



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“Determinación de los compuestos volátiles de propóleos y
geopropóleos mexicanos utilizando HS-MEFS/CG-EM-TOF. Evaluación
de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos sobre
bacterias de la cavidad oral.”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. AHIRA MAHALAT TORRES GONZÁLEZ

TUTOR: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA

AGOSTO 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	M. en C. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez
Vocal	Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
Vocal	Dra. María Alejandra Rojas Molina
Secretario	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 111 del Conjunto E, Departamento de Farmacia. Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México, D.F.

Dr. José Fausto Rivero Cruz
Tutor

Q.F.B. Ahira Mahalat Torres González
Sustentante

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de permanecer y brindarme el honor de realizar mis estudios mediante el Posgrado en Ciencias Químicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría en el Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas (No. Becario 273450).

Al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP), proyecto 4390-09 y al Instituto de Ciencia y Tecnología (ICYT), proyecto PICSA 10-27 por el apoyo económico.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por darme su apoyo para la realización de este trabajo; así como a los miembros del jurado asignado: Dra. Rachel Mata, M. en C. Ricardo Cárdenas, Dra. Araceli Peña, Dra. Alejandra Rojas y al Dr. Rogelio Pereda por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo de tesis y por sus valiosas observaciones y comentarios para mejorarlo.

A la Dra. Patricia Severiano Pérez por su asesoría y ayuda para el desarrollo del análisis estadístico APC en las muestras de propóleos recolectados para su comparación señalado en el presente proyecto.

A la Dra. Isabel Aguilar por todos sus consejos y su ayuda brindada en el laboratorio; así como a la Q. Georgina Duarte por permitirme trabajar en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) para la realización del trabajo experimental para la microextracción en fase sólida y por su ayuda en los análisis de CG-EM; por su gran apoyo a lo largo de mi carrera, sus pláticas y sobre todo, por sus valiosos consejos y por ser una amiga para mí en todo momento.

A los M. en C. Eduardo Marambio Dennett y Nayeli López Balbiaux, así como al Dr. Tomás Rocha Rinza, porque siempre los recordaré con un especial afecto.

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mis padres y mis hermanas, por toda la ayuda que me han brindado, por apoyarme en las decisiones que he tomado y sobre todo, por estar ahí sin importar que en ocasiones no lo merezca. A mis tíos, María Luisa y Adolfo, por haberme permitido estar con ellos, por tratarme como una hija, por todas esas charlas y el cariño que siempre me han demostrado.

A mis BFFs: Cesia y Ana, por estar siempre conmigo desde hace trece años; a Mabelle y Valentina, porque desde la prepa se convirtieron en la mejor compañía que pude haber tenido. Simplemente no existen palabras para agradecer lo que cada una de ustedes ha hecho por mí y siempre estaré en deuda con ustedes hasta el último día de mi vida.

A mis amigos de la Facultad y del Posgrado que siempre me dieron su apoyo; especialmente a Bere, Andrea, Jairo y Helena, porque estuvieron en cada momento estresante y feliz de la carrera, porque tuve la fortuna de haber compartido con ustedes esta etapa tan importante para mí. Por hacer la estancia en el conjunto más comfortable, gracias a Alberto, Ale, Alejandro, Gonzalo, Jessica, Laura, Pepe, Vinissa, Yaz y demás.

Al "Queso Azul" por ser unos amigos increíbles, porque con ustedes me doy un respiro y espero que esas reuniones duren mil años. A Rodrigo ("Chango"), por haberse convertido en un gran confidente y un gran amigo, por esas pláticas que sólo tú y yo sabemos y que no las cambiaría por nada. A Ariel y Fer, por darme todos esos consejos que siempre voy a agradecer. A Belmont, porque sé que siempre podré contar contigo sin importar la situación.

Y sobre todo, a Adrián, por ser un gran amigo, por estar conmigo en esos momentos difíciles y aguantarme en mis dramas, por convertirse en la persona a quien tanto admiro y que espero algún día llegar a ser, aunque sea la mitad de lo que tú eres. Ojalá me permitas seguir conociendo a ese ser tan increíble que veo y que no te das cuenta de ello.

Congresos

Los resultados del presente trabajo fueron presentados en la modalidad de cartel bajo el título "Estudio químico y biológico de propóleos mexicanos" en la Semana de la Investigación en la Facultad de Química llevado a cabo en el mes de agosto del 2013.

Participación como coautora con el trabajo titulado "Análisis por SPME-CG-EM-TOF y caracterización de compuestos volátiles (Índices de retención Kovats y Espectrometría de Masas) de una muestra de propóleo de abejas Meliponas del Estado de Veracruz" en la modalidad de cartel en la 9ª. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales en Pachuca de Soto, Hidalgo en el mes de mayo del 2013.

El presente trabajo fue presentado en la modalidad de cartel bajo el título "Determinación de los compuestos volátiles de propóleos y geopropóleos mexicanos utilizando HS-MEFS/CG-EM-TOF. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos sobre bacterias de la cavidad oral" en la 10ª. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales en Mérida, Yucatán llevado a cabo en mayo del 2014.

Participación como coautora con el trabajo titulado "Composición química de propóleos recolectados en la zona melífera del altiplano mexicano" en la modalidad de cartel en la 10ª. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales en Mérida, Yucatán llevado a cabo en mayo del 2014.

A la memoria de Adolfo Huidobro, amigo y amado tío...

"Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up".

- Stephen William Hawking

Índice.

Lista de Abreviaturas.....	III
Lista de Figuras.....	IV
Lista de Cuadros.	VI
Abstract.	1
Resumen.....	2
1. Introducción.	4
2. Antecedentes.....	5
2.1 Propóleo.	5
2.1.1 Definición y generalidades.	5
2.1.2 Formación del propóleo.	6
2.1.3 Tipos de propóleos.	8
2.1.4 Composición química.	10
2.1.5 Aspectos históricos.	13
2.1.6 Usos en la medicina tradicional.....	14
2.1.7 Actividad antimicrobiana.	15
2.2 Biocapas.	17
2.2.1 Definición y generalidades.	17
2.2.2 Etapas de formación de la biopelícula dental.....	18
2.3 Microextracción en fase sólida.....	19
2.4 Principios de la Cromatografía.....	21
2.4.1 Cromatografía de Gases.....	21
2.4.2 Espectrometría de Masas.	21
2.4.3 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM).....	22
3. Justificación y Objetivos.....	23
4. Parte Experimental.	25
4.1 Material vegetal.	25
4.2 Microextracción en Fase Sólida (MEFS).	25
4.2.1 Materiales y Equipo.	25
4.2.2 Estándares.	26
4.2.3 Reactivos.....	26
4.2.4 Selección de parámetros para la optimización de la MEFS.	26
4.2.4.1 Selección de la fase de la fibra.....	26
4.2.4.2 Perfil del tiempo de extracción.....	27
4.2.4.3 Selección de la temperatura de extracción.....	27
4.2.4.4 Selección de la cantidad de muestra.....	27
4.2.4.5 Efecto de la fuerza iónica.	27
4.3 Análisis Cromatógráfico.	28
4.4 Identificación de los compuestos volátiles.	30
4.5 Análisis estadístico.	31
4.6 Evaluación de la actividad biológica.	31
4.6.1 Actividad antimicrobiana.	31
4.6.1.1 Microorganismos de prueba.....	31
4.6.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	31
4.6.2 Inhibición de la formación de biocapa por <i>Streptococcus mutans</i>	32

5. Resultados y Discusión.	34
5.1 Selección de parámetros para la HS-MEFS.....	34
5.1.1 Selección de la fase de la fibra.	34
5.1.2 Perfil del tiempo de extracción.....	35
5.1.3 Selección de la temperatura de extracción.....	37
5.1.4 Selección de la cantidad de muestra.	38
5.1.5 Efecto de la fuerza iónica.	40
5.2 Identificación de los compuestos volátiles de los propóleos.....	42
5.3 Análisis estadístico.	51
5.3.1 Análisis de Componentes Principales.	51
5.3.1.1 Evaluación de los ésteres volátiles.....	51
5.3.1.2 Resultados de la evaluación de los compuestos volátiles de naturaleza terpenoide.	54
5.3.1.3 Resultados de la evaluación de ésteres y terpenoides.	57
5.3.2 Análisis de Cluster.	61
5.4 Evaluación de la actividad biológica.	64
5.4.1 Actividad antimicrobiana (CMI).	64
5.4.2 Inhibición de la formación de biocapa por <i>Streptococcus mutans</i>	65
6. Conclusiones.....	67
7. Perspectivas.....	69
8. Bibliografía.	70
Anexos.....	81

Lista de Abreviaturas.

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
ACP	Análisis de Componentes Principales
AIC	Cromatograma Iónico Analítico
ANOVA	Análisis de Varianza
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CAR/PDMS	Carboxen/Polidimetilsiloxano
CG	Cromatografía de Gases
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CP	Componente Principal
DE	Desviación Estándar
DMS	Comparación Múltiple de Medias
DVB/CAR/PDMS	Divinilbencen/Carboxen/Polidimetilsiloxano
EEP	Extractos Etanóicos del Propóleo
EM	Espectrometría de Masas
eV	Electronvoltio
g	Gramos
GTF	Glucosiltransferasa
IE	Ionización Electrónica
IR	Índice de Retención de Kovats
m	Metro
m/m	Relación masa/masa
MEFS	Microextracción en Fase Sólida
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
PDMS	Polidimetilsiloxano
s	Segundo
TOF	Tiempo de Vuelo
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
uma	Unidad de masa atómica
U.R.S.S.	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas

Lista de Figuras.

- Figura 1** Muestras de propóleos recolectadas en diferentes zonas del Distrito Federal.
- Figura 2** Abeja realizando la propolización.
- Figura 3** Patrones quimiogeográficos de los tipos de propóleos.
- Figura 4** Gráfico de pastel donde se representa la composición química del propóleo.
- Figura 5** Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión.
- Figura 6** Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa o headspace.
- Figura 7** Microextracción en fase sólida de una muestra de propóleo por el método de *headspace*.
- Figura 8** Equipo acoplado CG-EM-TOF utilizado (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM).
- Figura 9** Esquema de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano.
- Figura 10** Esquema de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo de inhibición de la biocapa.
- Figura 11** Cromatograma iónico analítico (AIC) para la selección de las fibras de las microextracciones (Azul: Fibra PDMS, Verde: Fibra CAR-DVB-PDMS y Rojo: Fibra CAR-PDMS).
- Figura 12** Gráfico de barras del perfil de extracción para los diferentes tiempos para la HS-MEFS/CG-EM-TOF del propóleo.
- Figura 13** Cromatograma iónico analítico (AIC) del perfil de los tiempos de extracción para el propóleo (Azul: 10 min, Verde: 15 min, Rojo: 20 min y Amarillo: 30 min).
- Figura 14** Selección de la temperatura de extracción para la HS-MEFS/CG-EM-TOF del propóleo.
- Figura 15** Cromatograma iónico analítico (AIC) para la selección de la temperatura de extracción para el propóleo (Azul: 45 °C, Rojo: 50 °C y Verde: 70 °C).
- Figura 16** Selección de la cantidad de muestra del propóleo para la HS-MEFS/CG-EM-TOF.
- Figura 17** Cromatograma iónico analítico (AIC) para la selección de la cantidad de muestra de propóleo para la microextracción (Verde: 0.5 g, Azul: 1 g y Rojo: 2 g).
- Figura 18** Efecto de la fuerza iónica en la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF para el propóleo.
- Figura 19** Cromatograma iónico analítico (AIC) del efecto de la fuerza iónica en la microextracción (Azul: 30 %, Verde: 50 % y Rojo: 100 % respecto a la cantidad de muestra).
- Figura 20** Espectros de masas del canfeno (Arriba: Espectro obtenido experimentalmente. Abajo: Espectro obtenido de la librería.).
- Figura 21** Comparación del cromatograma de los estándares empleados (color azul) con el cromatograma obtenido del propóleo proveniente del apiario Don Nico (color verde) para la obtención de los índices de Kovats.

Lista de Figuras (continuación).

- Figura 22** Diagrama de análisis de componentes principales (ACP) de ésteres.
- Figura 23** Diagrama de análisis de componentes principales (ACP) de compuestos terpenoides.
- Figura 24** Diagrama de análisis de componentes principales (ACP) de ésteres y terpenoides.
- Figura 25** Dendograma del análisis por cluster para las muestras de propóleo con base en el contenido de compuestos alifáticos, aldehídos y terpenoides.
- Figura 26** Dendograma del análisis por cluster para las muestras de propóleo con base en el contenido de compuestos alifáticos, aldehídos, alcoholes, cetonas y ésteres.
- Figura 27** Dendograma del análisis por cluster para las muestras de propóleo con base en el contenido de cetonas, ésteres y terpenoides.
- Figura 28** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Acuexcómatl" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 29** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Bonilla" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 30** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Don Nico" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 31** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Israel" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 32** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Mellipona" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 33** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Panteón" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 34** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Scaptotrigona" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 35** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Tepenáhuatl" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 36** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Trojes" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.
- Figura 37** Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Valentín" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

Lista de Cuadros.

Cuadro 1. Tipos de propóleos de acuerdo a su patrón quimiogeográficos.

Cuadro 2. Estructuras químicas de algunos compuestos representativos aislados a partir de propóleos.

Cuadro 3. Actividades biológicas del propóleo.

Cuadro 4. Muestras de propóleo analizadas.

Cuadro 5. Fibras empleadas para el análisis de la microextracción en fase sólida.

Cuadro 6. Condiciones de análisis optimizadas.

Cuadro 7. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.

Cuadro 8. Testigos empleados para la determinación de la CMI.

Cuadro 9. Condiciones establecidas para la microextracción de las muestras.

Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF en las muestras de propóleos.

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo.

Cuadro 12. Contribución de los componentes a la varianza original.

Cuadro 13. Matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos

Cuadro 14. Contribución de los componentes a la varianza original.

Cuadro 15. Matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos.

Cuadro 16. Contribución de los componentes a la varianza original.

Cuadro 17. Matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos.

Cuadro 18. Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos.

Abstract.

In this study, an efficient, simple, rapid and solvent-free method for the analysis of volatile compounds based on headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed. On the other hand, GC-MS combined with PCA could successfully distinguish the representative volatile compounds of raw propolis samples from four different geographical regions of Mexico. Furthermore, the antibacterial and antibiofilm activities of ethanol extracts prepared from the different samples of propolis were determined.

The HS-SPME procedure, whose experimental parameters were properly optimized, like: extraction temperature, extraction time, sample volume and ion strength, was carried out using 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (1 cm), 100 μm PDMS (1 cm) and 75 μm CAR/PDMS (1 cm) fibers. The GC-MS analyses were performed on a DB-5 MS cross-linked 5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane capillary column (10 m \times 0.18 mm i.d.; 0.18 μm film thickness), under programmed-temperature elution. PCA based on the data HS-SPME/GC-MS-TOF was used to identify the important volatile compounds contributed for the differentiation of the propolis samples. The effect of EEP on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguinis* growth were analyzed by the microdilution plating method. *Streptococcus mutans* biofilm formation was executed by the crystal violet binding assay.

One hundred forty constituents were identified from ten different samples using HS-SPME/GC-MS-TOF. The most relevant volatile components found at 70 % in the samples were terpenoids. The ethanol extracts from the studied propolis (Don Nico, Panteón and Israel) demonstrated activity against *S. mutans*, *S. oralis* and *S. sanguinis* (MIC < 1 mg/mL) at different levels. However, EEP from Don Nico (27.6 % \pm 1.2 %), Israel (51.0 % \pm 2.1 %) and Panteón (25.7 % \pm 0.7 %) reduced the biofilms formation at concentrations 1 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1 mg/mL, respectively.

The HS-SPME/GC-MS technique applied to the raw samples of propolis allowed the obtaining of the volatile compounds profiles for the characterization of this Mexican product. These findings indicate that propolis and/or their compounds are biofilms inhibitor agents and they have promising antimicrobial activity.

Resumen.

En este estudio, se desarrolló un método eficiente, simple, rápido y libre de disolventes para el análisis de los compuestos volátiles de diferentes muestras de propóleos mediante la microextracción en fase sólida en la fase gaseosa (HS-MEFS) seguida de la técnica acoplada cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Por otra parte, la CG-EM combinada con el ACP permitió la distinción de los compuestos volátiles representativos de las muestras de propóleos de cuatro regiones geográficas de México. Asimismo, se determinó la actividad antibacteriana y antibocapa de los extractos etanólicos preparados a partir de las diferentes muestras de propóleo.

Para llevar a cabo el procedimiento de HS-MEFS, se optimizaron los parámetros de: la temperatura de extracción, el tiempo de extracción, la cantidad de muestra y la fuerza iónica, utilizando las fibras 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (1 cm), 100 μm PDMS (1 cm) and 75 μm CAR/PDMS (1 cm). Los análisis de CG-EM se realizaron en una columna capilar entrecruzada 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano "DB-5" (10 m \times 0.18 mm i.d.; 0.18 μm espesor de la película) bajo temperatura programada. El análisis de ACP se empleó para los resultados obtenidos con la HS-MEFS/CG-EM-TOF con la finalidad de identificar los compuestos volátiles más importantes que contribuyeron a la diferenciación de las muestras de propóleo. Los efectos de los extractos etanólicos sobre el crecimiento de las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* se evaluó mediante el método de microdilución en placa. El ensayo de formación de la biocoapa de *Streptococcus mutans* se realizó a través del ensayo de unión al cristal violeta.

Ciento cuarenta compuestos fueron identificados de las diez muestras recolectadas mediante HS-MEFS/CG-EM-TOF. Los compuestos volátiles más relevantes encontrados con un porcentaje del 70 % del total de compuestos identificados, fueron de naturaleza terpenoide. Los extractos etanólicos de los propóleos (Don Nico, Panteón e Israel) fueron activos contra *S. mutans*, *S. oralis* y *S. sanguinis* (CMI < 1 mg/mL) a diferentes niveles. Sin embargo, el efecto inhibitorio de los extractos de Don Nico (27.6 % \pm 1.2 %), Israel (51.0 % \pm 2.1 %) y Panteón (25.7 % \pm 0.7 %) se detectó a concentraciones de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente, lo

cual indica que estos extractos pueden ser utilizados para desarrollar agentes inhibidores de la biocapa.

La técnica acoplada HS-MEFS/CG-EM aplicada a las muestras de propóleo fue de gran utilidad, ya que permitió la obtención del perfil de los compuestos volátiles para la caracterización de este producto mexicano. Estos hallazgos indican que el propóleo y/o sus compuestos son agentes inhibidores de la biocapa y que tienen actividad antimicrobiana prometedora.

1. Introducción.

El uso de productos naturales con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. 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 (Mitscher *et al.*, 2000). 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, etcétera.

El propóleo es un material multifuncional utilizado por las abejas para la construcción, el mantenimiento y la protección de sus colmenas. Desde el punto de vista químico, el propóleo se compone por 50 % de resinas y bálsamos vegetales; 30 % de ceras; 10 % de aceites esenciales y aromáticos; 5 % de polen y 5 % de otras sustancias (Cheng *et al.*, 2013).

Debido a su popularidad la medicina tradicional, se ha convertido en el tema de intensos estudios farmacológicos y químicos de los últimos 30 años (Cheng *et al.*, 2013). La fracción volátil de los propóleos deriva del tipo de flora, así como de los hábitos y de la fisiología de las abejas productoras (Montenegro *et al.*, 2009). Es por ello que la identificación de los compuestos volátiles del propóleo es de gran importancia debido a las propiedades farmacológicas que se les han reportado.

En este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que consiste en la identificación de los compuestos volátiles derivados de diferentes muestras de propóleo utilizando la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF. Asimismo, se evaluará su efecto sobre el crecimiento y la formación de biocapas producidas por bacterias de la cavidad oral.

2. Antecedentes.

2.1 Propóleo.

2.1.1 Definición y generalidades.

El propóleo es un producto natural procesado por las abejas y utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades (Lotti *et al.*, 2010). La palabra propóleo proviene del griego *propolis* (pro- defensa, polis- comunidad o ciudad) que significa "defensa de la comunidad o de la ciudad". Es una sustancia resinosa que varía en su color, de amarillo claro a marrón, dependiendo de la cantidad de compuestos florales y de resinas arbóreas (Jaganathan & Mandal, 2009). En algunos países tropicales existe cierto tipo de abejas sin aguijón que recolectan el material resinoso de las plantas, lo mezclan con cera de abeja y componentes del suelo para formar el geopropóleo (Castaldo & Capasso, 2002); término que es utilizado para distinguir entre el producto producido por las abejas sin aguijón del propóleo producido por las abejas del género *Apis mellifera* (Stearman *et al.*, 2008).

El propóleo físicamente puede describirse como una sustancia dura y quebradiza a bajas temperaturas; sin embargo, si se calienta levemente se torna maleable y viscoso; como se ilustra en la **Figura 1**, su coloración varía del amarillo-verdoso a marrón oscuro, lo cual se debe básicamente a las fuentes vegetales y a su antigüedad (Burdock, 1998). Generalmente, posee un sabor acre; aunque a veces es amargo y tiene un aroma semejante al de la miel debido a sus componentes volátiles presentes. Su punto de fusión oscila entre 60-70 °C, aunque en algunos casos puede llegar hasta 100 °C (Lotfy, 2006).



