	805	EM/IR	100	C ₆ H ₁₂ O
2	(2E)-hexenal	0.0685± 0.03	158.444	855	855	EM/IR	98	C ₆ H ₁₀ O
3	estireno	10.3520± 0.63	203.944	898	895	EM/IR	104	C ₈ H ₈
4	heptanal	2.4496± 0.27	217.544	900	902	EM/IR	114	C ₇ H ₁₄ O
5	α-pineno	4.3196± 0.34	240.194	939	939	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
6	β-fencheno	13.5569± 0.46	244.494	944	948	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
7	canfeno	1.3481± 0.17	254.444	955	954	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
8	artemisol	0.6219± 0.06	259.144	960	970	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
9	benzaldehído	7.8279± 0.19	274.344	977	978	EM/IR	106	C ₇ H ₆ O
10	β-pineno	2.3613± 0.21	278.094	981	979	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
11	ter-butilbenceno	0.2420± 0.07	288.194	992	992	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄

^aIRL de los compuestos determinados utilizando DB-5; IRL: índices de retención lineales

^bEM: espectrometría de masas; IR: índices de retención

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Melipona* mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Área	T.R. (s)	IK _E	IK _T	Método ident.	Peso	Fórmula
12	(1-metilpropil)-benceno	0.1237± 0.05	299.044	1009	1009	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
13	octanal	0.9812± 0.12	301.294	1012	1012	EM/IR	128	C ₈ H ₁₆ O
14	<i>o</i> -isopropeniltolueno	0.1923± 0.03	301.894	1014		EM	132	C ₁₀ H ₁₂
15	α -terpineno	0.0499± 0.002	306.694	1023	1019	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
16	<i>p</i> -cimeno	0.2756± 0.07	308.244	1026	1026	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
17	<i>m</i> -cimeno	4.2386± 0.34	313.394	1035	1037	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
18	limoneno	2.7776± 0.12	315.494	1039	1039	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
19	1-(2-furanyl)-3-butanona	0.4594± 0.09	316.044	1040		EM	138	C ₈ H ₁₀ O ₂
20	alcohol santolina	0.2620± 0.05	316.894	1041	1040	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
21	3-metilfenol	0.0161± 0.001	331.144	1067	1070	EM/IR	108	C ₇ H ₈ O
22	4-metil-1-(1-metiletetil)-ciclohexeno	0.1989± 0.07	332.144	1070	1072	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
23	2-octenal	0.1914± 0.03	335.344	1075	1072	EM/IR	126	C ₈ H ₁₄ O
24	4-(1-hidroperoxi-2,2-dimetil-6-metilen-ciclohexil)-pent-3-en-2-ona	1.4770± 0.35	340.994	1085		EM	238	C ₁₄ H ₂₂ O ₃
25	<i>cis</i> -tujona	0.0841± 0.001	350.244	1102	1102	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
26	<i>m</i> -cimeneno	2.1941± 0.14	352.094	1106		EM	132	C ₁₀ H ₁₂

^aIRL de los compuestos determinados utilizando DB-5; IRL: índices de retención lineales

^bEM: espectrometría de masas; IR: índices de retención

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Melipona* mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Área	T.R. (s)	IK _E	IK _T	Método ident.	Peso	Fórmula
27	5-metil-2-hexanona	0.4375± 0.03	352.894	1108		EM	114	C ₇ H ₁₄ O
28	1,2,4,5-tetrametil-benceno	0.2635± 0.04	354.944	1112	1114	EM/IR	134	C ₁₀ H ₁₄
29	4-(1-metiletil)-ciclohexanol	0.4446± 0.02	360.494	1122	1126	EM/IR	142	C ₉ H ₁₈ O
30	2,6-dimetil-octa-2,4,6-trieno	0.9719± 0.01	371.794	1143	1144	EM/IR	136	C ₁₀ H ₁₆
31	α-canfolenal	2.2172± 0.13	372.294	1143		EM	152	C ₁₀ H ₁₆ O
32	<i>trans</i> -pinocanfona	2.1153± 0.07	380.594	1158.9	1162	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
33	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	1.0863± 0.09	382.244	1162	1165	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
34	<i>cis</i> -pinocanfona	1.1517± 0.03	389.594	1175.5	1175	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
35	<i>m</i> -cimenol	0.9743± 0.07	390.744	1178	1179	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
36	<i>trans</i> -isocarveol	2.8011± 0.09	396.794	1189	1189	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
37	santalona	1.9821± 0.04	398.194	1191		EM	164	C ₁₁ H ₁₆ O
38	dihidrocarveol	1.9819± 0.06	398.444	1192	1193	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
39	(4 <i>E</i>)-decenal	3.2825± 0.12	400.994	1197	1196	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O
40	3,4-dimetilfenol	0.0818± 0.001	403.294	1201		EM	122	C ₈ H ₁₀ O
41	biciclo[2.2.1]hept-2-en-7-ol	0.2676± 0.002	403.844	1202		EM	110	C ₇ H ₁₀ O
42	(6 <i>Z</i>)-nonen-1-ol	0.2677± 0.02	404.094	1203		EM	142	C ₉ H ₁₈ O
43	verbenona	2.5920± 0.13	407.194	1210	1205	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
44	<i>trans</i> -pulegol	2.0598± 0.17	410.044	1216	1214	EM/IR	154	C ₁₀ H ₁₈ O

^aIRL de los compuestos determinados utilizando DB-5; IRL: índices de retención lineales

^bEM: espectrometría de masas; IR: índices de retención

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Melipona* mediante la metodología de Kovats.