Figura 1. Muestras de propóleos recolectadas en diferentes zonas del Distrito Federal.

Las abejas utilizan ampliamente el propóleo en actividades que van desde la construcción, reparación y protección de la colmena, además de ser el agente responsable de la sanidad de la misma (Salomao *et al.*, 2008). Debido a que las colonias de las abejas se encuentran tan confinadas, las enfermedades suelen esparcirse muy fácilmente dentro de la colmena; sin embargo, estos insectos encuentran en el propóleo un potente antibiótico que es capaz de reducir el crecimiento microbiano que puede llegar a presentarse sobre las paredes de la colmena. Por otro lado, el propóleo funciona como un material impermeable que proporciona protección contra las corrientes de aire y ayuda a mantener una humedad constante dentro de la colmena (Seeley & Morse, 1976; Simone-Finstrom & Spivak, 2010).

2.1.2 Formación del propóleo.

La formación del propóleo comienza con la recolección de las resinas por las abejas recolectoras. El material disponible que tienen las abejas para la formación del propóleo, se produce mediante una gran variedad de procesos botánicos en las diferentes partes de la planta y puede ser clasificado en dos grupos dependiendo del tipo de secreción. En el primero, se encuentran las sustancias que son secretadas activamente por las plantas; y en el segundo, las sustancias que son exudadas mediante grietas en la corteza de la planta, como el material lipofílico, los mucílagos, las gomas y resinas, entre otros (Bankova *et al.*, 2000).

Las abejas extraen las resinas de los tricomas (abultamientos epidérmicos de las plantas) y de los ductos mediante la fragmentación de las hojas pequeñas con sus mandíbulas (**Figura 2**). De manera general, el proceso de recolección comprende las siguientes etapas: En primer lugar, las abejas desprenden una parte de la resina con la mandíbula, después la procesan y la sujetan con las patas delanteras hasta transferirla a su media pata. Por último, la transfieren a un órgano especializado de transporte que se encuentra en las patas de las abejas denominadas corbícula. La secuencia se repite hasta que ambas corbículas estén totalmente cargadas de resina.

Una vez que la abeja ha reunido una cantidad suficiente de resina, regresa a su colmena para descargarla en los sitios en donde el panal necesita propóleo.

Posteriormente, la abeja recolectora espera a otras, conocidas como abejas de cementación; que se encargan de suavizar la resina con sus mandíbulas. Durante la colecta y el procesamiento de las resinas, los compuestos presentes en éstas son modificados químicamente; finalmente las resinas son mezcladas con ceras para producir el propóleo (Farré *et al.*, 2004; Simone-Fisntrom & Spivak, 2010).

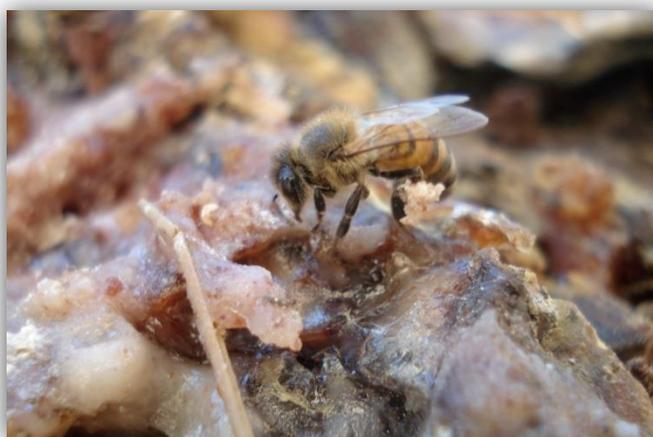


Figura 2. Abeja realizando la propolización.

Las abejas emplean este material para recubrir las paredes de la colmena, reparar paneles, cerrar rendijas, agrietamientos, y las fracturas que puedan existir en ella. Se cree que las abejas buscan mantener un ambiente hermético que conserve la humedad del interior (Funari & Ferro, 2006). Sin embargo, el propóleo no sólo es un material de construcción, también se le pueden atribuir otras funciones tales como:

- Mantener la colmena libre de bacterias y hongos patógenos.
- Regular la temperatura en el interior de la colmena
- Evitar la entrada de otros organismos.
- Momificar a intrusos que logran entrar a la colmena (Castaldo & Capasso, 2002).

2.1.3 Tipos de propóleos.

Durante los últimos 40 años, numerosas investigaciones han sido publicadas acerca de la composición química, la actividad biológica, la farmacología y usos terapéuticos del propóleo; los cuales han concluido que todas estas actividades dependen básicamente de su composición química, y que ésta se encuentra íntimamente ligada con la zona geográfica, la época de recolección y la raza de abeja (Bankova, 2005). En la **Figura 3**, se presentan los cinco patrones quimiogeográficos de los tipos de propóleos a nivel mundial; los cuales se clasifican en propóleos poplares o de climas templados, propóleos verdes o de climas tropicales, propóleos derivados de *Clusia*, propóleos derivados de *Macaranga* o de la región del Pacífico y propóleos de las regiones orientales del Mediterráneo.

Las abejas de la misma colonia visitan plantas de diferentes especies, pero se ha observado una marcada preferencia por algunas fuentes de resinas; esto se ejemplifica en el **Cuadro 1** en donde se presentan los tipos de propóleos y sus componentes principales (Salatino *et al.*, 2011).



Figura 3. Patrones quimiogeográficos de los tipos de propóleos.

Cuadro 1. Tipos de propóleos de acuerdo a su patrón quimiogeográficos.

Zona Geográfica	Región	Clima	Fuente vegetal	Composición
I	Hemisferio norte y sur	Clima templado o poplar	Exudados de las yemas apicales de las especies de <i>Populus</i> principalmente <i>P. nigra</i>	Flavonoides sin sustituyentes en el anillo B, ácidos fenilpropanoides y sus ésteres
II	Brasil	Clima tropical o de tipo verde	Yemas vegetativas de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	Fenilpropanoides prenilados, ácidos caféico y quínico
III	Venezuela, Cuba y algunos propóleos de Brasil	América tropical y subtropical	Exudados de las flores de <i>Clusia</i>	Benzofenonas preniladas
IV	Macaranga o de la región del Pacífico: Taiwán y Okinawa; regiones de África, como Egipto y Kenia		Exudados de la fruta de <i>Macaranga tanarius</i>	C-prenil-flavanonas
V	Regiones orientales del Mediterráneo: Grecia, Creta y Turquía		Especie <i>Cupressaceae</i> .	Diterpenoides (principalmente ácidos de tipo labdano) o antraquinonas

Como se puede observar en el cuadro anterior, los propóleos mexicanos se ubican dentro de los propóleos de clima tropical o poplares; sin embargo, es importante destacar que el territorio mexicano comprende climas y regiones muy diferentes. No obstante, en México existe una clasificación de las zonas apícolas: la región del Altiplano, la Costa del Pacífico, la región del Golfo, la región Norte y la región de la Península de Yucatán. Dentro de las cuales se ubica al Distrito Federal correspondiente a la zona del Altiplano (Lotti *et al.*, 2010).

2.1.4 Composición química.

Desde el punto de vista químico, el propóleo se compone básicamente de 50 % de resinas y bálsamos vegetales; 30 % de ceras; 10 % de aceites esenciales y aromáticos; 5 % de polen y 5 % de otras sustancias (Cheng *et al.*, 2013). Debido a esta gran complejidad, algunos autores afirman que su eficacia estaría justamente relacionada de acuerdo a su composición química heterogénea, como se ilustra en el; ya que ésta depende de la flora, el clima, la estación del año, la ubicación y el año de colecta (Salatino *et al.*, 2011). En el **Cuadro 2**, se ejemplifican algunos compuestos volátiles presentes del propóleo en diferentes regiones geográficas.

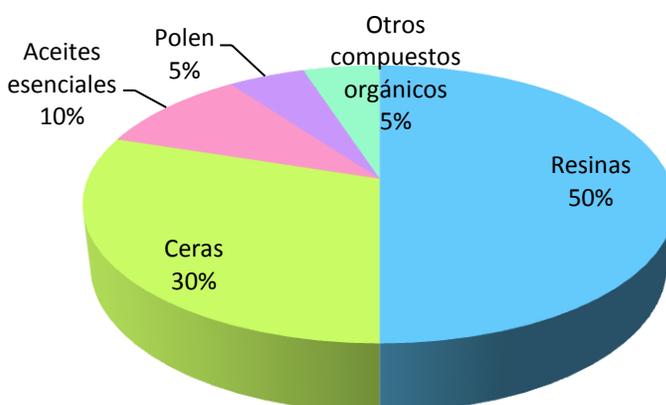


Figura 4. Gráfico de pastel donde se representa la composición química del propóleo.

Cuadro 2. Compuestos volátiles del propóleo de diferentes regiones geográficas.

Método de Identificación	Origen Geográfico	Constituyentes Principales	Referencia
DE	Albania	cadineno, metoxiacetofenona, alcohol sesquiterpeno	Bankova <i>et al.</i> , 1994
DE	Bulgaria	β -eudesmol, δ -cadineno, alcohol sesquiterpeno	Bankova <i>et al.</i> , 1994; Kujumgiev <i>et al.</i> , 1999
DE	China	α -bisabolol, 2-methyl-3-buten-2-ol, 3-metil-2-buten-1-ol	Fu <i>et al.</i> , 2009
DE	Mongolia	alcohol sesquiterpeno, benzoato de bencilo	Bankova <i>et al.</i> , 1994
DE	Brasil (abejas sin agujijón)	nerolidol, espatulenol, <i>p</i> -cimen-8-ol	Bankova <i>et al.</i> , 1999

Cuadro 2. Compuestos volátiles del propóleo de diferentes regiones geográficas (continuación).

Método de Identificación	Origen Geográfico	Constituyentes Principales	Referencia
DE	México	α -pineno, ácido hexadecanoico, <i>trans</i> -verbenol	Pino <i>et al.</i> , 2006
DE	México (abejas sin agujón)	α -pineno, β -cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno, β -burboneno	Pino <i>et al.</i> , 2006
DE	Islas Canarias	nerolidol, espatulenol, ledol	Bankova <i>et al.</i> , 1998
HD	Croacia	limoneno, alcohol bencílico, benzoato de bencilo	Melliou <i>et al.</i> , 2007
HD	República Checa	ácido benzoico, alcohol bencílico, vanillina, eugenol	Janas & Bumba, 1974
HS, HD	Grecia	α -pineno, <i>trans</i> - β -terpineol, junipeno, δ -cadineno	Melliou <i>et al.</i> , 2007
HD	Hungría	β -eudesmol, benzoato de bencilo	Petri <i>et al.</i> , 1988
HD	India	tricosano, ácido palmítico, linalol, metileugenol	Naik <i>et al.</i> , 2013
HS, HD	Italia	ácido benzoico, benzoato de bencilo, β -eudesmol, δ -cadineno, τ -cadinol, α -cadinol	Pellati <i>et al.</i> , 2013
HD	Portugal	viridiflorol, <i>n</i> -tricosano, <i>n</i> -nonadecano	Miguel <i>et al.</i> , 2013
HD	China	3-metil-2-buten-1-ol, alcohol fenietílico, 2-metoxi-4-vinilfenol	Fu <i>et al.</i> , 2009
HD	Brasil	espatulenol, (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-farnesol, prenil-acetofenona, benzoato de bencilo, β -cariofileno, acetofenona, (<i>E</i>)-nerolidol, <i>exo</i> -fenchol, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, α -pineno, <i>E</i> -cariofileno, α -copaeno, δ -cadineno, β -pineno, limoneno	Bankova <i>et al.</i> , 1998; De Albuquerque <i>et al.</i> , 2008; Marostica <i>et al.</i> , 2008; Torres <i>et al.</i> , 2008; Fu <i>et al.</i> , 2009; Ioshida <i>et al.</i> , 2010; Oliveira <i>et al.</i> , 2010; Simionatto <i>et al.</i> , 2012

Cuadro 2. Compuestos volátiles del propóleo de diferentes regiones geográficas (continuación).

Método de Identificación	Origen Geográfico	Constituyentes Principales	Referencia
HD	Etiopía	5,6,7,8-tetrametilbiciclo-[4,1,0]-hept-4-en-3-ona, acoradieno, epicedrol, calamaneno, 4-terpineol, <i>epi</i> -biciclosesquifelandreno	Haile <i>et al.</i> , 2012
SHS	Estonia	eucaliptol, α -pineno, β -pineno, benzaldehído	Kaškoniene <i>et al.</i> , 2014
SHS	China	3-metil-3-butene-1-ol, 3-metil-2-buten-1-ol, acetato de 4-penten-1-ilo, α -longipineno	Kaškoniene <i>et al.</i> , 2014
SHS	Brasil	α -pineno, β -pineno	Kaškoniene <i>et al.</i> , 2014
SHS	Uruguay	α -pineno, β -pineno, limoneno	Kaškoniene <i>et al.</i> , 2014
HS	Italia	α -pineno, D-germacren-4-ol	Pellati <i>et al.</i> , 2013
HS	Reino Unido	6-metilheptil-5-en-2-ona, benzaldehído, alcohol bencílico	Greenaway <i>et al.</i> , 1989
HS	Argentina	limoneno, <i>o</i> -cimeno	Agüero <i>et al.</i> , 2011
DHS	China	ácido acético, heptadecano, cedreno, fenantreno, alcohol bencílico, 3-metil-3-buten-1-ol alcohol feniletílico, alcohol bencílico, decanal, benzoato de etilo, cedrol, α -bisabolol, δ -cadineno, α -terpineno, junipeno, α -terpineol, β -cariofileno	Fu <i>et al.</i> , 2009; Cheng <i>et al.</i> , 2013
HS-SPME	Turquía	β -eudesmol, guayol, benzoato de bencilo	Yildirim <i>et al.</i> , 2004; Hames-Kocabas <i>et al.</i> , 2013
Extracción	Francia	farnesol, dihidroeudesmol, guayol	Clair & Peyron, 1981
SD	Polonia	nerolidol, ácido bencenopropanoico	Maciejewicz <i>et al.</i> , 1983
UAE	Brasil	longipineno, α -eudesmol, β -eudesmol, β -cariofileno	Huang <i>et al.</i> , 2013
MAE	Brasil		Li <i>et al.</i> , 2012

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

2.1.5 Aspectos históricos.

El propóleo es tan antiguo como la miel, y ha sido utilizado por el hombre desde hace siglos y se encuentra constituido por una compleja mezcla de metabolitos secundarios.

Existen registros que indican el uso del propóleo por los antiguos egipcios, persas y romanos. Los antiguos egipcios representaron abejas propolizando en vasijas y otros ornamentos, asimismo, utilizaban el propóleo para aliviar muchas dolencias. Los egipcios habían aprendido de las abejas, las cuales utilizaban el propóleo como una sustancia para embalsamar; en donde las abejas cubrían el cadáver de un invasor, que había sido asesinado pero que no pudo ser transportado fuera de la colmena, cubriéndolo con propóleo y cera; de esta manera, las abejas restringían la propagación de la infección causada por la descomposición del cadáver (Lagouri *et al.*, 2013). Derevici *et al.* (1965) demostraron que el propóleo es responsable de la menor incidencia de bacterias dentro de la colmena.

Los antiguos judíos consideraban al “*tzori*” (palabra hebrea para el propóleo) como un medicamento. *Tzori* y sus propiedades terapéuticas se mencionan en todo el Antiguo Testamento. El bálsamo de *Galaad* bíblico (*tzori Galaad*, en hebreo) es casi indistinguible del propóleo; el cual se describe en la Biblia como el regalo que la reina de Saba dio al rey Salomón (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

En Judea, se cultivaba en todo el Mar Muerto hace unos 1500 años y se hizo famoso gracias a su aroma y propiedades medicinales. El propóleo está constituido de resinas de diversas álamos, incluyendo *P. balsamifera*, *P. nigra* y *P. gileadensis*. La identificación del *bálsamo de Galaad* con los nombres hebreos *Afarsemon*, *Kataf*, *nataf* y *tzori Gilead* se puede remontar a varios sabios, entre ellos Shimon Ben-Gamliel, Rambam (Maimónides), Saadia Gaon, y el botánico bíblico moderno Yehuda Feliks (Ben-Yehoshua *et al.*, 2012) Hoy en día, el *bálsamo de Galaad* es uno de los varios componentes del incienso especial que se emplea dos veces al día en el templo sagrado en Jerusalén.

Pensadores como Aristóteles, Galeno y Dioscórides, así como médicos de culturas griegas y romanas observaron que el propóleo poseía propiedades antiinflamatorias, por lo cual fue utilizado para el tratamiento de heridas, úlceras y abscesos (Castaldo & Capasso, 2002). Asimismo entre los romanos, Plinio el Grande describió la apariencia del propóleo y sus usos, incluso menciona que es de mayor valor que la miel (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

En el siglo I a. C., Cornelius Celsus escribió el uso de una serie de sustancias que promovían la supuración en heridas abiertas o para el tratamiento de abscesos. Como parte de esta lista se encuentra el propóleo junto con la mirra y el gálbano (Kuropatnicky *et al.*, 2013). Con la llegada del Renacimiento, se retomó el uso del propóleo. En el libro titulado "Historia de las plantas", Gerard hace referencia al uso de la resina o sustancia pegajosa proveniente de los brotes de árboles poplares como parte de ungüentos. Además menciona que este ungüento sirve para cualquier inflamación y moretones, entre otros (Simone-Finstrom & Spivak, 2010).

Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterapéuticos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse, (Farré *et al.*, 2004). Es hasta el siglo XX cuando se inicia la investigación química del propóleo. Entre los investigadores que estudiaron inicialmente la composición química se encuentran Dieterich, Halfenberg, Küstenmacher, Jaubert y Rösch (Kuropatnicky *et al.*, 2013).

2.1.6 Usos en la medicina tradicional.

Como se mencionó anteriormente, desde la época antigua los egipcios consignaron el uso del propóleo para evitar la putrefacción de cadáveres (embalsamado de los muertos); los asirios describieron su importancia para tratar las infecciones y la hinchazón; los griegos y romanos lo empleaban como un agente antiséptico y cicatrizante, y los incas como agente antipirético. En el siglo XVII, aparece señalado en la farmacopea inglesa como un medicamento oficial, y en el siglo

XX describen su utilidad durante la Segunda Guerra Mundial para curar las heridas en la ya desaparecida U.R.S.S.

A partir de 1980, su empleo en la medicina alternativa se ha incrementado de manera significativa, y se ha documentado su uso para prevenir varias enfermedades; tales como la diabetes, el cáncer, las disfunciones cardiovasculares y como agentes regenerantes en aplicaciones tópicas (Sforcin & Bankova, 2011).

Actualmente, la literatura farmacológica ha documentado su actividad antiséptica, antimicótica, antiviral, antiinflamatoria, anestésica, antioxidante, inmunoestimulante, antiulcerosa, hipotensiva e hipocolesterolemia. Además, es empleado para aliviar varios tipos de dermatitis mediante su aplicación tópica; para la prevención de caries y el tratamiento de la gingivitis y la estomatitis (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Sforcin & Bankova, 2011).

2.1.7 Actividad antimicrobiana.

Estudios previos han demostrado la eficacia del propóleo sobre el control del crecimiento de bacterias Gram positivas como: *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Corynebacterium spp.*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus critecus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus sobrinus*; y sobre bacterias Gram negativas, entre las que se encuentran: *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella ozaemae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella paratyphi-A*, *Salmonella paratyphi-B*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* (Bogdanov, 2012).

Por otra parte, extractos provenientes de propóleos demostraron actividad contra *Candida albicans*, *Microsporum sp.*, *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum* (Farré *et al.*, 2004; Castaldo & Capasso, 2002). También, presentan actividad contra los virus del VIH, herpes, de las influencias tipo A y B y de la viruela (Castaldo & Capasso, 2002). Los principales componentes con actividad antimicrobiana presentes

en los propóleos son flavonoides, ácido fenólico y sus ésteres (Marcucci, 1996; Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin & Bankova, 2000). Sin embargo, se ha descrito que propóleos provenientes de zonas tropicales que no contienen compuestos de este tipo presentan una actividad antimicrobiana similar, lo que indica que otras sustancias en el propóleo presentan esta actividad.

A continuación en el **Cuadro 3** se señalan las diferentes actividades atribuidas al propóleo.

Cuadro 3. Actividades biológicas del propóleo.

Actividad antiangiogénica	Extractos de propóleo verde con artepillina C y CAPE reducen significativamente la cantidad de nuevos vasos sanguíneos formados y la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (Keshavarz <i>et al.</i> 2009).
Actividad antifúngica	Sensibilidad de cepas de <i>Candida</i> en el orden siguiente: <i>C. albicans</i> > <i>C. tropicalis</i> > <i>C. krusei</i> > <i>C. guilliermondii</i> (Ota <i>et al.</i> 2001)
Actividad antiinflamatoria	El propóleo evita la generación de prostaglandinas y leucotrienos mediante la inhibición de la expresión y actividad de las ciclooxigenasas 1 y 2 y de las lipooxigenasas (Mirzoeva & Calder, 1996)
Actividad antiprotozoaria y antiparasitaria	Extractos de propóleo mostraron actividad inhibitoria contra <i>Trypanosoma cruzi</i> y fueron letales contra <i>Trichomonas vaginalis</i> (Higashi & De Castro, 1995; Starzyk <i>et al.</i> , 1977)
Actividad antitumoral	La administración de propóleo en la dieta llevó a la disminución de la incidencia y multiplicación de carcinomas mamarios; y del propóleo taiwanés se aislaron dos prenilflavanonas que inducen la apoptosis de células de melanoma humano (Chia-Nana <i>et al.</i> 2004).
Actividad antiulcerosa	El propóleo búlgaro sobre bacterias causantes de úlceras y encontraron que la actividad de este, comparada con el control, tiene considerable actividad contra <i>Helicobacter pylory</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i> (Boyanova <i>et al.</i> 2003).
Actividad antiviral	La quercetina, el kaempferol, el CAPE y el cafeato isoprenilado, interfieren en la replicación del virus de inmunodeficiencia humana, por medio de la inhibición de la enzima integrasa (Fesen <i>et al.</i> , 1993, Xu <i>et al.</i> , 2000).
Actividad cardioprotectora	Disminuye el colesterol total en ratones. Inhibe la agregación plaquetaria y el nivel de NO por disminución de la actividad de la NOS, protegiendo las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Daleprane & Abdalla, 2013).
Actividad hepatoprotectora	Se ha encontrado un efecto protector a hepatocitos de ratón con ácidos diterpénicos provenientes del extracto metanólico de propóleo checo (Banskota <i>et al.</i> , 2002).

Cuadro 3. Actividades biológicas del propóleo (continuación).

Actividad inmunomoduladora	Se encontró actividad inmunomoduladora en ratones estresados crónicamente, regulando la expresión de los receptores tipo Toll (TLR-2 y TLR-4), que contribuyen al reconocimiento de microorganismos y favorecen los pasos iniciales de la respuesta inmune durante el estrés (Bachiega <i>et al.</i> , 2012).
Actividad nefroprotectora	Con el tratamiento de propóleo se observó una marcada disminución de los niveles séricos de creatinina, BUN, LDH, KIM-1, TNF- α y aumentó la cantidad de enzimas antioxidantes (Summya <i>et al.</i> 2013).
Neurodegeneración	El propóleo y sus constituyentes exhiben actividades neuroprotectoras en estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , gracias a sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias e inmumonodadoras (Farooqui & Farooqui 2012).

2.2 Biocapas.

2.2.1 Definición y generalidades.

Las biocapas o biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos, son ubicuas en la naturaleza y responsables de muchas enfermedades. Son consideradas comunidades de microorganismos que crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y están adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo (Castrillón *et al.*, 2010). Las comunidades que conforman las biopelículas poseen microambientes totalmente diferentes, tales como variaciones de pH, concentraciones de oxígeno y potenciales eléctricos, permitiendo nichos adecuados a todas las especies (Negroni, 2009).

Los microorganismos en la biopelícula son más resistentes a sus contrapartes planctónicas (formas de vida libre) debido a que la estructura de una biopelícula puede restringir la penetración del agente antimicrobiano, el cual se fija en la matriz del exopolisacárido en la biopelícula (provocando una reducción en la concentración del antibiótico) o inhibe los microorganismos en la superficie de la biopelícula, dejando a la células en las profundidades de la biopelícula relativamente poco afectadas (Samaranayake, 2006).

2.2.2 Etapas de formación de la biopelícula dental.

Existen 6 etapas que llevan a la formación de la biopelícula dental (Samaranayake, 2006) la cual se representa en la **Figura 5**:

1. Formación de la película adquirida salival. Una delgada capa de glicoproteínas salivales se deposita en la superficie del diente durante su exposición al medio bucal (las bacterias orales inicialmente se adhieren a la película salival y no directamente al esmalte).
2. Transporte. Las bacterias se aproximan a la vecindad de la superficie dental por medio del flujo natural de la saliva, el movimiento browniano o la quimiotaxia.
3. Interacciones de largo alcance. Incluye interacciones fisicoquímicas entre la superficie de la célula microbiana y la película adquirida salival. La interacción de fuerzas de Van der Waals y la repulsión electrostática producen un fase de adhesión reversible.
4. Interacciones de corto alcance. Consiste en reacciones estereoquímicas entre las adhesinas en la superficie bacteriana y receptores en la película adquirida salival. Esta fase es irreversible en la cual los microorganismos se fijan a la superficie dental.
5. Coagregación o coadhesión. Nuevas bacterias se unen a la primera generación de células que se unieron previamente; éstas pueden ser del mismo género o de diferente género compatible.
6. Formación de la biopelícula. El proceso anterior continúa hasta la formación de una biopelícula más compleja.

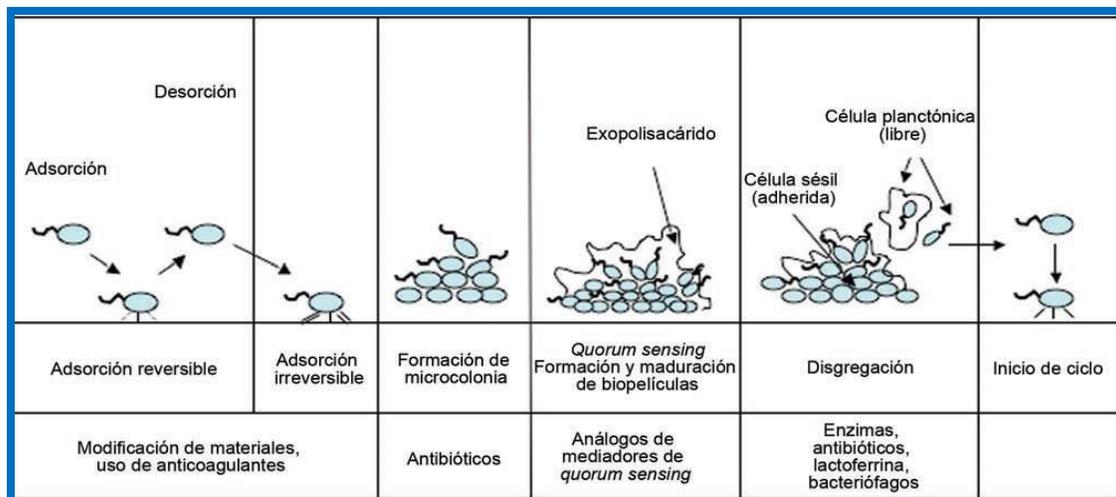


Figura 5. Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión.

La formación de biopelículas ocurre como una serie de eventos secuenciales que dependen de la interacción de microorganismos sobre superficies inertes o vivas, venciendo las fuerzas de repulsión hasta lograr la adsorción irreversible seguida de la formación de una microcolonia. Al alcanzar una densidad de población determinada, se induce la síntesis de metabolitos secundarios (*quorum sensing*) que produce la formación de un exopolisacárido hasta lograr la maduración de la biopelícula. La disgregación permite la formación de una nueva colonia o su eliminación. Se muestran las opciones de tratamiento según la fase de desarrollo de la biopelícula (Castrillón *et al.*, 2010).

2.3 Microextracción en fase sólida.

La microextracción en fase sólida (MEFS) se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida recubierta de un adsorbente. En la mayoría de los casos de naturaleza polimérica, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico (Werjnerowska & Gaca, 2008). Esta técnica inicialmente fue utilizada para la determinación de compuestos clorados en aguas contaminadas (Arthur & Pawliszyn, 1990).

Esta técnica presenta las siguientes ventajas frente a otros métodos de extracción (Kataoka *et al.*, 2000):

- La extracción se puede realizar sobre muestra líquidas, sólidas o gaseosas;
- El tiempo total de análisis es relativamente corto;
- Es una técnica libre de disolventes,

- Con las fases estacionarias comerciales que existen en el mercado (no más de 7) se puede realizar la extracción de una gran diversidad de analitos; y
- El límite de detección es del orden de ng/mL.

El principio en el que se basa la MEFS es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. En el proceso de MEFS 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 (**Figura 6**).

Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra; de esta manera, la MEFS se acopla a la cromatografía de gases para su desorción térmica, la cual va a permitir la identificación de los compuestos mediante el acoplamiento de la técnica analítica de espectrometría de masas (Lord & Pawliszyn, 2000).

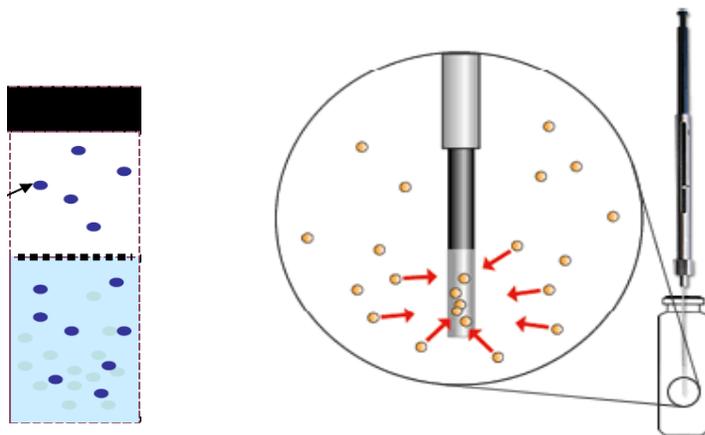


Figura 6. Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa o headspace.

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

2.4 Principios de la cromatografía.

La cromatografía se ha convertido en una herramienta de mucha importancia debido a que es una técnica de separación para resolver muestras complejas como es el caso de los productos naturales. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza por una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija a una columna o bien, a una superficie sólida. Ambas fases se eligen de tal manera que los componentes de la muestra puedan ser distribuidos de modo diferente entre la fase móvil y la estacionaria; como consecuencia, se obtienen bandas o zonas discretas que pueden ser analizadas de manera cualitativa y/o cuantitativa (Harris, 2008).

2.4.1 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica; la elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Es decir, la cromatografía de gases se basa en la distribución del analito entre una fase gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (Skoog *et al.*, 2008).

2.4.2 Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de la relación masa/carga de iones derivados de moléculas. La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas de acuerdo a su relación masa/carga (Harris, 2008).

El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas (Rubinson & Rubinson, 2000):

- ❖ Ionización de la muestra. En el método de impacto electrónico, la ionización de la muestra se lleva a cabo por bombardeo mediante electrones (e^-).
- ❖ Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- ❖ Separación de los iones según su relación masa/carga.

- ❖ Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica para la detección.

2.4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) es la técnica analítica más ampliamente utilizada para el análisis de muestras complejas. El poder de esta metodología reside en la unión de dos poderosas técnicas en un sistema acoplado en el cual, la CG se emplea para separar los componentes de una mezcla basada en sus diferentes afinidades por la fase estacionaria en la columna y la EM se emplea no sólo para detectar los diferentes analitos, sino que además provee información definitiva sobre su identidad al analizar el patrón de fragmentación (Barquero, 2006).

3. Justificación y Objetivos.

La prevalencia de organismos patógenos resistentes es cada vez mayor debido a la automedicación y al uso indiscriminado de algunos antibióticos. Uno de los productos naturales más utilizados como un agente antimicrobiano es el propóleo; el cual ha desempeñado un rol importante en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos, debido a sus múltiples actividades biológicas y aunque es un producto ampliamente comercializado en México bajo diversas formas farmacéuticas, la información que se tiene sobre los propóleos mexicanos es escasa. A pesar de que ya existen trabajos acerca del contenido de polifenoles en extractos de propóleos, y que este contenido puede variar como una función del origen de las muestras afectando la actividad biológica de las preparaciones; otra clase importante de los componentes de propóleos está representado por la fracción volátil (Xu *et al.*, 2009). Sin embargo, los estudios conducentes a determinar el contenido de volátiles en los propóleos son escasos (Pellati *et al.*, 2013).

Estudios previos realizados sobre la fracción volátil de los propóleos, se han centrado en el análisis cromatográfico de gases del aceite esencial extraído por hidrodestilación (HD). Sin embargo, la técnica de HD presenta algunas deficiencias como la pérdida de compuestos volátiles, la baja eficiencia de extracción y el prolongado tiempo de extracción; además de que las altas temperaturas pueden causar degradación o modificaciones químicas de los componentes volátiles (Mukherjee, 2005). Con base en los antecedentes descritos previamente, se planteó el presente proyecto de investigación que tiene como objetivos principales: (1) la caracterización de la fracción volátil en diferentes muestras de propóleo recolectadas en la zona melífera del Altiplano mexicano mediante HS-MEFS/CG-EM-TOF y (2) determinar la actividad de los extractos etanólicos del propóleo sobre el crecimiento del grupo *viridans* y la formación de biocapas mono especie *S. mutans*.

Para cumplir con los objetivos principales se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Establecer las condiciones óptimas para el análisis de las muestras mediante la microextracción en fase sólida.

- Realizar el proceso de microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles para cada una de las muestras obtenidas.
- Realizar el análisis de los compuestos volátiles presentes en las muestras mediante espectrometría de masas con un analizador electromagnético de tiempo de vuelo.
- Realizar la identificación de los compuestos presentes en las diferentes muestras mediante el análisis de sus espectros de masas y la determinación de sus índices de Kovats.
- Determinar la similitud en el contenido de compuestos volátiles de las diferentes muestras de propóleo utilizando el análisis de los componentes principales y el análisis de conglomerados.
- Determinar el efecto de los extractos etanólicos de propóleo sobre el crecimiento de bacterias del grupo *viridans* utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos.
- Determinar el efecto de los extractos etanólicos de propóleo sobre la formación de biocapas monoespecie por *S. mutans* utilizando el método de cristal violeta.

4. Parte Experimental.

4.1 Material vegetal.

Se analizaron ocho muestras de propóleos de diferentes apiarios localizados en la zona rural del Distrito Federal y dos del estado de Veracruz, pertenecientes a las regiones melíferas del Altiplano y del Golfo de México. En el **Cuadro 4** se resume el origen geográfico de los propóleos y la raza de abeja que los procesó.

El acondicionamiento de las muestras de propóleo se realizó mediante la eliminación de impurezas visibles que acompañan a las mismas; tales como virutas de madera, partes de abejas, restos de pintura y residuos vegetales. Posteriormente, cada una de las muestras se refrigeró para su adecuada conservación hasta el momento del análisis de las mismas.

Cuadro 4. Muestras de propóleo analizadas.

Muestra	Ubicación del apiario	Especie de abeja
Acuexcómatl	Xochimilco, D. F.	<i>Apis mellifera</i>
Bonilla	Milpa Alta, D. F.	<i>Apis mellifera</i>
Israel	Milpa Alta, D. F.	<i>Apis mellifera</i>
Nico	Tlalpan, D. F.	<i>Apis mellifera</i>
Panteón	Milpa Alta, D. F.	<i>Apis mellifera</i>
P. Melip	Coatepec, Veracruz	<i>Mellipona becheii</i>
P. Scap	Coatepec, Veracruz	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
Tepenáhuatl	Milpa Alta, D. F.	<i>Apis mellifera</i>
Trojes	Milpa Alta, D. F.	<i>Apis mellifera</i>
Valentín	Milpa Alta, D. F.	<i>Apis mellifera</i>

4.2 Microextracción en Fase Sólida (MEFS).

4.2.1 Materiales y Equipo.

- Agitador magnético de 5 mm x 3 mm (Fisherbrand Egg-Shaped PTFE bar 50-270-17).
- Parrilla con agitador magnético Corning PC-420D.

- Viales de 10 mL con tapón de silicón/PTFE y septo de teflón (Supelco Bellefonte, PA, USA).
- Balanza analítica Sartorius BP-210-S.
- Fibras para la MEFS. Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano 50/30 μm (DVB/CAR/PDMS; 1 cm), Polidimetilsiloxano 100 μm (PDMS; 1 cm) y Carboxen-polidimetilsiloxano 75 μm (CAR/PDMS; 1 cm) (Todas las fibras adquiridas de Supelco Bellefonte, PA, USA).
- Soporte de la fibra para inyección manual (Supelco Bellefonte, PA, USA).

4.2.2 Estándares.

Hexanal (>98.0 % pureza), Lote: MKAA0591; β -mirceno (99.0 % pureza) Lote: 03425JH; α -bisabolol (>99.0 % pureza), Lote: 0001368613; D-limoneno (>99.0 % pureza), Lote: 08022AJ; α -pineno (>99.0 % pureza), Lote: 80796DJ; α -copaeno (>98.0 % pureza), Lote: 605387KN; y óxido de cariofileno (>99.0 % pureza), Lote: 21046. Todos adquiridos de Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA).

4.2.3 Reactivos.

- Agua HiPerSolv CHROMANORM (VWR, PROLABO), Lote: 13B250512.
- Cloruro de sodio (cristal), J. T. Baker Analyzed, Lote: J29478.

4.2.4 Selección de parámetros para la optimización de la MEFS.

Para optimizar la adsorción de los analitos de la fibra y las condiciones de extracción, fue necesaria la consideración de diferentes factores que influyen en la eficiencia, tales como la temperatura de extracción, el tiempo de extracción, la cantidad de muestra, la fuerza iónica y el tipo de fibra.

4.2.4.1 Selección de la fase de la fibra.

En el presente trabajo, se evaluaron 3 fibras de diferente fase para determinar cuál fase extraía de manera más eficiente la mayor cantidad de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo. De esta manera, en el siguiente cuadro (**Cuadro 5**) se señalan las fibras empleadas.

Cuadro 5. Fibras empleadas para el análisis de la microextracción en fase sólida.

Composición (diámetro)	Acrónimo	Color de fibra	Espesor de la película (µm)
Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano	DVB / CAR / PDMS	Gris	50/30
Carboxen-polidimetilsiloxano	CAR / PDMS	Negra	75
Polidimetilsiloxano	PDMS	Roja	100

4.2.4.2 Perfil del tiempo de extracción.

Para la obtención del tiempo de extracción, se seleccionó trabajar con la fibra de fase DVB/CAR/PDMS. La cantidad de muestra fue de 0.5 g, 0.15 g de NaCl en 18 mL de agua destilada a 45 °C y 320 rpm. Los tiempos empleados para la realización de dicho perfil fueron de 10, 15, 20 y 30 minutos.

4.2.4.3 Selección de la temperatura de extracción.

En lo que se refiere a este parámetro, se optó por trabajar con 3 diferentes temperaturas (45, 50 y 70 °C); en todos los casos, se trabajó con 0.5 g de muestra, 0.15 g de NaCl en 18 mL de agua destilada, con un tiempo de extracción de 30 min y se empleó la fibra de fase DVB/CAR/PDMS.

4.2.4.4 Selección de la cantidad de muestra.

Para la cantidad de muestra, se trabajaron con cantidades de 0.5, 1.0 y 2.0 g de muestra de propóleo; así como 0.15 g de NaCl en 18 mL de agua destilada. Asimismo, se empleó un tiempo de extracción de 30 min, a 45 °C para la temperatura de extracción, con una agitación de 320 rpm, utilizando la fibra de fase DVB/CAR/PDMS.

4.2.4.5 Efecto de la fuerza iónica.

Para la determinación del efecto de la fuerza iónica mediante la adición de NaCl, se realizaron extracciones con 0.15, 0.25 y 0.50 g de sal en 18 mL de agua destilada. Las condiciones establecidas de trabajo fueron: la velocidad de agitación de 320 rpm, 0.5 g de muestra de propóleo, el tiempo de extracción de 30 min a 45 °C con la fibra de fase DVB/CAR/PDMS.

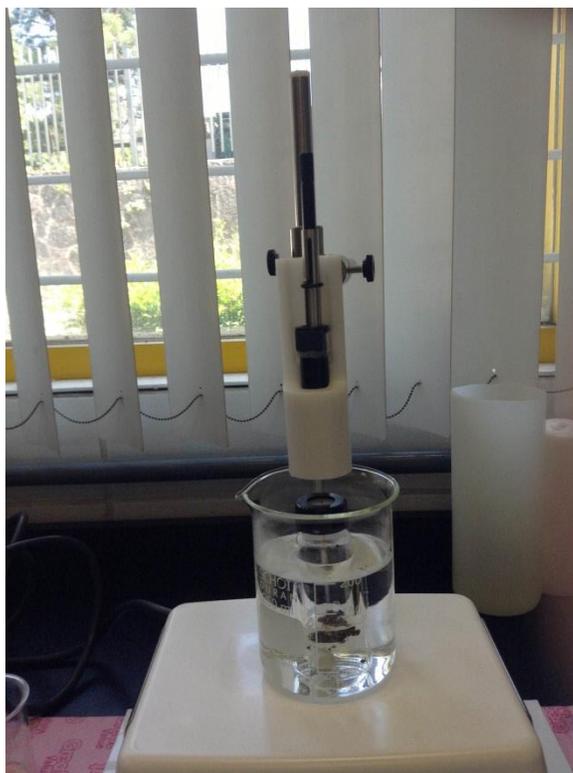


Figura 7. Microextracción en fase sólida de una muestra de propóleo por el método de *headspace*.

4.3 Análisis Cromatográfico.

Para la realización del análisis se empleó el espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo Agilent 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5 % difenil-95 % dimetilpolisiloxano) con dimensiones de 10 m × 0.18 mm × 0.18 μm. La temperatura del inyector se mantuvo a 300 °C; utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a una velocidad lineal de 1 mL/min (medido a 250 °C). La temperatura del horno se programó a 40 °C (durante 1 minuto) y la rampa de calentamiento fue de 20 °C/min hasta los 300 °C durante 5 minutos. Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo de inyección "splitless" por 3 minutos.

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



Figura 8. Equipo acoplado CG-EM-TOF utilizado (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM).