Pico	Nombre	% Área	T.R. (s)	IK _E	IK _T	Método ident.	Peso	Fórmula
45	2-(3-metil-2-butenil)-ciclopentanona	0.7941±0.06	413.344	1224	1227	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
46	(Z)-ocimenona	5.4962± 0.17	415.794	1230	1229	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
47	neral	0.4072± 0.03	419.594	1239	1238	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
48	cis-anetol	0.0697± 0.001	428.394	1259	1258	EM/IR	148	C ₁₀ H ₁₂ O
49	D-carvona	0.4584± 0.010	429.144	1260		EM	150	C ₁₀ H ₁₄ O
50	α-citral	0.1336± 0.002	433.494	1270	1267	EM/IR	152	C ₁₀ H ₁₆ O
51	timol	0.0483± 0.002	440.694	1288	1290	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
52	trans-verbenilacetato	1.3559± 0.090	444.644	1296	1292	EM/IR	160	C ₁₀ H ₈ O ₂
53	2,3,5,6-tetrametil-fenol	0.0463± 0.002	456.144	1323	1319	EM/IR	150	C ₁₀ H ₁₄ O
54	α-longipineno	0.1633± 0.012	469.894	1355	1352	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
55	modhefeno	0.4387±0.012	482.044	1383	1383	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
56	β-bourboneno	0.6939± 0.007	485.544	1391	1390	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
57	1,4-dimetil-naftaleno	0.1192± 0.04	503.094	1437	1436	EM/IR	156	C ₁₂ H ₁₂
58	aromadendreno	0.1192± 0.003	503.394	1438	1440	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
59	alloaromadendreno	0.4121± 0.04	513.744	1465	1462	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
60	γ-gurjuneno	0.3903± 0.08	515.394	1470	1473	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
61	1,5-cis-aromadendr-9-eno	0.5677± 0.012	520.994	1484	1484	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
62	α-muroleno	0.5991± 0.024	526.694	1500	1499	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
63	β-bisaboleno	0.6723± 0.12	529.394	1507	1509	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
64	δ-cadineno	0.3358± 0.07	535.444	1524	1524	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄

^aIRL de los compuestos determinados utilizando DB-5; IRL: índices de retención lineales

^bEM: espectrometría de masas; IR: índices de retención

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en el geopropóleo de *Melipona* mediante la metodología de Kovats (continuación).

Pico	Nombre	% Área	T.R. (s)	IK _E	IK _T	Método ident.	Peso	Fórmula
65	<i>trans</i> -dauca-4(11),8-dieno	0.3107± 0.01	537.094	1528	1529	EM/IR	204	C ₁₅ H ₂₄
66	1,2,3,4-tetrahidro-2,5,8-trimetilnaftaleno	0.9819± 0.09	539.094	1533		EM	174	C ₁₃ H ₁₈
67	(3 <i>s</i> - <i>cis</i>)-3,3 α ,4,5-tetrahidro-3 α -metil-2 <i>h</i> -benz[e]inden-3 α -ol	0.1123± 0.08	543.244	1544		EM	200	C ₁₄ H ₁₆ O
68	γ -calacoreno	0.0156± 0.001	545.844	1551	1554	EM/IR	200	C ₁₅ H ₂₀
69	guaia-6,9-dien-4 β -ol	0.1308± 0.034	549.344	1561	1565	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O
70	1a,10a-epoxiamorf-4-eno	0.0322± 0.001	555.594	1577	1569	EM/IR	206	C ₁₅ H ₂₆
71	epóxido de β -funebreno	0.3936± 0.012	560.144	1590	1591	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O
72	1,9-óxido de bisabola-2,10-dieno	0.6173± 0.09	561.294	1592	1592	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O
73	β -bisabolol	0.7404± 0.023	587.694	1675	1672	EM/IR	222	C ₁₅ H ₂₆ O
74	kusinol	0.7410± 0.101	587.894	1675	1674	EM/IR	220	C ₁₅ H ₂₄ O
75	4-isopropil-1,6-dimetilnaftaleno	0.1637±0.005	592.744	1690	1680	EM/IR	198	C ₁₅ H ₁₈

^aIRL de los compuestos determinados utilizando DB-5; IRL: índices de retención lineales

^bEM: espectrometría de masas; IR: índices de retención

La identificación de los constituyentes volátiles del geopropóleo se realizó utilizando la cromatografía de gases (CG) acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM), ya que es la herramienta de separación e identificación de analitos más adecuada para analizar compuestos volátiles, y por lo tanto la más utilizada para el análisis de los aceites esenciales y compuestos volátiles de un modo confiable [57, 58, 62].