Cuadro 6. Condiciones de análisis establecidas.

Técnica de preparación de la muestra	Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa (HS-MEFS)
Microfibras utilizadas	DVB/CAR/PDMS, PDMS y CAR/PDMS (Supelco Bellefonte, PA, USA)
Tiempo de exposición de la fibra	30 minutos
Temperatura de la muestra	45 °C (baño de agua)
Modo de extracción	En fase gaseosa (Headspace)
Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos

Cuadro 7. 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	Splitless (3 minutos)
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)

4.4 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).

4.5 Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos de los datos se llevaron a cabo utilizando el software estadístico Fizz Calculations 2.3 (Biosystemes 2007, Couteron, France). Los datos se analizaron mediante ANOVA a una vía y para conocer los atributos con una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras se realizó una prueba de comparación múltiple de medias (DMS) tomando un valor de $p \leq 0.05$. El análisis de los datos fue realizado por Análisis de Componentes Principales utilizando una matriz de correlación (Peres-Neto *et al.*, 2005).

4.6 Evaluación de la actividad biológica.

4.6.1 Actividad antimicrobiana.

4.6.1.1 Microorganismos de prueba.

Para realizar la determinación del efecto de los extractos y compuestos aislados sobre el crecimiento bacteriano se utilizó como modelo a las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* (ATCC 10499), *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* (ambas aisladas de pacientes infectados e identificadas mediante pruebas bioquímicas); las cuales se inocularon para obtener una suspensión celular en medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) y se ajustaron mediante la escala de Mc. Farland de 2 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL utilizando un espectrofotómetro Agilent, modelo 8453E.

4.6.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, se colocaron en todos los pozos 100 μ L de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI). Posteriormente, se agregaron en los pozos de la primera línea de A hasta G, 100 μ L de cada extracto etanólico (A: ACX, B: BON, C: NIC, D: ISR, E: PTN, F: TPN, G: TRJ, H: VLT) de las muestras de propóleo (5.0 mg/mL aproximadamente) y se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 100 μ L de línea en línea (A-G) desechando los últimos 100 μ L (línea 9). Como paso siguiente, se adicionaron 20 μ L de bacteria a una concentración de 1×10^6 UFC/mL (una placa por bacteria). Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C en una incubadora VWR Symphony; y por último, se leyeron en un lector de

placas de Elisa (Microplate Reader, Benchmark BIO-RAD) a 700 nm para determinar su CMI. En el **Cuadro 8**, se muestran los testigos empleados en el ensayo.

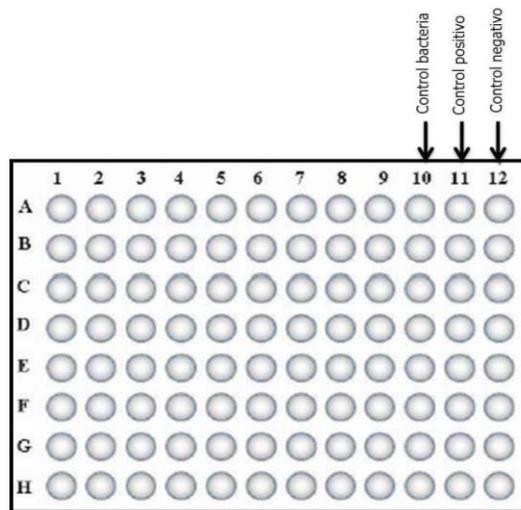


Figura 9. Esquema de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo antimicrobiano.

Cuadro 8. Testigos empleados para la determinación de la CMI.

Control	Línea de la placa	Medio de cultivo	Volumen (μL)	Compuesto de prueba
Control negativo	10	Con inóculo	20	Bacteria
Control positivo	11	Con inóculo	80	Digluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12 %
Control de esterilidad	12	Sin inóculo	100	Medio BHI

4.6.2 Inhibición de la formación de biocapa por *Streptococcus mutans*.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos, en donde se agregaron 100 μL del caldo BHI. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de los extractos de prueba (Don Nico, Israel y Panteón) y se realizaron las diluciones seriadas. Como paso siguiente se adicionaron 80 μL de medio BHI enriquecido con 1 % de glucosa y, finalmente, 20 μL de la bacteria *S. mutans* (1×10^6 UFC/mL). En la **Figura 10** se resume la distribución de las sustancias analizadas en el bioensayo.

La placa de 96 pozos se incubó en condiciones aerobias a 37 °C por 72 h. Posteriormente, la formación de las biocapas se cuantificó mediante la metodología de Hwang y Rukayadi (2006), en la cual después de las 72 h, la placa se lavó con agua

desionizada con la finalidad de eliminar las bacterias que no se adhirieron y después de ello, se eliminó el agua; a continuación se agregaron 100 μ L de etanol (96 %) en cada pozo (95 %) para que las bacterias que se adhirieron se fijaran y se dejaron secar a temperatura ambiente en una corriente de aire. Inmediatamente, se añadieron 200 μ L de cristal violeta (0.4 %) a cada pozo con la finalidad de teñir a las bacterias y se incubó a temperatura ambiente por 45 min; una vez transcurrido ese tiempo, la placa se lavó con agua desionizada y se agregaron 200 μ L de etanol (96 %) dejándola reposar otros 45 min, posterior al tiempo establecido se tomaron 100 μ L de cada pozo y se transfirieron a una placa de 96 pozos para leer su absorbancia a 565 nm en un lector de placas de 96 pozos. Se utilizó como control positivo 80 μ L gluconato de clorhexidina (CHX) al 0.12 % y como control negativo el inóculo de la cepa sin tratamiento. Se considera que el 100 % de adhesión corresponde a la absorbancia de los pozos con la bacteria sin tratamiento y con base en los resultados de la absorbancia de los pozos con tratamiento se calcularon los porcentajes de inhibición de cada extracto.

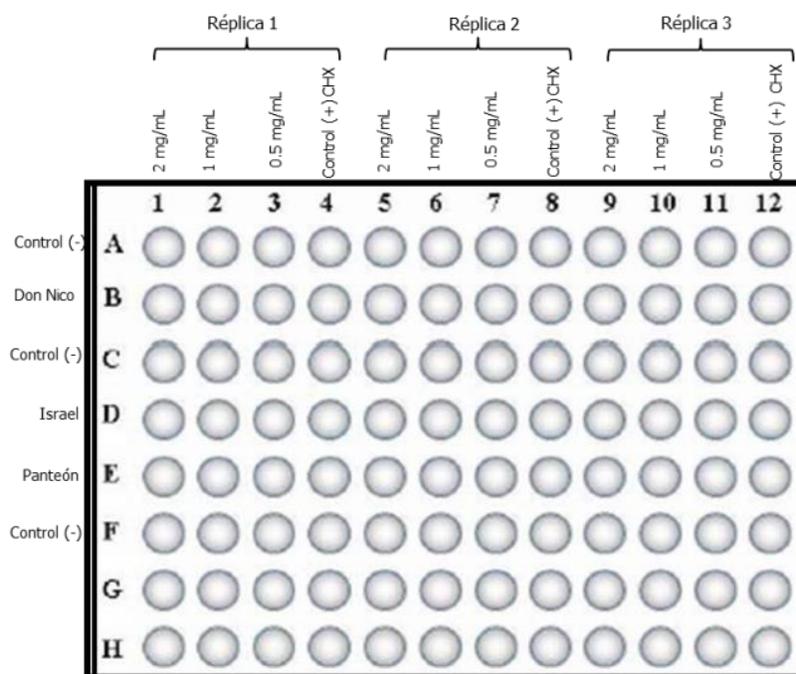


Figura 10. Esquema de la placa de 96 pozos utilizada en el ensayo de inhibición de la biocapa.

5. Resultados y Discusión.

5.1 Selección de parámetros para la HS-MEFS.

En todos los análisis realizados para la selección de los parámetros de la metodología analítica se utilizó la muestra de propóleo "Don Nico" debido a que se contaba con un abastecimiento constante del material vegetal.

5.1.1 Selección de la fase de la fibra.

Para el análisis de los propóleos por MEFS se emplearon tres fibras de diferente fase característica señaladas en el **Cuadro 5** y éstos se realizaron por triplicado.

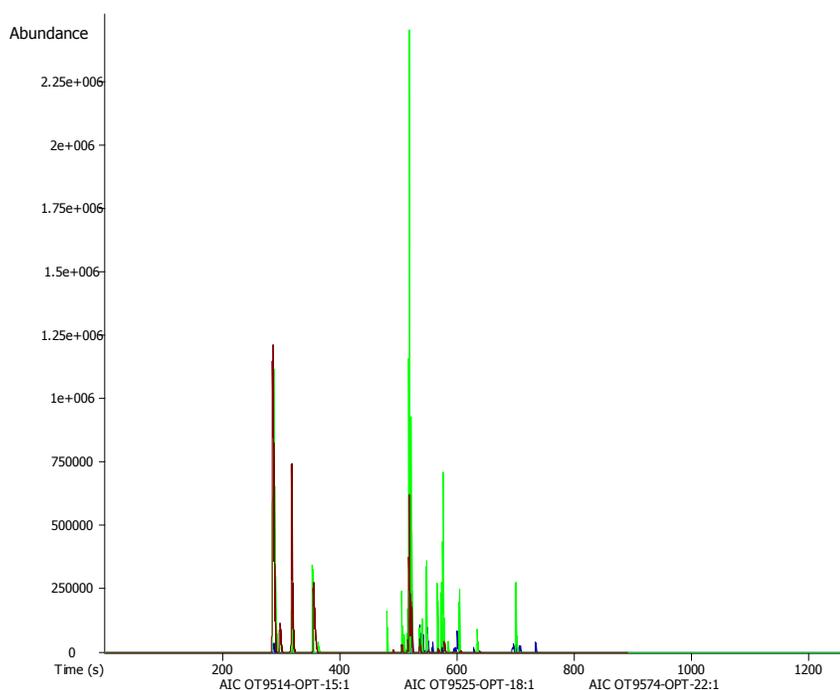


Figura 11. Cromatograma iónico analítico (AIC) para la selección de las fibras de las microextracciones (Azul: Fibra PDMS, Verde: Fibra CAR-DVB-PDMS y Rojo: Fibra CAR-PDMS).

Al realizar la comparación de los resultados obtenidos para cada fibra, se determinó que la fibra con mejor respuesta resultó ser la gris (DVB/CAR/PDMS) ya que permitió obtener un perfil adecuado para todas las clases de compuestos volátiles del propóleo (**Figura 11**). Esto se debe a que la combinación de CAR, DVB y PDMS proporciona una mayor eficiencia; ya que las moléculas pequeñas con mayores coeficientes de difusión llegan a la capa interior más rápido y son adsorbidas por la fase de Carboxen, las moléculas más pesadas son retenidas en la capa exterior de

DVB; haciendo que esta configuración facilite también la desorción de los analitos (Pillonel *et al.*, 2002). La extracción de los analitos con la fase PDMS se debe, principalmente, a un fenómeno de absorción, aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunas sustancias (sobre todo si son poco polares) puede realizarse vía adsorción, ya que existe cierta competitividad entre los dos efectos (Poerschman *et al.*, 2000; Vaes *et al.*, 2000).

5.1.2 Perfil del tiempo de extracción.

En lo que respecta a la optimización del tiempo de extracción, cuando la microextracción se realizó a los 10 minutos, se obtuvo un total de 11 compuestos; a los 15 minutos, se obtuvieron 16 compuestos; a los 20 minutos, 17 compuestos; en tanto que a los 30 minutos, la cantidad de compuestos fueron de 30. En el gráfico de barras (**Figura 12**) se observa que en los primeros tiempos de extracción (10, 15 y 20 min) la mayor cantidad de compuestos extraídos fueron terpenoides.

Por otra parte, a los 30 min, se obtuvo una mayor variedad de compuestos, destacando a los terpenoides, ésteres, alcoholes, cetonas y aldehídos. Asimismo, en la **Figura 13** se ilustra de manera más clara que en la realización de la extracción a los 30 min no solamente se obtiene una mayor variabilidad de compuestos, sino que se obtiene una mejoría en la respuesta.

Cabe destacar que la microextracción en fase sólida no es una técnica de extracción exhaustiva, debido a que tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de partición de los analitos; es decir, se tiene una relación proporcional entre la cantidad de los analitos adsorbidos por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra antes de alcanzar el equilibrio de partición (Holt, 2001). Es por ello que se decidió trabajar con un tiempo de 30 min para las posteriores extracciones, ya que no es un tiempo muy largo como para verse afectado el equilibrio pero tampoco es un tiempo muy corto como para afectar la precisión de la extracción (Pillonel *et al.*, 2002).

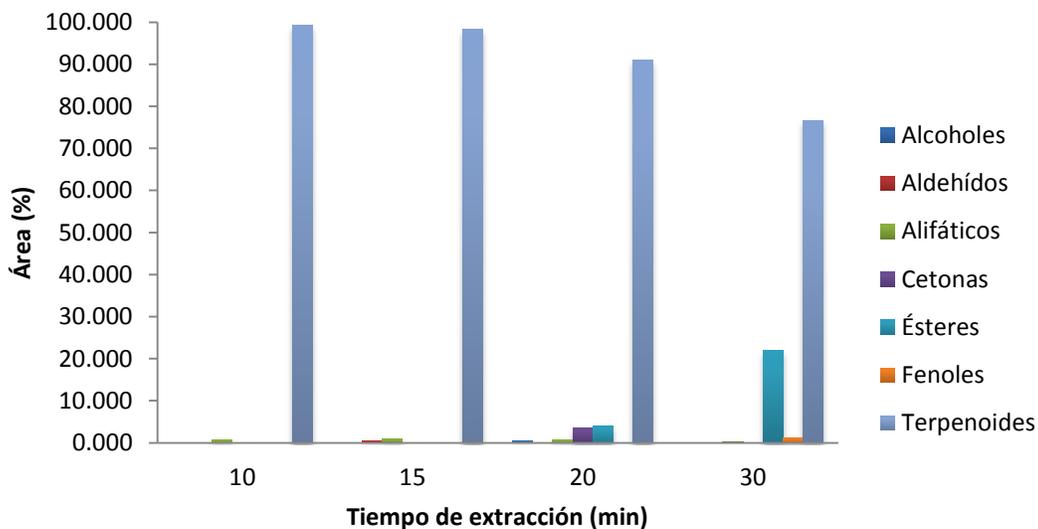


Figura 12. Gráfico de barras del perfil de extracción para los diferentes tiempos para la HS-MEFS/CG-EM-TOF del propóleo.

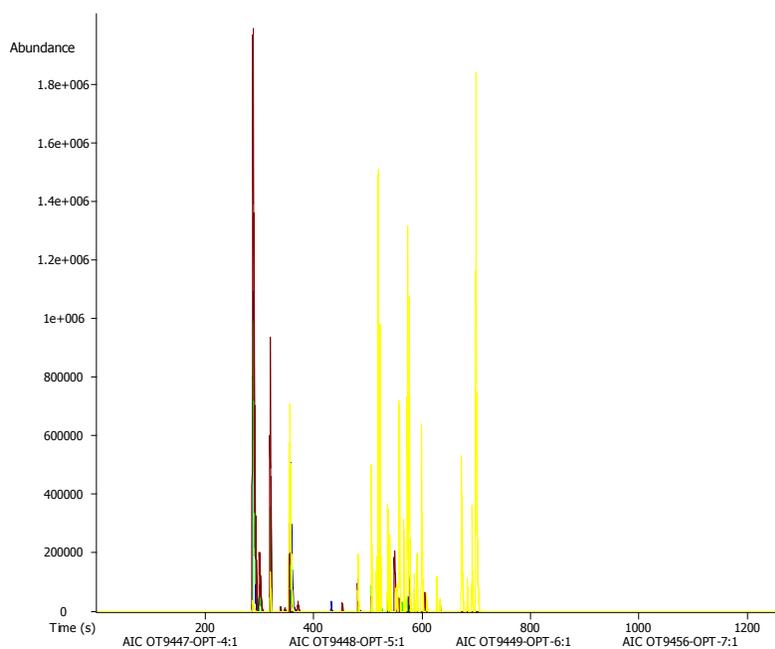


Figura 13. Cromatograma iónico analítico (AIC) del perfil de los tiempos de extracción para el propóleo (Azul: 10 min, Verde: 15 min, Rojo: 20 min y Amarillo: 30 min).

5.1.3 Selección de la temperatura de extracción.

Para la optimización de este parámetro, dos temperaturas (45 y 50 °C) se seleccionaron con base en extracciones previas (López-Rivera, 2013), y la tercera temperatura (70 °C) se seleccionó debido a que se ha descrito que incrementos en la temperatura de extracción generalmente incrementan la concentración de compuestos volátiles en la fase gaseosa. Sin embargo, si la temperatura es muy alta, los analitos pueden desadsorberse de la fibra, con la consecuente reducción de la sensibilidad (Pellati *et al.*, 2013).

Como se muestra en la **Figura 14**, bajo las condiciones de 50 y 70 °C se obtienen una mayor diversidad de componentes volátiles; sin embargo, podemos observar (**Figura 15**) que la respuesta de los analitos es menor con respecto a los analitos extraídos a 45 °C.

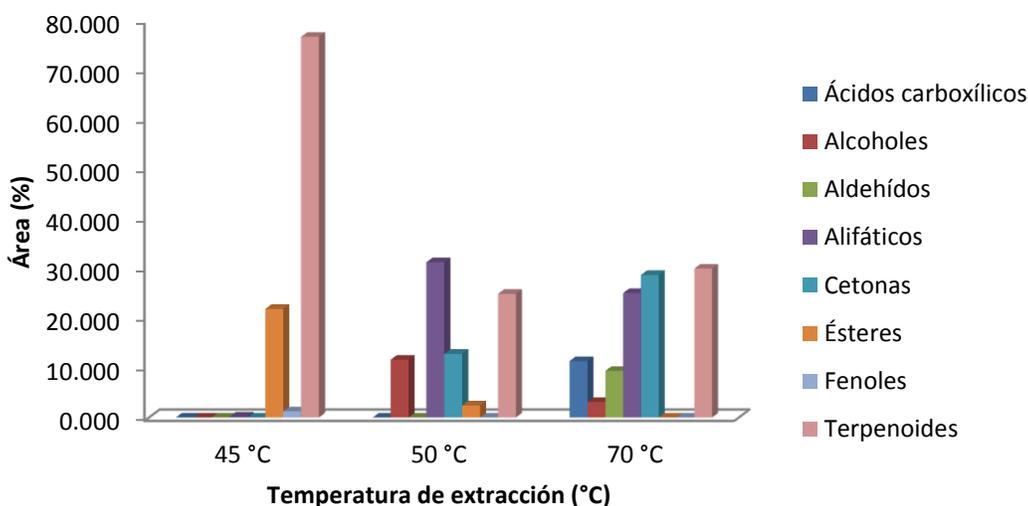


Figura 14. Selección de la temperatura de extracción para la HS-MEFS/CG-EM-TOF del propóleo.

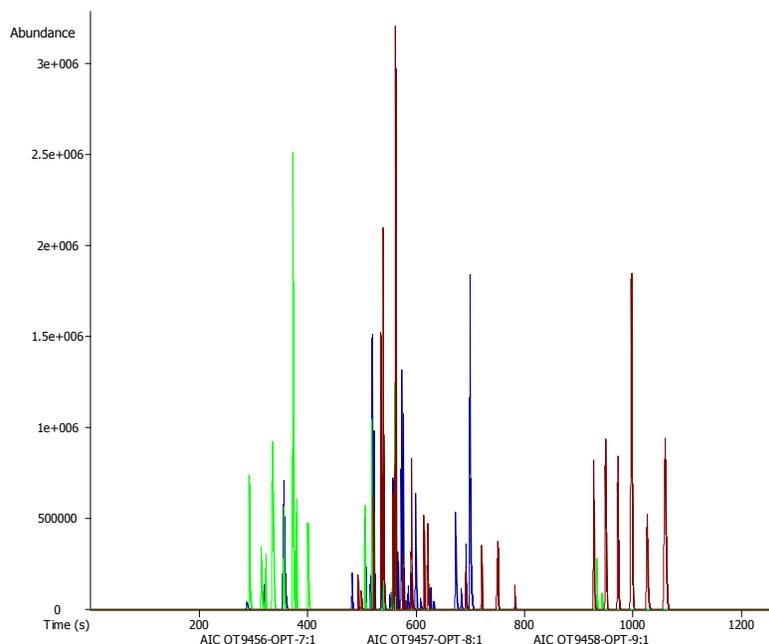


Figura 15. Cromatograma iónico analítico (AIC) para la selección de la temperatura de extracción para el propóleo (Azul: 45 °C, Rojo: 50 °C y Verde: 70 °C).

Los efectos de la temperatura deben ser considerados cuando se producen variaciones; ya que cuando el aumento de la temperatura es utilizado para incrementar las tasas de extracción, aumentando la liberación de los analitos. Pero por otra parte, se reduce la eficacia de la extracción; debido a que un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de partición del analito entre la fase gaseosa y la fibra; y por tanto, disminuye la cantidad de analito extraído por la fibra en el equilibrio, saturando así la matriz con la que se encuentra recubierta la fibra (Poerschmann *et al.*, 2000).

5.1.4 Selección de la cantidad de muestra.

El volumen de la muestra es también un parámetro importante que afecta a la eficiencia de la MEFS. De manera general, al incrementar la cantidad de muestra aumenta también la cantidad de analito extraída; pero esta aproximación no es válida cuando los analitos tienen una gran afinidad por la fibra; y cuando se utilicen volúmenes de muestra muy pequeños (Spietelun *et al.*, 2013).

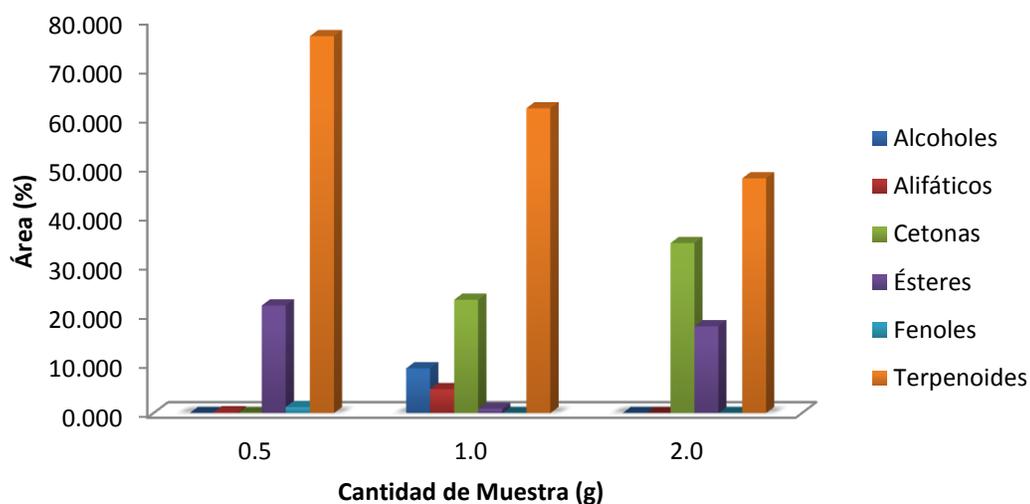


Figura 16. Selección de la cantidad de muestra del propóleo para la HS-MEFS/CG-EM-TOF.

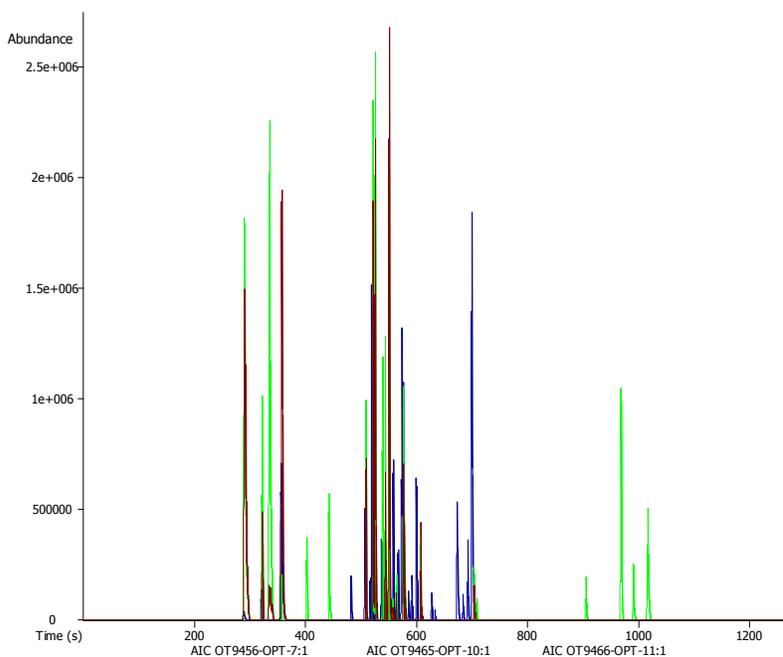


Figura 17. Cromatograma iónico analítico (AIC) para la selección de la cantidad de muestra de propóleo para la microextracción (Verde: 0.5 g, Azul: 1 g y Rojo: 2 g).

En la extracción por *headspace*, el analito se reparte entre las tres fases: la de la muestra original, la fase gaseosa o *headspace*, y el adsorbente de la fibra. Por ello, para observar el efecto de la cantidad de muestra, se trabajaron con 0.5, 1.0 y 2.0 g; en la **Figura 16** se observa que, conforme se aumenta la cantidad de muestra, la

cantidad de compuestos volátiles de analitos de carácter terpenoide disminuye y aumenta la cantidad de compuestos de otra naturaleza química. Asimismo, se observó (**Figura 17**) que al ir incrementando la cantidad de muestra, la saturación de la fibra se dio de manera rápida obteniendo una menor cantidad de compuestos volátiles; considerando de esta manera que la cantidad de muestra óptima era de 0.5 g, ya que se obtuvo una mayor cantidad de compuestos volátiles y no se saturó rápidamente el adsorbente de la fibra.

5.1.5 Efecto de la fuerza iónica.

La adición de sal (NaCl) aumenta la fuerza iónica y, por lo tanto, favorece la volatilización de algunos compuestos, para estudiar este efecto, se realizaron adiciones de esta sal al 1, 2.5 y 5 % (m/v) respecto al volumen de muestra.

Generalmente, la presencia de electrólitos en un sistema de adsorción, disminuye la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en la fase acuosa, este efecto se llama *salting out* y se utiliza para incrementar la sensibilidad de un método analítico. Las sales aumentan el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada, por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta. Pero si los analitos se encuentran en forma no ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción debido, probablemente, a un aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución (Pawliszyn, 1997).

Al realizar la comparación de los compuestos extraídos con las diferentes cantidades de NaCl en el cromatograma (**Figura 19**), no se puede apreciar una diferencia significativa en las extracciones realizadas; sin embargo, se puede observar que la mayor cantidad de compuestos se obtienen al saturar en un 50 % respecto a la cantidad de muestra; es decir, al agregar 0.25 g de NaCl (**Figura 18**).

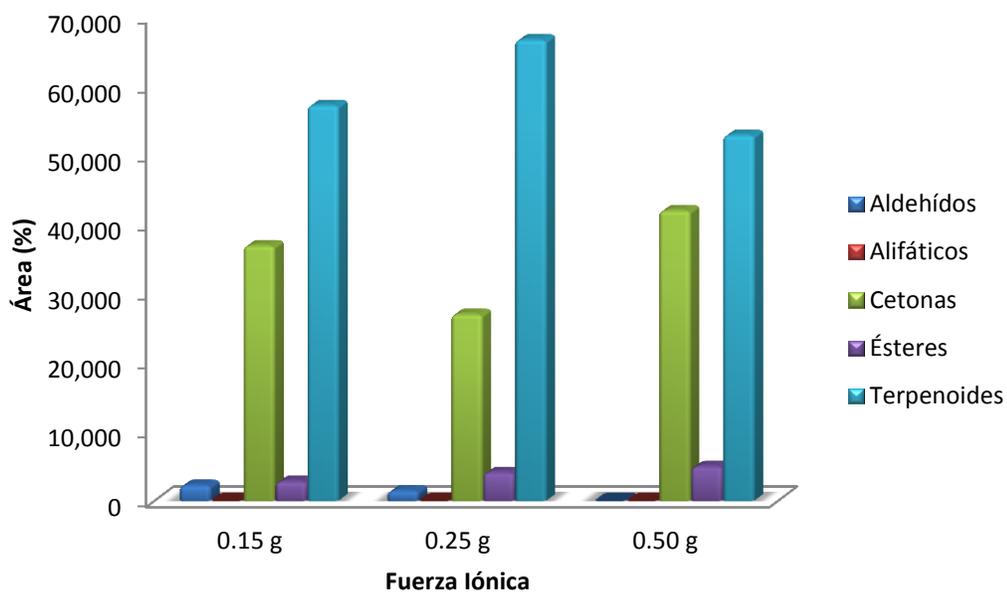


Figura 18. Efecto de la fuerza iónica en la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF para el propóleo.

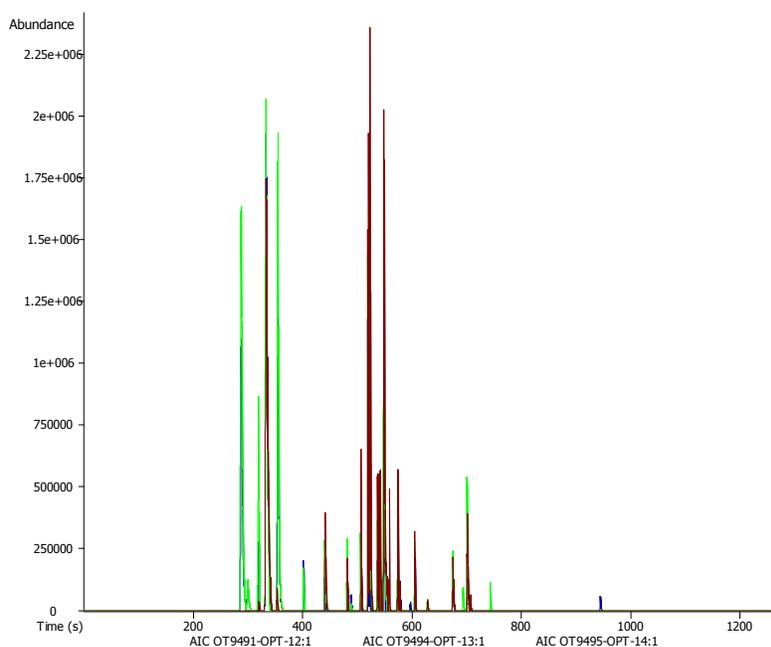


Figura 15. Cromatograma iónico analítico (AIC) del efecto de la fuerza iónica en la microextracción (Azul: 30 %, Verde: 50 % y Rojo: 100 % respecto a la cantidad de muestra).

Una vez obtenidas las mejores condiciones para la realización de la técnica analítica HS-MEFS (**Cuadro 9**), se procedió a la realización de la microextracción de las muestras de propóleos.

Cuadro 9. Condiciones establecidas para la microextracción de las muestras.

Tipo de Fibra	Tiempo de Extracción	Temperatura de Extracción	Cantidad de muestra	Cantidad de sal
DVB/CAR/PDMS	30 min	45 °C	0.500 g	0.250g

5.2 Identificación de los compuestos volátiles de los propóleos.

La determinación de los componentes volátiles de las diferentes muestras mediante la HS-MEFS/CG-EM-TOF permitió la identificación de siete alcoholes, nueve aldehídos, 17 compuestos alifáticos, cinco cetonas, 17 ésteres y 85 terpenoides; obteniendo un total de 140 compuestos, siendo los más abundantes: hexanal, nonanal, silvestreno, 3-careno, cariofileno, eucalipto, α -pineno, D-limoneno, entre otros. En el **Cuadro 10** se muestran los compuestos volátiles detectados, ordenados de acuerdo a la naturaleza química.

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

Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF en las muestras de propóleos.

Abreviatura	^a Compuesto	^b I.R.t	^b I.R.e	^c Método de Identificación
AC1	Alcohol lilac	-	1020	a,c
AC2	4-metil-3-heptanol	956	1000	a,b,c
AC3	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-isopropenil-1,2-dimetilciclopentanol	-	1110	a,c
AC4	<i>cis</i> -11,12-epoxitetradecan-1-ol	-	1287	a,c
AC5	2-decen-1-ol	1101	1107	a,b,c
AC6	<i>trans</i> -2-etil-2-hexen-1-ol	-	1512	a,c
AC7	1-octanol	1080	1095	a,b,c
AC8	2-nonen-1-ol	1906	1105	a,b,c
AD1	Hexanal	826	835	a,b,c
AD2	Heptanal	912	919	a,b,c
AD3	2,4-dimetil-pentanal	-	1075	a,c
AD4	Octanal	1014	1018	a,b,c
AD5	Nonanal	1117	1119	a,b,c
AD6	<i>trans</i> -crisantemal	1651	1657	a,b,c
AD7	(<i>Z</i>)-2-heptenal	974	972	a,b,c
AD8	(<i>Z</i>)-2-nonenal	1151	1147	a,b,c
AF1	3-isopropenil-5,5-dimetil-ciclopenteno	-	1085	a,c
AF2	1,3,5,5-tetrametil-1,3-ciclohexadieno	-	1212	a,c
AF3	5,6-dimetil-1,3-ciclohexadieno	-	1115	a,c
AF4	Estireno	896	898	a,b,c
AF5	Tetradecano	1400	1396	a,b,c
AF6	2,5-dimetil-undecano	1110	1094	a,b,c
AF7	2,2,6-trimetil-octano	1069	1063	a,b,c
AF8	Tridecano	1300	1294	a,b,c

Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF en las muestras de propóleos
(continuación.)

AF9	2,2-dimetil-tetradecano	1365	1357	a,b,c
AF10	2,6,8-trimetil-decano	1504	1506	a,b,c
AF11	Eicosano	2000	2002	a,b,c
AF12	2-metil-dodecano	1866	1869	a,b,c
AF13	2,2,7-trimetil-decano	1088	1081	a,b,c
AF14	2,6-dimetil-octano	935	927	a,b,c
AF15	2,8-dimetil-undecano	1119	1121	a,b,c
AF16	5,5-dimetil-1-hexeno	1700	1698	a,b,c
AF17	Pentametilciclopentadieno	985	992	a,b,c
C1	6-metil-5-hepten-2-ona	994	1002	a,b,c
C2	2-dodecanona	1400	1404	a,b,c
C3	2-heptanona	900	902	a,b,c
C4	5-metil-2-hexanona	884	899	a,b,c
C5	3-nonen-2-ona	1135	1142	a,b,c
E1	Salicilato de homomentilo	-	2035	a,c
E2	Hexanoato de etilo	1010	1019	a,b,c
E3	Octanoato de etilo	1205	1203	a,b,c
E4	Nonanoato de metilo	1208	1212	a,b,c
E5	Nonanoato de etilo	1320	1326	a,b,c
E6	Tridecanoato de metilo	1600	1592	a,b,c
E7	Formiato de isobornilo	1245	1247	a,b,c
E8	Salicilato de 2-etilhexilo	-	1950	a,c
E9	Valeroato de 4 tridecilo	-	1137	a,c
E10	Acetato de octen-1-ilo	1106	1099	a,b,c
E11	Propionato de hexilo	1101	1108	a,b,c

Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF en las muestras de propóleos (continuación.)

E12	Hexanoato de pentilo	1288	1298	a,b,c
E13	Pentanoato de hexilo	1293	1299	a,b,c
E14	Hexanoato de hexilo	1386	1393	a,b,c
E15	Propanoato del 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)propilo	-	1391	a,c
E16	Propanoato del 2-metil-1-(1,1-dimetil-etil)-2-metil-1,3-propanediilo	-	1958	a,c
E17	Octanoato de metilo	1138	1133	a,b,c
T1	Canfeno	960	955	a,b,c
T2	α -felandreno	1046	1041	a,b,c
T3	β -pineno	990	1000	a,b,c
T4	α -terpineno	1064	1061	a,b,c
T5	σ -cimeno	1033	1035	a,b,c
T6	Limoneno	1060	1058	a,b,c
T7	(\mathcal{Z})-hidrato de sabineno	1077	1083	a,b,c
T8	α -terpineol	1162	1159	a,b,c
T9	4-careno	1014	1017	a,b,c
T10	Fenchona	1087	1079	a,b,c
T11	(E)-pinocarveol	1169	1163	a,b,c
T12	Alcanfor	1146	1138	a,b,c
T13	σ -metil-timol	1242	1243	a,b,c
T14	α -cubebeno	1383	1391	a,b,c
T15	α -longipineno	1360	1358	a,b,c
T16	Copaeno	1392	1394	a,b,c
T17	Sativeno	1390	1389	a,b,c
T18	Longifoleno	1448	1453	a,b,c
T19	δ -cadineno	1554	1564	a,b,c
T20	α -muuroleno	1519	1522	a,b,c

Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF en las muestras de propóleos (continuación.)

T21	Cadin-1,4-dieno	1533	1544	a,b,c
T22	α -pineno	976	979	a,b,c
T23	Linalol	1112	1114	a,b,c
T24	(2Z,6E)-farnesol	1673	1669	a,b,c
T25	β -camigreno	1500	1502	a,b,c
T26	<i>p</i> -cimeno	1048	1052	a,b,c
T27	Eucalipto	1053	1054	a,b,c
T28	Germacreno	1450	1456	a,b,c
T29	Ylangeno	1378	1372	a,b,c
T30	α -burboneno	1509	1512	a,b,c
T31	Cariofileno	1495	1497	a,b,c
T32	α -ioneno	1266	1269	a,b,c
T33	α -calacoreno	1546	1547	a,b,c
T34	<i>cis-Z</i> - α -epóxido de bisaboleno	1680	1685	a,b,c
T35	Espatulenol	1617	1621	a,b,c
T36	<i>p</i> -menta-3-en-9-ol	-	1717	a,c
T37	3-careno	1008	999	a,b,c
T38	<i>trans</i> -3-caren-2-ol	-	1100	a,c
T39	Carveol	1197	1192	a,b,c
T40	γ -pironeno	-	1214	a,c
T41	β -cubebeno	1395	1402	a,b,c
T42	<i>trans</i> - β -bergamoteno	1480	1482	a,b,c
T43	Dihidrocurcumeno	1514	1519	a,b,c
T44	Terpinoleno	1099	1101	a,b,c
T45	α -canfenal	1133	1127	a,b,c
T46	Mirtanal	1280	1284	a,b,c

Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF en las muestras de propóleos (continuación.)

T47	<i>trans</i> -verbenol	1117	1113	a,b,c
T48	Tujeno	924	1000	a,b,c
T49	<i>trans-p</i> -ment-2-eno	1118	1114	a,b,c
T50	<i>exo</i> -fenchol	1218	1213	a,b,c
T51	<i>Z</i> -neo-alo-ocimeno	1231	1228	a,b,c
T52	3-pinanona	1276	1266	a,b,c
T53	α -pinocarvona	1260	1257	a,b,c
T54	Isopinocanfona	1275	1274	a,b,c
T55	terpinen-4-ol	1286	1284	a,b,c
T56	Mirtenol	1297	1309	a,b,c
T57	<i>p</i> -cimeneno	1096	1100	a,b,c
T59	Borneol	1176	1182	a,b,c
T60	(1 <i>R</i>)-mirtenal	1209	1215	a,b,c
T61	Verbenona	1218	1217	a,b,c
T62	Aromadendreno	1464	1467	a,b,c
T63	α -selineno	1500	1500	a,b,c
T64	Seicheleno	1460	1470	a,b,c
T65	Óxido de Cariofileno	1596	1593	a,b,c
T66	τ -muurolol	1657	1665	a,b,c
T67	Epóxido de longipineno	-	1676	a,c
T68	Cicloisosativeno	1378	1380	a,b,c
T69	β -burboneno	1393	1399	a,b,c
T70	β -elemeno	1398	1401	a,b,c
T71	α -gurjeneno	1419	1419	a,b,c
T72	α -santalol	1624	1592	a,b,c

Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-MEFS/CG-EM-TOF en las muestras de propóleos (continuación.)

T73	(<i>E</i>)- β -farneseno	1482	1498	a,b,c
T74	γ -selineno	1500	1505	a,b,c
T75	<i>cis</i> - α -bisaboleno	1509	1511	a,b,c
T76	óxido de (2)-aromadendreno	1578	1584	a,b,c
T77	Cadaleno	1682	1686	a,b,c
T78	Acetato de mirtenilo	1332	1337	a,b,c
T79	Acetato de bornilo	1283	1291	a,b,c
T80	<i>trans</i> -geranil acetona	1461	1473	a,b,c
T81	β -mirceno	1000	1007	a,b,c
T82	<i>p</i> -menta-1,3,8-trieno	1111	1110	a,b,c
T83	Silvestreno	1029	1019	a,b,c
T84	<i>m</i> -cimeno	1033	1029	a,b,c
T85	6-canfenol	1216	1213	a,b,c

(-): Compuesto no identificado en librerías electrónicas de acuerdo a su índice de Kovats.

^aCompuestos ordenados de acuerdo a su naturaleza química.

^bÍndice de retención de Kovats en columna DB-5.

^ca: tiempo de retención; b: índice de retención; c: espectros de masas

Cabe mencionar que para la realización de la identificación de los componentes volátiles de las muestras analizadas, se realiza una comparación de los espectros de masas de los compuestos experimentalmente obtenidos con los compuestos que se encuentran en la base de datos del software empleado; de esta manera se conoce el componente obtenido, y para tener una certeza mayor, lo que se realiza es una nueva comparación de los índices de Kovats a través del uso de las bibliotecas electrónicas y en la literatura como Wiley y NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología). Como podemos observar a manera de ejemplo en la **Figura 16**, los espectros de masas para el α -pineno son muy parecidos, y como se muestra en dicha

figura, la similitud que existe entre el espectro experimental del descrito en la biblioteca Adams (2001) es mayor, con un valor de 976 (97.6 %), con lo cual se puede confirmar la presencia de dicho componente.

Además de la comparación de los espectros de masas, se obtuvieron los índices de retención de Kovats a partir de su tiempo de retención relativo a los de la coelución de estándares de *n*-alcanos (C₈-C₂₄), en el cual, el software realiza los cálculos requeridos para la obtención de este índice y, finalmente realizar la comparación de éstos con los que se encuentran en las librerías electrónicas. En la **Figura 17** se muestra a manera de ejemplo, la manera en la que se realiza la obtención de los índices de Kovats.