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

Para implementar la identificación de los compuestos volátiles basada en la metodología de Kovats se utilizaron como estándares externos una mezcla de hidrocarburos constituida por una serie homóloga de *n*-alcanos (C-8 a C-24); el proceso de elución se realizó utilizando las mismas condiciones cromatográficas que para las muestras. Las mezclas de parafinas son ampliamente utilizadas debido a que son no polares y químicamente inertes [62]. En la Figura 8, se muestran los cromatogramas obtenidos para la serie homóloga de alcanos y el de la muestra de geopropóleo.

La comparación de los espectros de masas se realizó utilizando la base de datos que se incluye en el programa del equipo (Software ChromaTOF®). Esta comparación se realiza considerando el espectro obtenido y el incluido en la base de datos NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología). En las Figuras 9 y 10 se muestra la comparación de los espectros de masas obtenidos para el benzaldehído y el campeno experimentalmente con los que se encuentran en la biblioteca del equipo utilizado.

Asimismo, los índices de Kovats fueron calculados de manera automática por el software del equipo utilizando el siguiente algoritmo:

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

donde

I = Índice de Kovats, n = número de átomos de carbono del alcano más corto, N = número de átomos de carbono en el alcano más largo, z = diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más corto y el más largo, t_r = tiempo de retención [66].

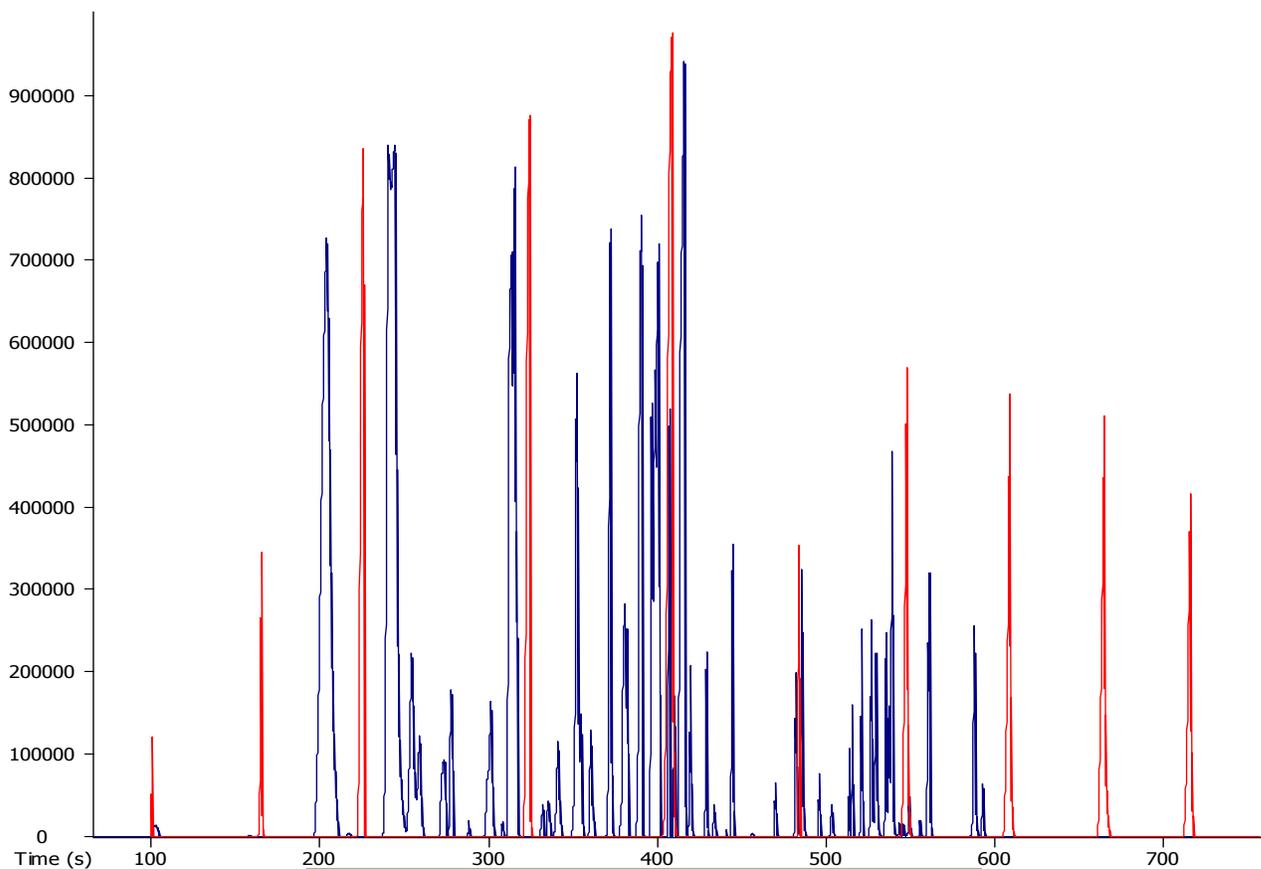


Figura 8. Comparación del cromatograma de los estándares empleados (color rojo) con el obtenido para el geopropóleo del Estado de Veracruz (azul).

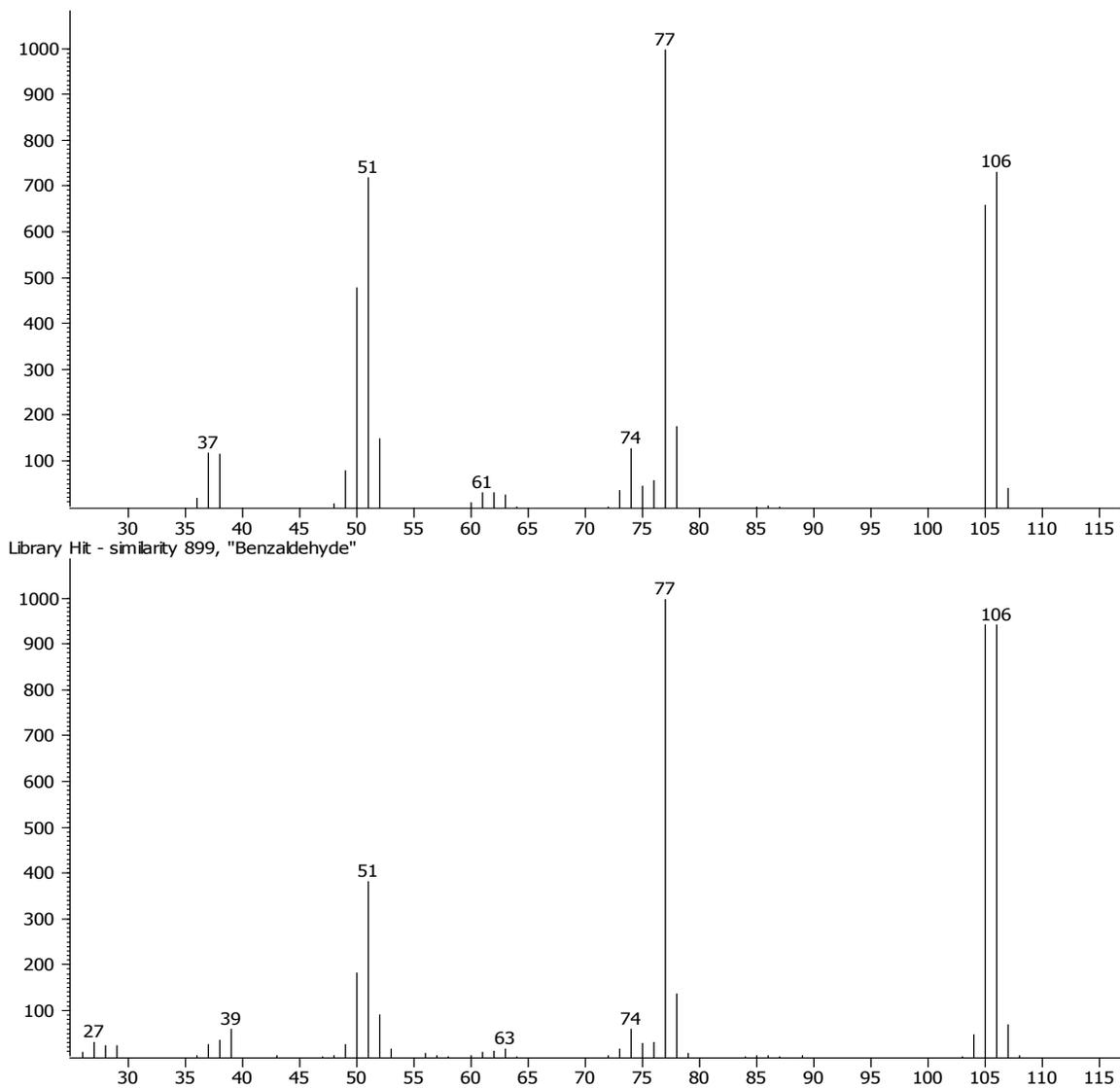


Figura 9. Comparación del espectro de masas obtenido para el benzaldehído con el de la biblioteca del equipo utilizado.