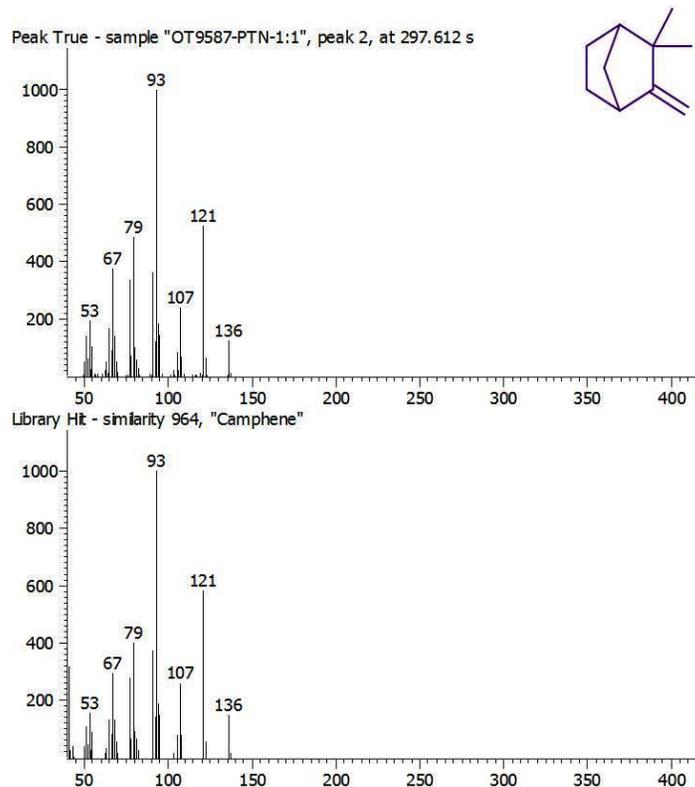


Figura 20. Espectros de masas del canfeno (Arriba: Espectro obtenido experimentalmente. Abajo: Espectro obtenido de la librería NIST 2.0).

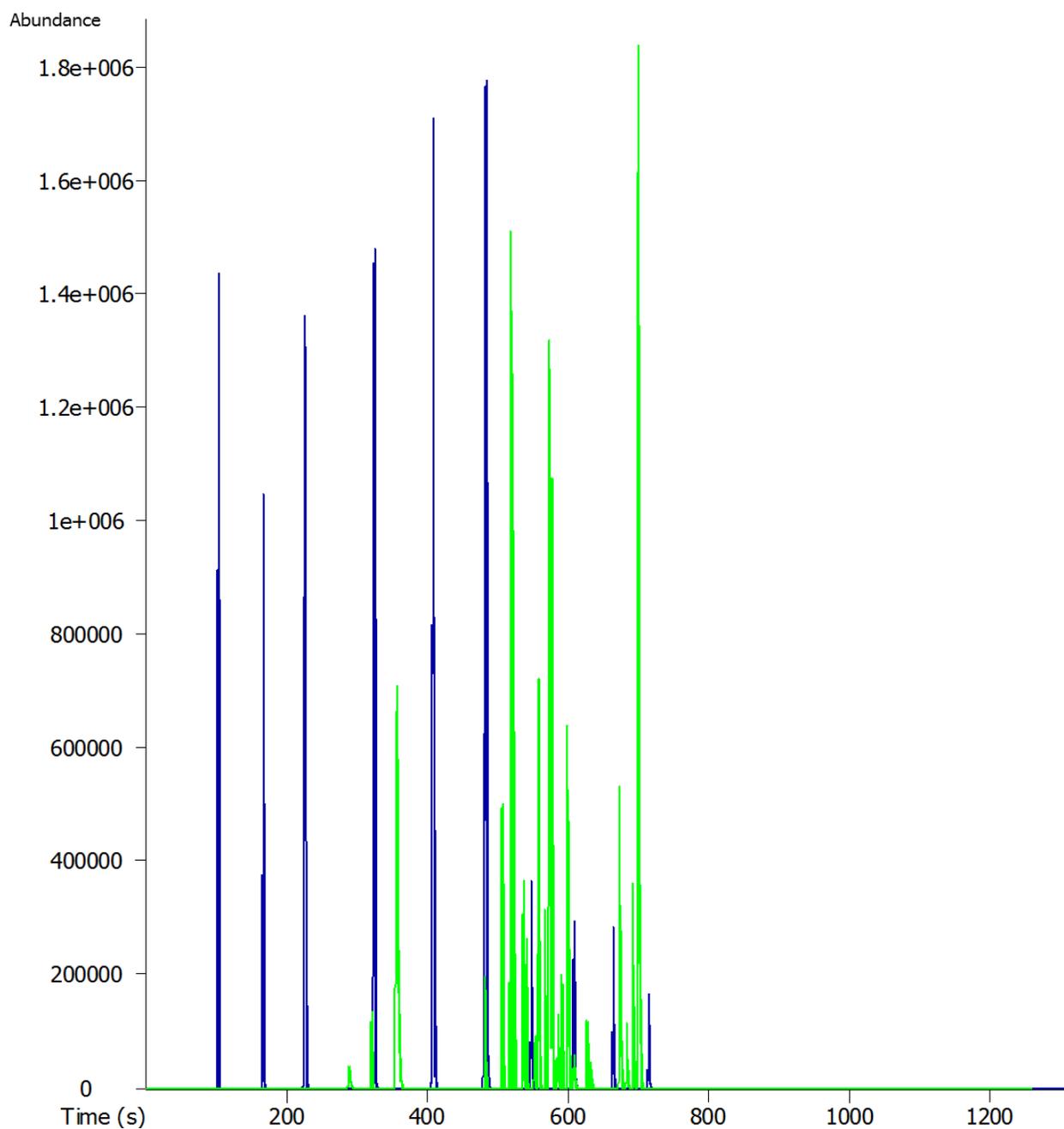


Figura 21. Comparación del cromatograma de los estándares empleados (C₈-C₂₄) (color azul) con el cromatograma obtenido del propóleo proveniente del apiario Don Nico (color verde) para la obtención de los índices de Kovats.

5.3 Análisis estadístico.

Para realizar el análisis de componentes principales, se obtuvieron los porcentajes de cada componente volátil obtenido en la CG de las diferentes muestras analizadas señaladas en el **Cuadro 11** ubicado en la sección de Anexos.

Asimismo, como se mencionó en el apartado de la Parte Experimental, se realizó un ANOVA para cada compuesto de cada una de las muestras analizadas en la cual se descartó la muestra 4 proveniente del apiario Acuexcómatl debido a que el valor de la desviación estándar tuvo un valor grande por lo cual no se pudo introducir sus datos dentro del programa en el que se hizo el ACP. Por otra parte, también se eliminaron aquellos compuestos que no tuvieron diferencia significativa.

5.3.1 Análisis de Componentes Principales.

El análisis de componentes principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información de un estudio, el cual tiene como objetivo reducir estos datos a un número menor pero tratando de perder la menor cantidad de información posible. El primer componente principal (CP) trata de explicar la máxima variación posible en los datos de una dirección, el segundo componente explica la variación una vez eliminada la explicada por el primer componente, y así sucesivamente (Miller & Miller, 2002).

5.3.1.1 Evaluación de los ésteres volátiles.

Si se toma en cuenta como criterio de retención de componentes, aquellos cuyo valor propio (Eigenvalue) es superior a la unidad, el ACP considera a los primeros tres componentes (siendo un acumulado de 98.07 % de la varianza original).

Cuadro 12. Contribución de los componentes a la varianza original.

No. ACP	Valor Propio (Eigenvalues)	Valor de contribución (%)	Frecuencia acumulada (%)
1	30.3953	76.89	76.89
2	6.62445	16.76	93.64
3	1.75012	4.43	98.07
4	0.63901	1.62	99.69
5	0.08105	0.21	99.89

Cuadro 12. Contribución de los componentes a la varianza original (continuación).

6	0.02497	0.06	99.95
7	0.01729	0.04	100

El **Cuadro 13** representa la matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos. Se observa que en la primera columna (CP1), los coeficientes con mayor peso son los ésteres: salicilato de homomentilo (E1), salicilato del 2-etilhexilo (E8), tridecanoato de metilo (E6), formiato de isobornilo (E7) y propanoato del 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)propilo (E15); siendo el salicilato de homomentilo el de mayor valor. En la segunda columna (CP2) los de mayor peso son los ésteres: tridecanoato de metilo (E6), y propanoato del 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)propilo (E15), salicilato de homomentilo (E1), hexanoato de hexilo (E14) y nonanoato de metilo (E4), siendo tridecanoato de metilo (E6) el de mayor valor.

Cuadro 13. Matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos

Variable	Axis 1 (Eigenvalues)	Axis 2 (Eigenvalues)
E1	0.94589 ^a	-0.08478 ^b
E3	-0.00677	0.01617
E4	-0.03436	0.07252 ^b
E6	-0.0799 ^a	-0.83028 ^b
E7	0.0783 ^a	0.01701
E8	0.29862 ^a	-0.02641
E14	-0.01952	0.06339 ^b
E15	-0.04479 ^a	-0.54122 ^b

^aCoeficientes de mayor peso para CP1

^bCoeficientes de mayor peso para CP2

En la **Figura 22** se muestran los resultados del ACP, en ella se puede observar que el primer componente (CP1) explica un 76.89 % de la varianza original y el segundo componente (CP2) explica un 16.76 %. En la columna de frecuencia acumulada del **Cuadro 12**, se observa que el acumulado del primer plano factorial (componente 1 * componente 2) explica un 93.65 %.

La muestra Don Nico (6) es la muestra diferente y presenta una mayor intensidad del salicilato de homomentilo (E1). Este compuesto se ha reportado como componente de la fracción volátil en las hojas de *Rumex induratus* (Taveira *et al.*, 2009) y en el extracto de *Embllica officinalis* (Hansenne *et al.*, 2004) como agente protector de los rayos ultravioleta.

En cambio la muestra Bonilla (3), presenta mayor intensidad de los ésteres: propanoato del 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil) propilo (E15) y tridecanoato de metilo (E6), éste último tiene como relevancia su empleo como biomarcador para abejas polinizadoras (Williams *et al.*, 2012).

El resto de las muestras: Trojes (1), Tepenáhuatl (2), Israel (5), Panteón (7), Valentín (8), Mellipona (9) y Scaptotrigona (10), son similares entre sí, caracterizados por tener una mayor intensidad de los ésteres: octanoato de etilo (E3), nonanoato de metilo (E4), formiato de isobornilo (E7), salicilato del 2-etilhexilo (E8), y hexanoato de hexilo (E14).

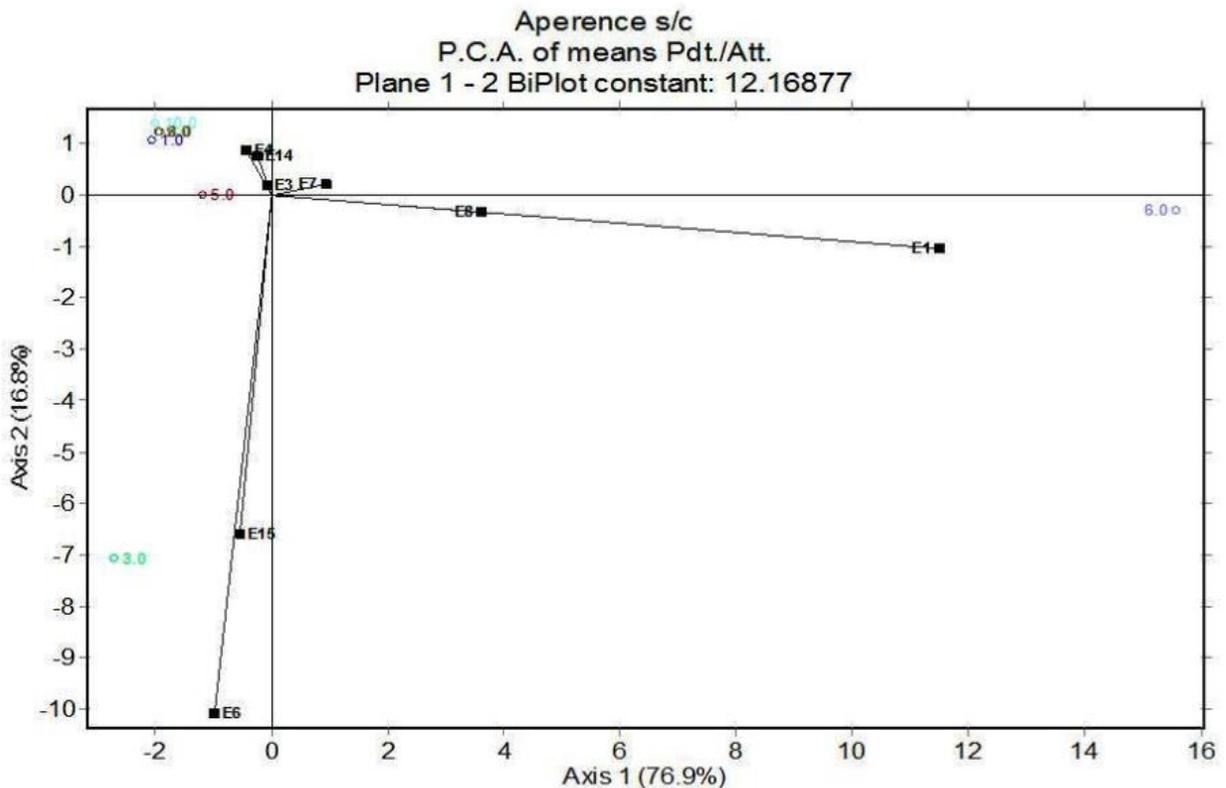


Figura 22. Diagrama de análisis de componentes principales (ACP) de ésteres.

5.3.1.2 Resultados de la evaluación de los compuestos volátiles de naturaleza terpenoide.

Si se toma en cuenta como criterio de retención de componentes, aquellos cuyo valor propio (Eigenvalue) es superior a la unidad, el ACP considera a los primeros ocho componentes (siendo un acumulado de 99.64 % de la varianza original).

Cuadro 14. Contribución de los componentes a la varianza original.

No. ACP	Valor Propio (Eigenvalues)	Valor de contribución (%)	Frecuencia acumulada (%)
1	229.85595	45.67	45.67
2	104.80768	20.82	66.49
3	65.93402	13.1	79.59
4	41.95517	8.34	87.92
5	24.27558	4.82	92.75
6	17.10455	3.4	96.14
7	9.45068	1.88	98.02
8	8.16491	1.62	99.64
9	0.90184	0.18	99.82
10	0.59209	0.12	99.94
11	0.17809	0.04	99.98
12	0.05982	0.01	99.99
13	0.02863	0.01	99.99
14	0.01385	0	100

El **Cuadro 15** presenta la matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos. Se observa que la primera columna (CP1) los coeficientes con mayor peso son los terpenos: α -pineno (T22), limoneno (T6), cariofileno (T31), 3-careno (T37), silvestreno (T83), canfeno (T1), eucalipto (T27), *trans*- β -bergamoteno (T42), α -pinocarvona (T53) y *p*-menta-1,3,8-trieno (T82). En la segunda columna (CP2) se correlacionaron los terpenos: 3-careno (T37), silvestreno (T83), cariofileno (T31), limoneno (T6), *p*-menta-1,3,8-trieno (T82), α -pineno (T22), germacreno (T28), eucalipto (T27), verbenona (T61), α -pinocarvona (T53), (*E*)-pinocarveol (T11), canfeno (T1), α -terpineol (T8), δ -cadineno (T19), α -burboneno (T30), *o*-cimeno (T5), 3-pinanona (T52), (1*R*)-mirtenal (T60), copaeno (T16), *p*-menta-3-en-9-ol (T35) y β -camigreno (T25).

Cuadro 15. Matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos.

Variable	Axis 1 (Eigenvalues)	Axis 2 (Eigenvalues)	Variable	Axis 1 (Eigenvalues)	Axis 2 (Eigenvalues)
T1	0.0664 ^a	-0.05455 ^b	T42	-0.04745 ^a	0.02455
T2	0.00047	0.00197	T45	0.01637	0.03662
T4	0.00111	0.00127	T46	0.00501	0.00575
T5	0.00469	0.0497 ^b	T47	0.00461	0.00992
T6	0.34987 ^a	-0.36667 ^b	T52	0.01534	0.04523 ^b
T8	0.03211	0.05287 ^b	T53	0.04617 ^a	0.05933 ^b
T11	0.03629	0.05873 ^b	T55	0.01386	0.04304
T16	-0.03053	0.04398 ^b	T56	0.01852	0.02122
T19	0.00416	0.05125 ^b	T57	0.00569	0.02368
T20	-0.0166	0.02083	T58	0.00295	0.01232
T21	-0.00293	0.00152	T60	0.02124	0.04444 ^b
T22	0.52852 ^a	0.19555 ^b	T61	0.01479	0.06165 ^b
T23	-0.0011	0.02216	T62	-0.01589	0.02002
T25	-0.01105	0.04109 ^b	T63	-0.00431	0.00945
T27	0.05781 ^a	0.069 ^b	T65	-0.02675	0.0216
T28	0.02039	0.08574 ^b	T72	-0.01084	0.00561
T29	0.0014	0.00449	T74	-0.01904	0.00985
T30	0.01313	0.04981 ^b	T75	-0.00322	0.00167
T31	-0.69607 ^a	-0.37017 ^b	T76	-0.02402	0.01243
T32	0.00902	0.01272	T79	0.00519	-0.01084
T33	0.00074	0.00535	T80	0.01063	-0.00491
T35	0.0052	0.04253 ^b	T81	0.01056	-0.02841
T36	0.00052	0.00415	T82	0.0407 ^a	-0.10828 ^b
T37	0.22618 ^a	-0.5869 ^b	T83	0.19908 ^a	-0.52851 ^b
T40	0.00465	-0.00896	T84	0.01929	0.02125
T41	-0.01289	0.00667	T85	0.00839	0.00925

^aCoefficientes de mayor peso para CP1
^bCoefficientes de mayor peso para CP2

Los resultados del ACP se muestran en la **Figura 23**, se puede observar que el primer componente (CP1) explica un 45.67 % de la varianza original y el segundo componente (CP2) explica un 20.82 %. Si observamos en la columna de frecuencia acumulado del **Cuadro 14**, el primer plano factorial (componente 1* componente 2) explica un 66.49 %.

La muestra Bonilla (3) y la muestra proveniente del apiario Tepenáhuatl (2) se distinguen del resto de las mismas; presentando la muestra Bonilla mayor intensidad del cariofileno (T31). Este compuesto cumple una función de supervivencia evolutiva incrementando su biosíntesis y su liberación en plantas parasitadas por insectos herbívoros, y así poder atraer a los insectos depredadores para reducir el daño producido por los herbívoros (García *et al.*, 2010).

En tanto que en muestra de Tepenáhuatl los terpenos limoneno (T6), silvestreno (T83) y 3-careno (T37). El limoneno, es el segundo terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza y es un producto intermedio en la biosíntesis de otros terpenos, pero también tiene actividad repelente además de insecticida (García *et al.*, 2010). Estudios en animales sugieren que el limoneno tiene efectos ansiolíticos, produciendo un incremento de los neurotransmisores serotonina y dopamina en el cerebro. El limoneno produce también la apoptosis, o muerte celular, de las células de cáncer de mama y actualmente se está probando su efectividad en ensayos clínicos (Gould, 1997). Por último, se ha patentado el uso del limoneno contra el reflujo gastro-esofágico (Jidong, 2007).

Las muestras Trojes (1), Don Nico (6), Panteón (7), Valentín (8) y Mellipona (9) tiene mayor intensidad de los terpenos: α -pineno (T22), limoneno (T6), 3-careno (T37), silvestreno (T83), germacreno (T28), eucalipto (T27), verbenona (T61), α -pinocarvona (T53), (*E*)-pinocarveol (T11), δ -cadineno (T19) y α -terpineol (T8).

Recientemente, el α -pineno se detectó en altas concentraciones en muestras de propóleo estoniano (Kaškoniene *et al.*, 2014), y es uno de los componentes principales de la resina de pino y de otras coníferas; y justo por esta razón tiene este nombre, aunque es el terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza. De hecho, forman parte del sistema químico de comunicación de los insectos y actúa como repelente para los insectos (García *et al.*, 2010).

Las muestras Israel (5) y Scaptotrigona (10) tienen una mayor intensidad de los terpenos óxido de (2)-aromadendreno (T76), óxido de cariofileno (T65), copaeno (T16), *trans*- β -bergamoteno (T42), cariofileno (T31), α -pineno (T22), germacreno

(T28), α -pineno (T22), eucalipto (T27), verbenona (T61), α -pinocarvona (T53), (*E*)-pinocarveol (T11), α -terpineol (T8), δ -cadineno (T19), α -burboneno (T30), *o*-cimeno (T5), 3-pinanona (T52), (1*R*)-mirtenal (T60), 3-pinanona (T55), espatulenol (T35) y β -camigreno (T25).

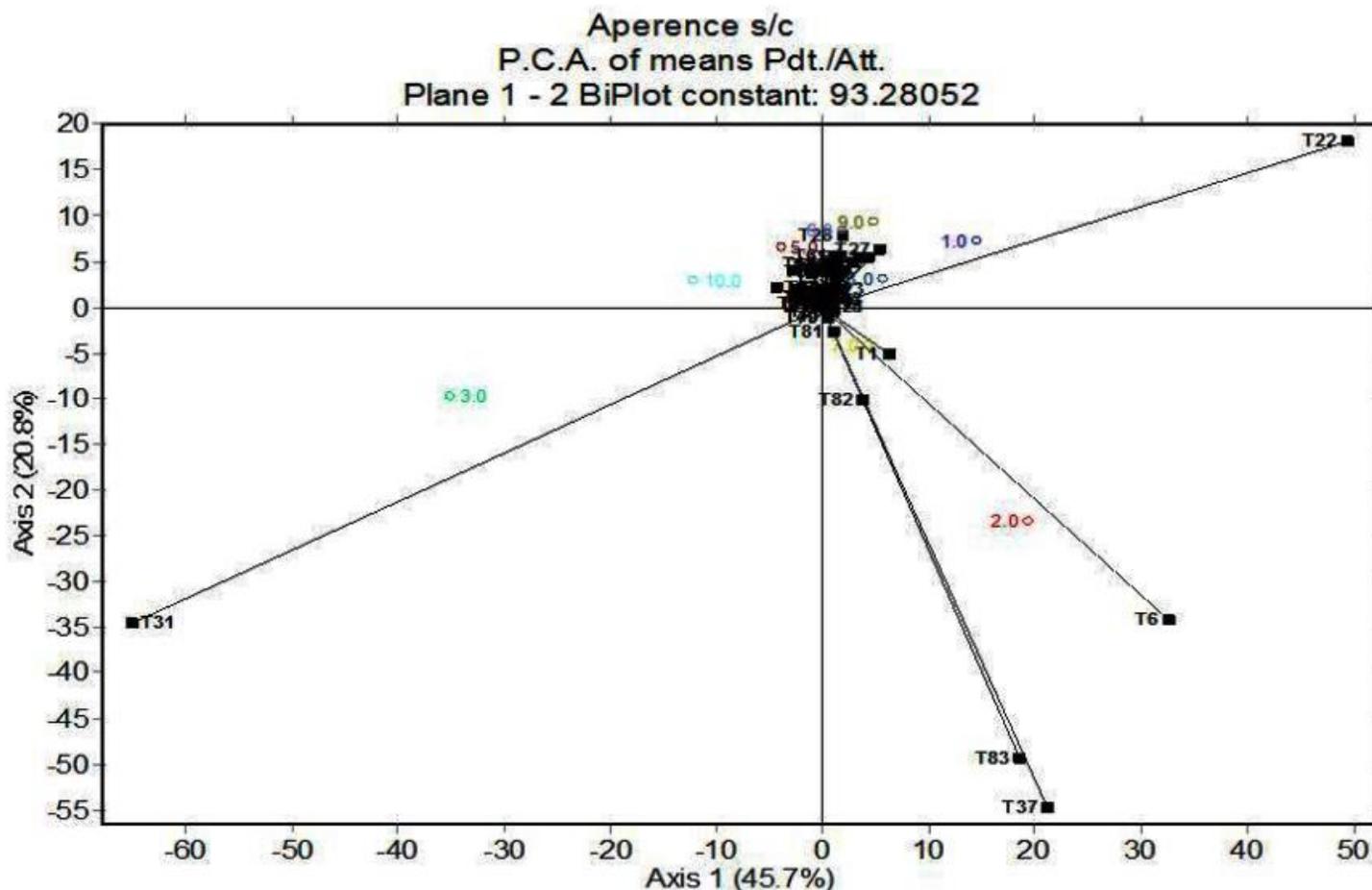


Figura 23. Diagrama de análisis de componentes principales (ACP) de compuestos terpenoides.

5.3.1.3 Resultados de la evaluación de ésteres y terpenoides.

Si se toma en cuenta como criterio de retención de componentes, aquellos cuyo valor propio (Eigenvalue) es superior a la unidad, el ACP considera a los primeros ocho componentes (siendo un acumulado de 99.63 % de la varianza original).

Cuadro 16. Contribución de los componentes a la varianza original.

No. ACP	Valor Propio (Eigenvalues)	Valor de contribución (%)	Frecuencia acumulada (%)
1	234.78309	43.25	43.25
2	109.81781	20.23	63.48
3	68.94289	12.7	76.18
4	56.97756	10.5	86.67
5	24.61309	4.53	91.21
6	20.7486	3.82	95.03
7	14.76558	2.72	97.75
8	10.23922	1.89	99.63
9	0.90587	0.17	99.8
10	0.71505	0.13	99.93
11	0.18612	0.03	99.97
12	0.07982	0.01	99.98
13	0.03809	0.01	99.99
14	0.02495	0	99.99
15	0.01695	0	100

El **Cuadro 17** presenta la matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos. Se observa que la primera columna (CP1) los coeficientes con mayor peso son para los ésteres: tridecanoato de metilo (E6), propanoato del 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)propilo (E15), nonanoato de metilo (E4), y salicilato de homomentilo (E1); y para los terpenoides correspondientes a: cariofileno (T31), α -pineno (T22), eucalipto (T27), 3-careno (T37), silvestreno (T83), canfeno (T1), α -pinocarvona (T53), *trans*- β -bergamoteno (T42), (*E*)-pinocarveol (T11), α -terpineol (T8), copaeno (T16), *p*-menta-1,3,8-trieno (T82), óxido de (2)-aromadendreno (T76), óxido de cariofileno (T65), germacreno (T28), *m*-cimeno (T84), γ -selineno (T74), β -cubebeno (T41), α -burboneno (T30) y α -muuroleno (T20). En la segunda columna (CP2) los ésteres: salicilato de homomentilo (E1), salicilato de 2-etilhexilo (E8), tridecanoato de metilo (E6), nonanoato de metilo (E4) y propanoato del 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)propilo (E15); mientras que se correlacionaron los terpenos: silvestreno (T83), 3-careno (T37), cariofileno (T31), limoneno (T6), copaeno (T16), δ -cadineno (T19), α -burboneno (T30), espatulenol (T35), β -mirceno (T81), *m*-cimeno (T84), óxido de cariofileno (T65), β -camigreno (T25), 3-pinanona (T52), α -pinocarvona (T53), terpinen-4-ol (T55), mirtenol (T56), *p*-

cimeno (T57), alcanfor (T58), (1*R*)-mirtenal (T60), verbenona (T61), *trans*- β -bergamoteno (T42), α -canfenal (T45), canfeno (T1), *o*-cimeno (T5), α -terpineol (T8), (*E*)-pinocarveol (T11), copaeno (T16), δ -cadineno (T19) y α -muuroleno (T20).

Cuadro 17. Matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos.

Variabl e	Axis 1 (Eigenvalues)	Axis 2 (Eigenvalues)	Variabl e	Axis 1 (Eigenvalues)	Axis 2 (Eigenvalues)
E1	-0.01825 ^a	0.22589 ^b	T36	-0.00062	0.006
E3	-0.00651	-0.00738	T37	-0.218 ^a	-0.56244 ^b
E4	-0.02659 ^a	0.03177 ^b	T40	-0.00463	-0.00844
E6	0.11811 ^a	-0.05476 ^b	T41	0.01229 ^a	0.00516
E7	-0.0091	0.02711	T42	0.04525 ^a	0.01898 ^b
E8	-0.00636	0.06934 ^b	T45	-0.01628	0.02643 ^b
E14	0.01508	0.00633	T46	-0.00495	0.00278
E15	0.07714 ^a	-0.04324 ^b	T47	-0.00458	0.00707
T1	-0.06473 ^a	-0.05255 ^b	T52	-0.01527	0.03753 ^b
T2	-0.00048	0.00165	T53	-0.04543 ^a	0.04395 ^b
T4	-0.0011	0.00061	T55	-0.01385	0.03406 ^b
T5	-0.00504	0.04141 ^b	T56	-0.01831	0.01026 ^b
T6	-0.34084	-0.37942 ^b	T57	-0.00572	0.01983 ^b
T8	-0.03177 ^a	0.03659 ^b	T58	-0.00297	0.01032 ^b
T11	-0.03583 ^a	0.04323 ^b	T60	-0.02098	0.03721 ^b
T16	0.0274 ^a	0.0611 ^b	T61	-0.01485	0.05162 ^b
T19	-0.00592	0.07529 ^b	T62	0.01499	0.01605
T20	0.01524 ^a	0.02653 ^b	T63	0.00404	0.00772
T21	0.00279	0.00117	T65	0.02543 ^a	0.01715 ^b
T22	-0.52137 ^a	0.19473	T72	0.01033	0.00434
T23	0.00052	0.01645	T74	0.01816 ^a	0.00762
T25	0.01047	0.03445 ^b	T75	0.00307	0.00129
T27	-0.05973 ^a	0.11138	T76	0.0229 ^a	0.00961
T28	-0.02215 ^a	0.11011	T79	-0.00516	-0.01006
T29	-0.00158	0.00779	T80	-0.01092	0.00274
T30	-0.01459 ^a	0.07466 ^b	T81	-0.01014	-0.02734 ^b
T31	0.69604 ^a	-0.32284 ^b	T82	-0.03907 ^a	-0.1042
T32	-0.00908	0.0132	T83	-0.19109 ^a	-0.50854 ^b

Cuadro 17. Matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos (continuación).

Variabl e	Axis 1 (Eigenvalues)	Axis 2 (Eigenvalues)	Variabl e	Axis 1 (Eigenvalues)	Axis 2 (Eigenvalues)
T33	-0.0009	0.00809	T84	-0.0189 ^a	0.01778 ^b
T35	-0.00622	0.05894 ^b	T85	-0.00822	0.00774

^aCoefficientes de mayor peso para CP1

^bCoefficientes de mayor peso para CP2

Los resultados del ACP se muestran en la **Figura 24**, en donde se puede observar que el primer componente (CP1) explica un 43.2 % de la varianza original y el segundo componente (CP2) explica un 20.2 %. Asimismo, si observamos en la columna de acumulado el primer plano factorial (componente 1 * componente 2) explica un 63.4 %.

Presentan similitudes las muestras correspondientes a Bonilla y Scaptotrigona, siendo diferentes de las muestras Trojes, Tepenáhuatl, Israel, Don Nico, Panteón, Valentín y Mellipona. Las muestras Bonilla y Scaptotrigona se caracterizan por presentar en mayor intensidad el cariofileno (T31) y los ésteres: tridecanoato de metilo (E6) y propanoato de 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)propilo (E15); el resto de las muestras presentan con mayor intensidad los terpenos: 3-careno (T37), 6-canfenol (T85), α -pineno (T22) y limoneno (T6); y en menor intensidad los terpenoides: canfeno (T1), α -felandreno (T2), germacreno (T28), β -mirceno (T81) y *p*-menta-1,3,8-trieno (T82) en general estas muestras fueron ricas en terpenoides y ésteres.

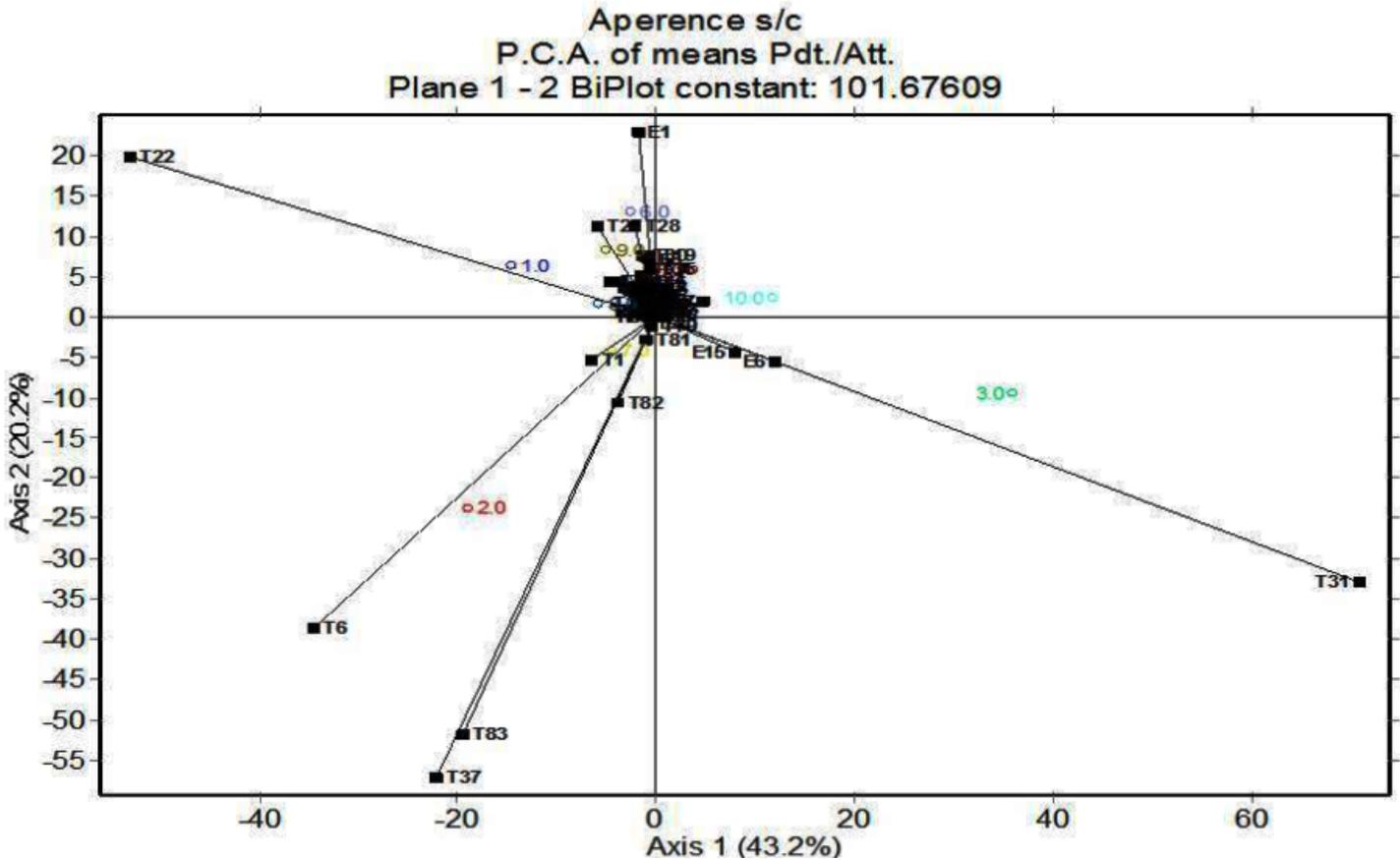


Figura 24. Diagrama de análisis de componentes principales (ACP) de ésteres y terpenoides.

5.3.2 Análisis de Cluster.

El Análisis de Cluster es un método para dividir un grupo de objetos en una serie de clases, de tal manera que los objetos que sean similares se encuentren dentro de la misma clase. Este análisis busca objetos que se encuentren próximos en el espacio de las variables. Para la búsqueda de estos "conglomerados" se inicia considerando que cada objeto conforma un cluster de tamaño uno y compara la distancia entre éstos, los dos puntos que se encuentre más próximos se unen para formar uno nuevo (Miller & Miller, 2002).

Para conocer la similitud entre las muestras se realizó un análisis de cluster, por el método de Ward's Euclidean (**Figura 25**), donde se encontró que las muestras de Trojes, Tepenáhuatl, Bonilla, Valentín e Israel son similares con base en el contenido

de compuestos alifáticos, aldehídos y terpenoides, formado un grupo; esto se debe a que las cuatro muestras fueron recolectadas en apiarios ubicados a no más de 1 km entre ellos en la Delegación Milpa Alta, Distrito Federal.

Por otro lado, las muestras de Don Nico y Panteón forman un segundo grupo; en el que destacan como componentes principales el eucaliptol, α -pineno y limoneno. Estos compuestos son abundantes en los bosques de coníferas, donde se encuentran principalmente, en el ocote (*Pinus montezumae*) y el encino (*Quercus rugosa*) (Lange & Sponoudaki, 1995; Pearse *et al.*, 2013).

Asimismo, las muestras de Mellipona y Scaptotrigona no se agruparon. Este resultado es congruente debido a que éstas muestras son las correspondientes a las abejas *Mellipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana*, respectivamente. Las abejas meliponas y trigonas se caracterizan por producir el llamado "geopropóleo". Los compuestos mayoritarios detectados en la muestra de Mellipona fueron: α -pineno, estireno, cariofileno, óxido de cariofileno, copaeno, espatulenol y burboneno. En tanto que para la muestra de Scaptotrigona, los compuestos mayoritarios son: α -pineno, β -bergamoteno, copaeno, cariofileno y el óxido de (2)-aromadendreno. Todos estos compuestos mencionados son representativos en el álamo (*Populus nigra*), el cedro (*Cedrela odorata*), el ocozote (*Liquidambar styraciflua*) y el alamillo (*Populus tremula*) (Jerkovic & Mastelic, 2003; Hartikainen *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2009)

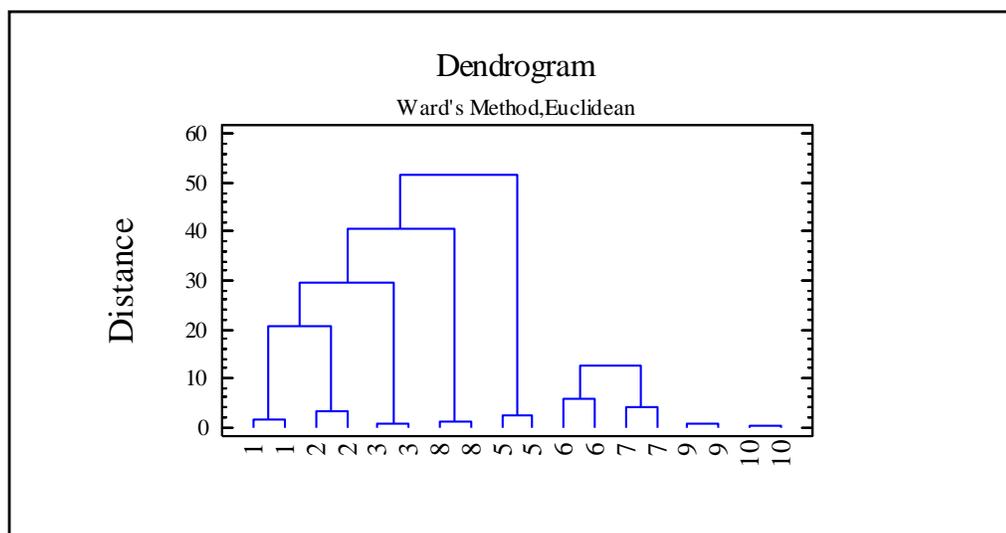


Figura 25. Dendrograma del análisis por cluster para las muestras de propóleo con base en el contenido de compuestos alifáticos, aldehídos y terpenoides.

Cuando se evaluó la similitud entre las muestras (método de Ward's Euclidean) con base en el contenido de alcoholes, aldehídos, compuestos alifáticos, cetonas y ésteres, se encontró que las muestras de Trojes, Bonilla, Tepenáhuatl, Israel y Valentín y son similares formado un grupo, por otro lado Don Nico y Panteón fueron similares. Por último Mellipona y Scaptotrigona fueron diferentes del resto de las muestras (**Figura 26**). Teniendo un comportamiento igual al anterior.