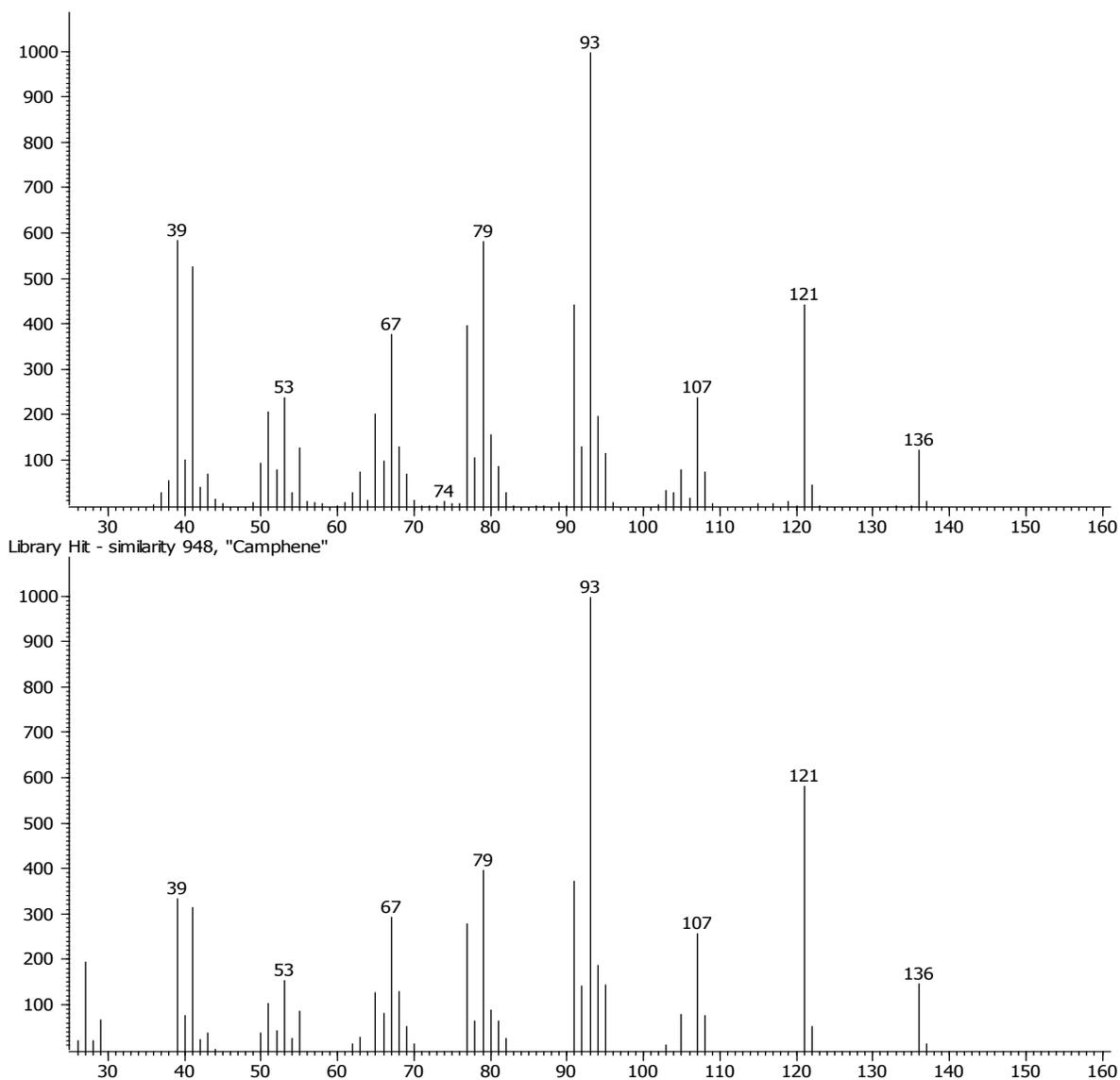


Figura 10. Comparación del espectro de masas obtenido para el canfeno con el de la biblioteca del equipo utilizado.

Un total de 75 constituyentes fueron separados a partir de la muestra de geopropóleo recolectada. Los compuestos mayoritarios presentes en la muestra fueron los compuestos aromáticos simples como el estireno (10.35 %); aldehídos como el benzaldehído (7.8279 %), (4*E*)-decenal (3.2825 %) y el heptanal (2.4496 %); terpenos como el β -fencheno (13.5569 %), (Z)-ocimenona (5.4962 %), α -

pineno (4.3196 %), *trans*-isocarveol, (2.8011 %), β -limoneno (2.776 %), verbenona (2.5920 %), β -pineno (2.3613 %), α -canfolenal (2.2172 %), *m*-cimeneno (2.1941 %), *trans*-pulegol (2.0598%), santalona (1.9821 %) y el dihidrocarveol (1.9819%). En un estudio previo realizado por Pino y colaboradores en 2006 se encontró que a partir de una muestra de geopropóleo recolectada en el Estado de Yucatán, México los constituyentes mayoritarios eran: el α -pineno (11.9 %), β -cariofileno (11.8 %), espatulenol (9.7 %), óxido de cariofileno (9.5 %), β -burboneno (9.2 %), β -pineno (6.7 %), α -copaeno (4.8 %) y *trans*-verbenol (4.0 %) [35].

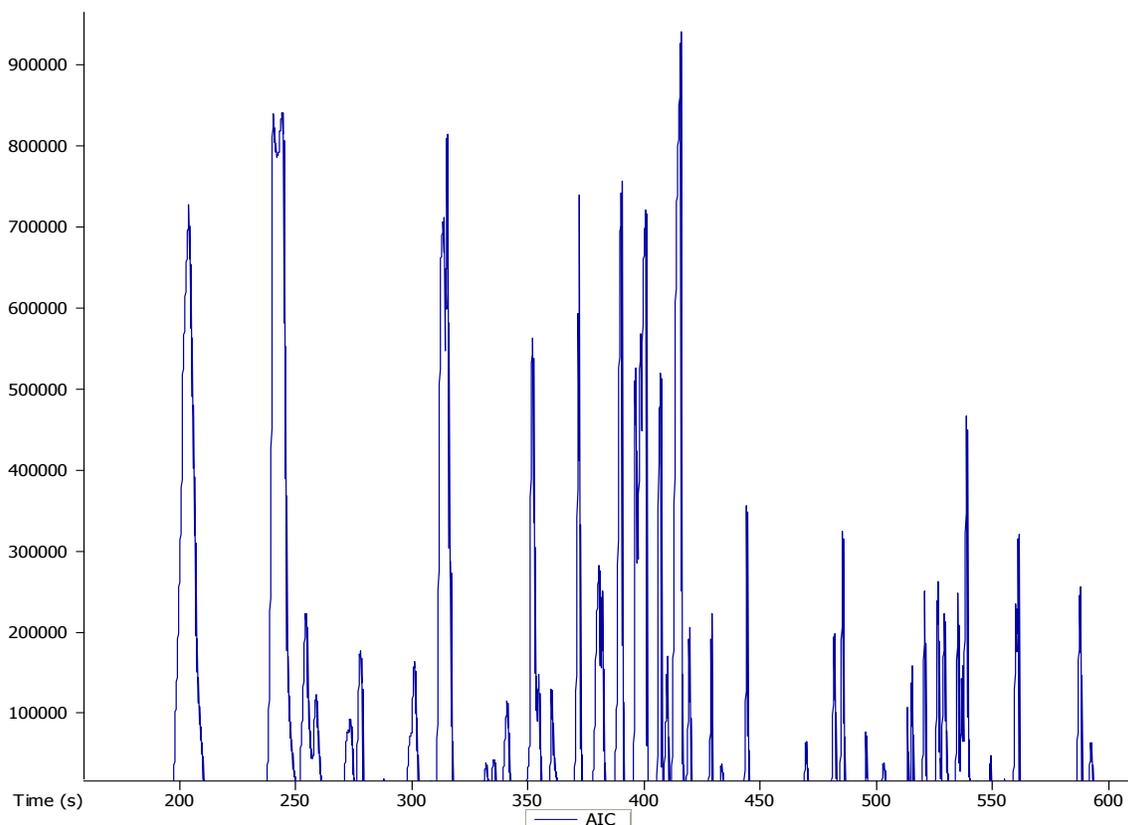


Figura 11. Cromatograma del geopropóleo producido por las abejas Meliponas

Cabe destacar que uno de los componentes mayoritarios en la muestra de geopropóleo fue el estireno (10.35%), resultado que puede ser relacionado con la

vegetación presente en la región. Ya que, como se mencionó con anterioridad, una parte de la flora de esa región del Estado, se compone de ocozote (*Liquidambar styraciflua*) [59].

Se ha reportado con anterioridad que el estireno puede ser encontrado en las resinas producidas por el género *Liquidambar* [63, 64], lo cual podría explicar la presencia de este compuesto en la muestra estudiada.

Por último, se evaluó el efecto del extracto etanólico del geopropóleo recolectado sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans* utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita previamente por Rivero y cols [61]. Los resultados de esta evaluación indican que el extracto presentaba una CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$. Esta concentración puede considerarse medianamente activa al compararla con la CMI obtenida para el gluconato de clorhexidina (3.2 $\mu\text{g/mL}$) que se utilizó como control positivo. Es importante mencionar que la CMI obtenida para la muestra de geopropóleo estudiada se encuentra dentro de los rangos reportados en la literatura para muestras recolectadas en otras partes del mundo [60].

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- i) Se desarrolló y optimizó el método analítico para la extracción, separación, concentración y análisis de los compuestos volátiles de las muestras de geopropóleo, utilizando la técnica acoplada de FG-MEFS-CG-EM-TV, por sus siglas en español (HS-SPME-GC-MS-TOF, por sus siglas en inglés) y la posterior implementación de la metodología de Kovats para realizar la identificación de dichos compuestos.
- ii) El análisis de la muestra de geopropóleo producida por abejas sin aguijón del género *Melipona* recolectadas en el Estado de Veracruz utilizando la técnica acoplada de HS-SPME-GC-MS-TOF permitió identificar 75 compuestos volátiles en 10 minutos, que es el tiempo en el que se obtiene el cromatograma.
- iii) El extracto etanólico derivado del geopropóleo de *Melipona* presentó una actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans* con una CMI de 500 µg/mL.
- iv) La identificación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de geopropóleos recolectadas en el Estado de Veracruz representa una aportación original a la química de los geopropóleos en México.

7. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar el estudio de las fracciones no volátiles, con la finalidad de aislar y purificar compuestos presentes.
- ❖ Determinar la composición de volátiles de muestras de geopropóleo recolectadas en otras regiones de México con la finalidad realizar una comparación de su composición.
- ❖ Evaluar los componentes volátiles mayoritarios para determinar su efecto sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mitscher, L. A., Pillai, S., Shankel, D., 2000. **Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medicinal products.** J. Food Drug Anal 8, 229-234.
2. Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J.P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., Rodríguez-Landa, J.F., 2004. **Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas.** Rev. Biomed. 15, 123-136.
3. Bankova, V., 2005. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization.** Journal of Ethnopharmacology 100, 114-117.
4. Peña, R., 2008. **Propolis standardization: a chemical and biological review.** Ciencia e Investigación Agraria 35, 11-20.
5. Choudhari, M., Punekar, S., Ranade, V., Paknikar, K., 2012. **Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona sp.*) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India.** Journal of Ethnopharmacology 141, 363-367.
6. González-Acereto, J.A., Quezada-Euán, J.J., 2010. **Producción tradicional de miel: abejas nativas sin aguijón (trigonas y meliponas).** Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán, 382-384.
7. Quezada-Euán, J.J., de Jesús May-Itzá, W., González-Acereto, J.A., 2001. **Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development.** Bee World 82, 160-167.
8. Quezada-Euán, J.J., 2005. **Biología y Uso de las Abejas sin Aguijón de la Península de Yucatán, México (*Hymenoptera: Meliponini*).** Universidad Autónoma de Yucatán, 15-23.
9. Michener, C.D., 2000. **The bees of the world.** The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, 570-575.
10. Roubik, D.W., 1989. **Ecology and Natural History of Tropical Bees.** Cambridge Univ. Press, New York, 4-15.

11. Ayala, R., 1999. **Revisión de las abejas sin aguijón de México (*Hymenóptera: Apidae: Meliponini*)**. *Folia Entom. Mex.* 106, 1-123.
12. Baquero, L., 2007. **Cría y manejo de abejas sin aguijón**. Ediciones subtrópico, 8-18.
13. Castaldo, S., Capasso, F., 2002. **Propolis, an old remedy used in modern medicine**. *Fitoterapia* 73, 1-6.
14. Stearman, A.M., Stierlin, E., Sigman, M.E., Roubik, D.W., Dorrien, D., 2008. **Stradivarius in the Jungle: Traditional Knowledge and the Use of “Black Beeswax” Among the Yuquí of the Bolivian Amazon**. *Human Ecology* 36, 149–159.
15. Barth, O.M., 2006. **Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of *Meliponinae* in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil**. *Apiacta* 41, 71–85.
16. Bankova, V., 2005. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization**. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 114-117.
17. Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. **Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?**. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 253-260.
18. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin**. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 235-240.
19. Paulino, N., Dantas, A.P., Bankova, V., Longhi, D.T., Scremin, A., de Castro, S.L., Calixto, J.B., 2003. **Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits *in vitro* contraction of airway smooth muscle**. *Journal of Pharmacological Sciences* 93, 307-313.
20. Hu, F., Hepburn, H.R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S.E., Daya, S., 2005. **Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models**. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 276-283.

21. Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Ikegaki, M., Sattler, A., 1999. **Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats.** *Caries Research* 33, 393-400.
22. Koo, H., Gomes, B.P., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M., Park, Y.K., Cury, J.A., 2000. **In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens.** *Archives of Oral Biology* 45, 141-148.
23. Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W.H., 2002. **Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46, 1302-1309.
24. Scazzocchio F., D'Auria, F.D., Alessandrini, D., Pantanella, F., 2006. **Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis.** *Microbiological Research* 161, 327-333.
25. Kumazawa, S., Ueda, R., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., Nakayama, T., 2007. **Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7722-7725.
26. Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. **Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 5434-5440.
27. Pereira, A.L., Bicalho, B., Aquino-Neto, F.R., 2003. **Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*.** *Apidologie* 34, 291-298.
28. Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., 2000. **Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae.** *Z Naturforsch [C]* 55, 785-789.
29. Bankova, V., Popova, M., 2007. **Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds.** *Pharmacog Rev* 1, 88-92.
30. 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., 2012. **Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory**

- hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α .** *Journal of Ethnopharmacology* 43, 709-715.
31. Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Cogulu, D., Gencay, O., Salih, B., 2005. **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.** *Microbiological Research* 160, 189-195.
32. Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. **Origin and chemical variation of Brazilian propolis.** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2, 33-38.
33. Marcucci, M.C., 1995. **Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity.** *Apidologie* 26, 83-99.
34. Bankova, V., De Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin.** *Apidologie* 31, 3-15.
35. Pino, J., Marbot, R., Delgado, A., Zumárraga, C., Sauri, E., 2006. **Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán.** *Journal of Essential Oil Research* 18, 53-56.
36. Burdock, G.A., 1998. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis).** *Food Chem Toxicol* 36, 347-363.
37. Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.G., 2002. **Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results.** *Z Naturforsch [C]* 57, 530-533.
38. Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H., Paulino, N., 2001. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.** *Journal of Ethnopharmacology* 74, 105-112.
39. Cuesta-Rubio, O., Cuellar, A.C., Rojas, N., Castro, H.V., Rastrelli, L., Aquino, R., 1999. **A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis.** *Journal of Natural Product* 62, 1013–1015.
40. Christov, R., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Delgado-Tejera, A., 1999. **Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands.** *Fitoterapia* 70, 89–92.

41. Muñoz, O., Peña, R.C., Ureta, E., Montenegro, G., Caldwell, C., Timmermann, B.N., 2001. **Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral.** *Z Naturforsch [C]* 56, 273-277.
42. Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., Garbarino, J.A., 2004. **Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines.** *Life Sciences* 76, 545-558.
43. Araújo, M.J., Mattar, N.S., Reis, A.S., Serra, I.C., Fialho, E.M., Assunção, A.K., Dutra, R.P., Nogueira, A.M., Libério, S.A., Guerra, R.N., Lopes, A.S., Ribeiro, M.N., Nascimento, F.R., 2011. **Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays.** *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 25, 1037-1046.
44. Abreu, B.V.B., Batista, M.C.A., Azevedo, C.C., Dutra, R.P., Nogueira, A.M.C., Costa, M.C.P., 2006. **Quantificação de polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no cerrado maranhense.** *Revista de Ciências da Saúde* 8, 18-24.
45. Dutra, R.P., Nogueira, A.M.C., Marques, R.R.O., Costa, M.C.P., Ribeiro M.N.S., 2008. **Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da baixada maranhense.** *Rev Bras Farmacogn* 18, 557-562.
46. Miorin, P.L., Levy-Junior, N.C., Custodio, A.R., Bretz, W.A., Marcucci, M.C., 2003. **Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Applied Microbiology* 95, 913-20.
47. Tomás-Barberán, F., García-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F., 1993. **Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela.** *Phytochemistry* 34, 191–196.
48. Vas, G., Vekey, K., 2004. **Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis.** *J. Mass Spectrom* 39, 233–254.

49. Peñalver-Hernando, A., 2002. **Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental**. Universitat Rovira I Virgili Departament de Química Analítica i Química Orgànica, 10-38.
50. Hinshaw J.V., 2003. **Solid-Phase Microextraction**. LC•GC Europe, 1-4.
51. Sanchez-Palomo, M., 2005. **Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC–MS**. *Talanta* 66, 1152–1157.
52. Hiroyuki, K., 2000. **Applications of solid-phase microextraction in food analysis**. *Journal of Chromatography A* 880, 35–62.
53. Harris, D.C., 1999. **Análisis Químico Cuantitativo**. 2ª Edición. Barcelona, España: Editorial Reverte, 596-599.
54. Pisseri, F., 2008. **Essential oils in medicine: principles of therapy**. *Parassitologia* 50, 89-91.
55. Edris, A.E., 2007. **Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review**. *Phytother. Res* 21, 308-23.
56. Pauli, A., Schilcher, H., 2010. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**, editado por K.H.C. Baser y G. Buchbauer (Taylor & Francis, Boca Raton, 2010)
57. Pawliszyn, J., 2000. **Applications of solid-phase microextraction in food analysis**. *Journal of Chromatography A* 880, 35-62.
58. Gholivand, B.M., Piryaei, M., Abolghasemi, M.M., Maassoumi, S.M., 2013. **Rapid analysis of volatile components from *Teucrium polium* L. by nanoporous silica-polyaniline solid phase microextraction fibre**. *Phytochemical Analysis* 24, 69-74.
59. Comunicación personal, M. V. Z. Ángel López Ramírez.
60. Santos, F.A., Bastos, E.M.A., Uzeda, M., Carvalho, M.A.R., Farias, L.M., Moreira, E.S.A., Braga, F.C., 2002. **Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria**. *Journal of Ethnopharmacology* 80, 1–7.

61. Rivero-Cruz, J.F., 2012. **Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections.** *Journal of Ethnopharmacology* 141, 860–865.
62. Adams, R., 2007. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry.** 4th Ed. Biology Department. Baylor University.
63. Yeon-Suk, L., Junheon, K., Sang-Gil, L., Eunsung, O., Sang-Chul, S., Il-Kwon, P., 2009. **Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi.** *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93, 138-143.
64. Tang, W., Hemm, I., Eisenbrand, G., 2000. **Estimation of human exposure to styrene and ethylbenzene.** *Toxicology* 144, 39-50.
65. Constant, M., 1997. **Headspace gas chromatography profiles of fruit flavored malt beverages using solid-phase microextraction.** *J. Am. Soc. Brew. Chem* 55, 112-118.
66. Barquero-Quirós, M., 2006. **Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases.** 1ª Edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica, 28-30.
67. Zenkevich, I., 2006. **Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation Application of the modified method of double internal standard.** *Journal of Chromatography* 1150, 117-23.
68. King, A.J., 2003. **The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).** *Environmental Geochemistry and Health* 25, 69–75.