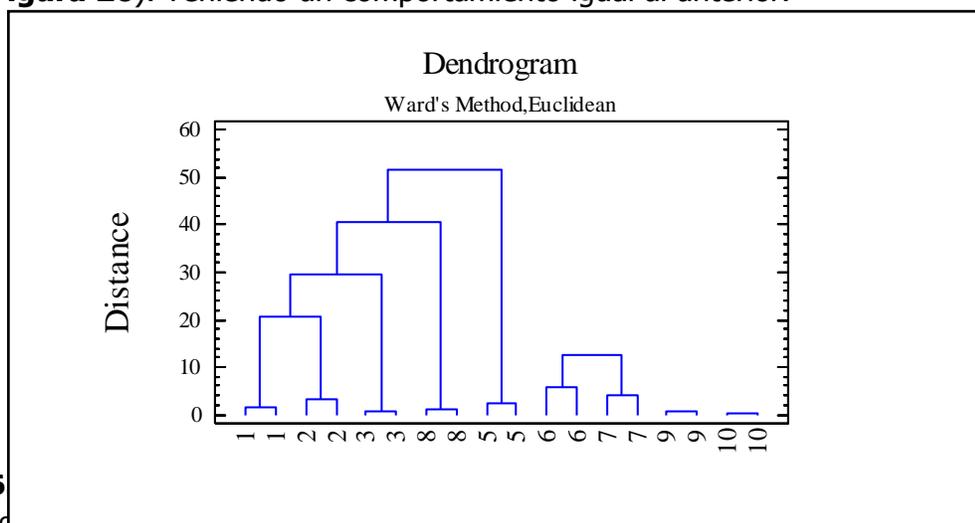
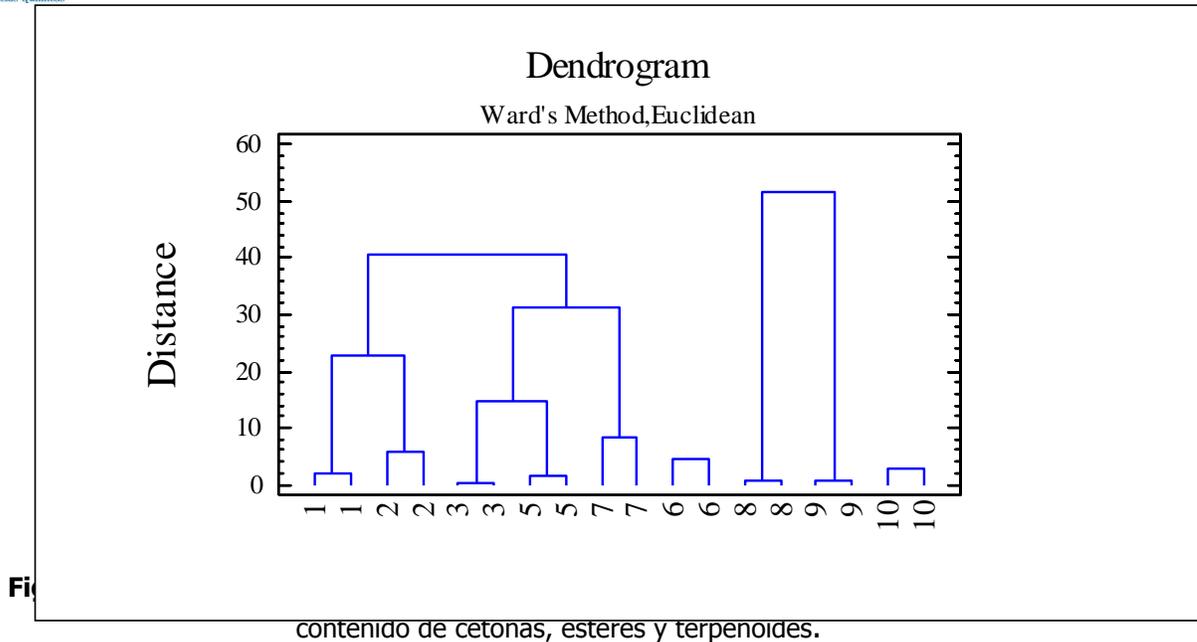


Figura 26

En última instancia, se evaluó la similitud de las muestras considerando el contenido de contenido de cetonas, ésteres y terpenoides (**Figura 27**), encontrándose que las muestras de propóleos de Trojes, Tepenáhuatl, Bonilla, Israel y Panteón son similares formado un grupo. Por otro lado, se agruparon las muestras de Valentín y Mellipona; estas muestras tienen como compuestos volátiles similares al limoneno, α -pineno, terpinoleno y copaeno; los cuales se encuentran en los bosques de coníferas y son abundantes en el encino (*Quercus rugosa*) y el ocote (*Pinus montezumae*), y bosques mesófilos donde habitan el álamo (*Populus nigra*), el alamillo (*Populus tremula*) y el álamo blanco (*Platanus mexicana*) (Lange & Sponoudaki, 1995; Hartikainen *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2009; Pearse *et al.*, 2013). Sin embargo, al analizar las muestras Don Nico y Scaptotrigona, se observa que no hay una similitud con otras muestras, lo que indica que los componentes minoritarios permiten diferenciar a estas muestras. Pero de manera general, y considerando todos los compuestos estudiados en la muestra perteneciente a Scaptotrigona es claramente diferente del resto.



5.4 Evaluación de la actividad biológica.

5.4.1 Actividad antimicrobiana (CMI).

El estudio de productos de origen natural se incrementa día con día, principalmente por el hecho de que representan una alternativa para la búsqueda de compuestos activos eficaces y menos tóxicos, para el tratamiento de padecimientos ocasionados por bacterias (Farooqui & Farooqui, 2012). Uno de los productos que se utilizan con mayor frecuencia para el tratamiento de estas enfermedades es el propóleo. Sin embargo, los estudios conducentes a determinar actividad biológica son escasos (Aliyazicioglu *et al.*, 2013). Por esta razón se decidió determinar el efecto de los extractos etanólicos del propóleo sobre el crecimiento de bacterias del grupo *viridans* y la inhibición en la formación de biocapas mono especie por *S. mutans*. Estos estreptococos son parte de la flora normal de la boca y en promedio representan del 28 % al 46 % del total de la flora cultivable en la boca junto con otras bacterias. Aunque se considera que son bacterias de poca virulencia, se ha demostrado su importancia clínica en procesos como bacteriemias, endocarditis y, en menor grado, meningitis y neumonía (Cardoso, 2007). Este tipo de bacterias producen glucosiltransferasas (GTFs), las cuales les dan la capacidad de sintetizar glucanos a partir de sacarosa. Estos glucanos permiten la adherencia de las bacterias en la

superficie de los dientes para la formación de la placa dentobacteriana (Pimenta *et al.*, 2004).

Los resultados para este ensayo (**Cuadro 18**) indican que los extractos con mejores CMI, fueron los extractos derivados de los apiarios "Don Nico" con una CMI de 341 $\mu\text{g/mL}$ contra la cepa *S. oralis* al igual que el de "Israel" con una CMI de 328 $\mu\text{g/mL}$ y "Panteón", con una CMI de 656 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. mutans*. Es importante destacar que un extracto preparado a partir de materiales vegetales se considera activo si presenta una CMI menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Ríos *et al.*, 1988).

Cuadro 18. Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos.

	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
Acuexcómatl	>1000	>1000	>1000
Bonilla	>1000	>1000	>1000
Don Nico	>1000	341	>1000
Israel	>1000	328	>1000
Panteón	656	>1000	>1000
Tepenáhuatl	>1000	>1000	>1000
Trojes	>1000	>1000	>1000
Valentín	>1000	>1000	>1000
Control positivo (CHX)	3.12	6.42	6.42

5.4.2 Inhibición de la formación de biocapa por *Streptococcus mutans*.

La etiología de la caries se encuentra bien establecida y la aparición de la colonización bacteriana es un paso importante para las enfermedades de la cavidad oral, dando lugar a la formación de las biocapas (Nishimura *et al.*, 2012). La caries dental provoca la formación de ácido por bacterias cariogénicas tales como *S. mutans* y los resultados de la interacción de *S. mutans* y otras bacterias relacionadas por la producción de biopelículas en las superficies de los dientes.

Streptococcus mutans es considerada como la bacteria responsable de las caries dentales, debido a sus propiedades acidogénicas junto con su capacidad para sintetizar glucanos extracelulares a partir de sacarosa catalizada por GTFs (Marsh &

Bradshaw, 1995). De manera particular, *S. oralis* y *S. sanguinis* se mantienen bajo el balance ecológico de la flora en la cavidad oral (Nishimura *et al.*, 2012).

Como se mencionó anteriormente, la determinación del efecto sobre la formación de la biocapa por la especie *S. mutans* se realizó siguiendo la metodología de Hwang & Rukayadi (2006). En este método se consideró como el 100 % de adhesión a la medida de absorbancia del carril sin tratamiento, y con base en este resultado se calcularon los porcentajes de inhibición para los extractos de prueba. Por último, es importante destacar que los extractos etanólicos que se probaron fueron aquellos que mostraron tener actividad biológica para el ensayo de actividad antimicrobiana (Don Nico, Israel y Panteón).

Asimismo, como resultados de este ensayo, se obtuvo que, para el extracto etanólico de la muestra proveniente del apiario "Don Nico" el porcentaje de inhibición fue de $27.6 \% \pm 1.2 \%$ a una concentración de 1 mg/mL; para el caso de la muestra "Israel" la inhibición resultante a 0.5 mg/mL fue de $51.0 \% \pm 2.1 \%$; en tanto que para la muestra "Panteón" fue de $25.7 \% \pm 0.7 \%$ a una concentración de 1 mg/mL. Estos resultados son comparables a los reportados por Koo y colaboradores (2002) del efecto de propóleos brasileños sobre la formación de biocapas por *S. mutans*.

6. Conclusiones.

En este proyecto se utilizó la metodología de MEFS en la fase gaseosa, la cual fue capaz de extraer los compuestos volátiles de diez muestras diferentes de propóleos para el posterior análisis de CG-EM-TOF. Esta técnica demostró ser un método útil para la caracterización de compuestos volátiles de propóleos; ya que es una metodología simple, la cual requiere de una etapa de extracción, utiliza poca cantidad de muestra, no emplea disolventes y es de fácil manipulación.

En este trabajo, se analizaron 10 muestras de propóleo de las zonas melíferas del Altiplano y del Golfo de México utilizando HS-MEFS/CG-EM-TOF. Esta técnica permitió la identificación de 140 compuestos volátiles, de los cuales, siete fueron alcoholes, nueve aldehídos, 17 compuestos alifáticos, cinco cetonas, 17 ésteres y 85 terpenoides. Los compuestos más abundantes encontrados en las muestras fueron α -pineno, β -pineno, cariofileno, óxido de cariofileno, octanoato de etilo, nonanoato de metilo, formiato de isobornilo, salicilato del 2-etilhexilo y hexanoato de hexilo. Estos resultados permiten afirmar que el perfil general de los compuestos volátiles presentes en los propóleos recolectados es predominantemente de naturaleza terpenoide.

El ACP permitió determinar los compuestos marcadores representativos en las diferentes muestras de propóleo analizadas. Para los ésteres, la muestra Don Nico presentó una mayor intensidad del salicilato de homomentilo; la muestra Bonilla, presentó mayor intensidad de propanoato del 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil) propilo y tridecanoato de metilo. El resto de las muestras son similares entre sí y se caracterizaron por tener una mayor intensidad de octanoato de etilo, nonanoato de metilo, formiato de isobornilo, salicilato del 2-etilhexilo, y hexanoato de hexilo.

Igualmente, para los terpenoides, las muestra Bonilla se distinguió del resto de las muestras al presentar una mayor intensidad de cariofileno, y la muestra Tepenáhuatl presentó una mayor intensidad de limoneno, silvestreno y 3-careno. Las muestras Trojes, Don Nico, Panteón, Valentín y Mellipona presentaron mayor intensidad de α -pineno, limoneno, 3-careno, silvestreno, germacreno, eucaliptol, verbenona, α -pinocarvona, (*E*)-pinocarveol, δ -cadineno y α -terpineol. Por último las muestras Israel y Scaptotrigona tienen una mayor intensidad de óxido de (2)-aromadendreno, óxido de cariofileno, copaeno, *trans*- β -bergamoteno, cariofileno, α -

pineno, germacreno, α -pineno, eucalipto, verbenona, α -pinocarvona, (*E*)-pinocarveol, α -terpineol, δ -cadineno, α -burboneno, *o*-cimeno, 3-pinanona, (1*R*)-mirtenal (T60), 3-pinanona, espatulenol y β -camigreno.

Del mismo modo, con base en el contenido de ésteres y terpenoides, las muestras Bonilla y Scaptotrigona se caracterizan por presentar con mayor intensidad el cariofileno y los ésteres: tridecanoato de metilo y propanoato de 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)propilo. Y, en lo que respecta al resto de las muestras presentan con mayor intensidad al 3-careno, 6-canfenol, α -pineno y limoneno.

El análisis por clusters utilizando el método de Ward's Euclidean, permitió diferenciar a los propóleos en nueve grupos. Los propóleos de Trojes, Tepenáhuatl, Bonilla, Valentín e Israel son similares con base en el contenido de compuestos alifáticos, aldehídos y terpenoides, formado un grupo. Las muestras de Don Nico y Panteón forman un segundo grupo; en el que destacan como componentes principales el eucaliptol, α -pineno y limoneno. Las muestras de Mellipona y Scaptotrigona no se agruparon. Los compuestos mayoritarios detectados en la muestra de Mellipona fueron: α -pineno, estireno, cariofileno, óxido de cariofileno, copaeno, espatulenol y burboneno. En tanto que para la muestra de Scaptotrigona, los compuestos mayoritarios son: α -pineno, β -bergamoteno, copaeno, cariofileno y el óxido de (2)-aromadendreno.

Asimismo, los extractos etanólicos derivados de los propóleos Don Nico e Israel, demostraron poseer actividad sobre el crecimiento de *S. oralis* con CMI de 341 μ g/mL y de 328 μ g/mL, respectivamente. El extracto etanólico derivado de la muestra Panteón tuvo una CMI de 656 μ g/mL sobre *S. mutans*. Estas actividades son comparables a las descritas previamente por Koo y colaboradores para propóleos brasileños (Koo *et al.*, 2002).

Por último, los extractos de Don Nico (27.6 % \pm 1.2 %), Israel (51.0 % \pm 2.1 %) y Panteón (25.7 % \pm 0.7 %) inhibieron las formación de la biocapa monoespecie producida por *S. mutans* a concentraciones de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente. Estos resultados obtenidos indican que los extractos etanólicos derivados de los propóleos del Altiplano mexicano poseen una actividad por lo que pueden ser utilizados para desarrollar agentes inhibidores de la biocapa.

7. Perspectivas.

- ✓ Ampliar la recolección y el análisis de muestras de propóleo de diferentes regiones melíferas de México con la finalidad de determinar la composición de sus componentes volátiles.
- ✓ Desarrollar un método analítico por CL-EM para analizar la fracción no volátil de los diferentes propóleos.
- ✓ Estudiar a detalle la inhibición del crecimiento bacteriano por los extractos etanólicos derivados de los propóleos analizados con la finalidad de determinar el mecanismo mediante el cual los propóleos afectan el crecimiento bacteriano.
- ✓ Establecer el mecanismo mediante el cual los extractos derivados del propóleo afectan la formación de las biocapas monoespecie por *S. mutans*.
- ✓ Realizar estudios conducentes a determinar las principales fuentes botánicas de los propóleos de las diferentes zonas melíferas de México.

8. Bibliografía.

- Adams, R. (2001). *Identification of essential oils by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry*. 3rd edition. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Agüero M., Svetaz L., Sánchez M., Luna L., Lima B., López M., Zacchino S., Palermo J., Wunderlin D., Feresin G., Tapia A. (2011). Argentinean andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1970–1978.
- Aliyazicioglu, R., Sahin, S., Erturk, O., Ulusoy, E., Kolayil, S. (2013). Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 16: 277-287.
- Arthur, C. L. & Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62: 2145-2148.
- Bachiega, T. F., Orsatti, C. L., Pagliarone A. C., Sforcin, J. M. (2012). The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages. *Phytotherapy Research*, 26: 1308–1313.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of Propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 114-117.
- Bankova V, Christov R, Popov S, Pureb O, Bocari G. (1994). Volatile constituents of propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 49: 6–10.
- Bankova V, Christov R, Popov S, Marcucci MC, Tsvetkova I, Kujumgiev A. (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70: 190–193.
- Bankova, V. S., De Castro, S. L., Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apodologie*, 31: 3-15.
- Banskota, A. H., Nagaoka, T., Sumioja, L. Y. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 67-73.

- Barquero, Q. M. (2006). *Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases*. 1ª Edición. Editorial Universidad de Costa Rica, pp. 28-30.
- Ben-Yehoshua, S., Borowitz, C., Hanu's, L. O. (2012). Frankincense, Myrrh, and Balm of Gilead: ancient spices of Southern Arabia and Judea. *Horticultural Reviews*, 39: 1–76.
- Bogdanov, S. (2012). Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*, 1-40.
- Boyanova L., Derejian S., Koumanova R. (2003). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: Preliminary report. *Journal of Medical Microbiology*, 52: 417-419.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363.
- Gardoso, G. (2007). Estreptococo del grupo viridans y profilaxis ambulatoria secundaria a procedimientos dentales. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 81: 30-31.
- Castaldo, S. & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73: S1–S6.
- Castrillón Rivera, L. E., Palma Ramos, A., Padilla Desgarenes, M. C. (2010). Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Revista Mexicana*, 54: 14-24.
- Cheng, H., Qin, Z., Guo, X., Hu, x., Wu, J. (2013). Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 51: 813-822.
- Chia-Nana C., Chia-Lib W., Jen-Kuna L. (2004). Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome C release in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 67: 53-66.
- Daleprane, J. B. & Abdalla, D. S. (2013). Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: ID 175135.

- De Albuquerque I., Alves L., Lemos T., Dorneles C., De Morais M. (2008). Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 20: 414–415.
- Derevici, A., Popesco, A., Popesco, N. (1965). Biological properties of propolis. *Revue de Pathologie Comparee*, 2: 21–24.
- Dudareva N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of Plant Volatiles. *American Society of Plant Biologists*, 131: 1893–1902.
- Farooqui, T. & Farooqui, A. (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 4: 779-793.
- Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. (2004). Propolis and human. *Ars Pharmaceutica*, 45: 21-43.
- Fesen, M., Pommier, Y., Leteurtre, E., Hiroguchi, S., Yung, J., Kohn, K. (1993). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochemical Pharmacology*, 48: 595–608.
- Fu Y-X, Xu Y-J, Chen B, Li Y, Luo L-P. (2009). Analysis of volatile components from Inner Mongolia propolis by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 37: 745–748.
- Funari, C. S. & Ferro, V. O. (2006). Análise de própolis. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 26: 171-178.
- García, C., Martínez, A., Ortega, J., Castro F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*, 9: 1-11.
- Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220-1234.
- Gould, M. (1997). Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environmental Health Sciences*, 105: 977–979.
- Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. (1989). Headspace volatiles from propolis. *Flavour and Fragrance Journal*, 4: 173–175.

- Haile K., Kebede T., Dekebo A. (2012). A comparative study of volatile components of propolis (bee glue) collected from Haramaya University and Assela beekeeping centers, Ethiopia. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 26: 353–360.
- Hames-Kocabas E., Demirci B., Uzel A., Demirci F. (2013). Volatile composition of anatolian propolis by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), antimicrobial activity against food contaminants and antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 2140–2149.
- Hansenne, I., Galdi, A., Fares, H., Foltis, P. (2004). Cosmetic composition comprising and extract of *Emblica officinalis* and methods using same. USA, US2004/0028642-A1. Apr. 26, 2002-Feb. 12, 2004.
- Harris, D. C. (2008). *Análisis químico cuantitativo*, 3ª Edición. Editorial Reverté. México, pp. 517-518, 528-532.
- Hartikainen, K., Nerg, A., Kivimaenpaa, M., Kontunen-Soppela, S., Maenpaa, M., Oksanen, E., Rousi, M., Holopainen, T. (2009). Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperatura. *Tree Physiology*, 29: 1163-1173.
- Higashi, K. & De Castro, S. (1995). Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 43: 149-155.
- Holt, R. U. (2001). Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 937: 107-114.
- Huang S., Lu Y., Zhang C., Hu F. (2013). Analysis chemical composition of volatile components before and after ethanol extracting of Brazilian green propolis. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 32: 680–685.
- Hwang, K. & Rukayadi, Y. (2006). In vitro activity of xanthorrhizol against *Streptococcus mutans* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 400-404.

- Ioshida M., Young M., Lago J. (2010). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Brazilian propolis. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13: 633–637.
- Jaganathan, S. K. & Mandal, M. (2009). Antiproliferative Effects of Honey and of its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 830616.
- Janas K. & Bumba V. (1974). Contribution to composition of beeswax propolis. *Pharmazie*, 29: 544–545.
- Jerkovic, I. & Mastelic, J. (2003). Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochemistry*, 63: 109-113.
- Jidong, S. (2007). D-Limonene: Safety and Clinical Applications. *Alternative Medicine Review*, 12: 1-6.
- Kaškonienė V., Kaškonas P., Maruška A., Kubiliene L. (2014). Chemometric analysis of
- volatiles of propolis from different regions using static GC-MS. *Central European Journal of Chemistry*, 12: 736–746.
- Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase micro-extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 800:35-62.
- Keshavarz, M., Mostafaie, A., Mansouri, K., Shakiba, Y., Reza, H., Motlagh, M. (2009). Inhibition of Corneal Neovascularization with Propolis Extract. *Archives of Medical Research*, 40: 59-61.
- Koo, H., Cury, J., Rosalen, P., Ambrosano, G., Ikegaki, M., Park, Y. (2002). Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Research*, 36: 445-448.
- 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.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-12.

- Lagouri, V., Prasianaki, D. Krysta, F. (2013). Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis. *International Journal of Food Properties*, 17: 511-522.
- Lange W. & Spanoudaki M. (1995). The composition of an oleoresin of *Pinus montezumae* Lamb. From Guatemala. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 53: 68-71.
- Langenheim, J. H. (2003). Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, Ethnobotany, *Timber Press*, Cambridge, UK., pp. 586.
- Li Y., Xuan H., Shou Q., Zhan Z., Lu X, Hu F. (2012). Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Human & Experimental Toxicology*, 31: 157–165
- Lofty, M. (2006). Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7: 1-10.
- López-Rivera, P. (2013). Determinación de los compuestos volátiles del geopropóleo producido por abejas Meliponas en el Estado de Veracruz. (Tesis de Licenciatura) Facultad de Química, UNAM.
- Lord, H. & Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A.*, 885: 153-193.
- Lotti, C., Campo Fernandez, M., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., Rastrelli, L. (2010). Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 2209- 2213.
- Maciejewicz W., Scheller S., Daniewski M. (1983). GC-MS investigation of propolis: analysis of sesquiterpenes. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 40: 251–253.
- Marostica J., Daugh A., Moraes C., Queiroga C., Pastore G., Park Y. (2008). Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian Green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28: 178–181.
- Marsh, P. D. & Bradshaw, D. J. (1995). Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 169-175.

- Melliou E, Stratis E, Chinou I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece - antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103: 375–380.
- Miguel M., Nunes S., Cruz C., Duarte J., Antunes M., Cavaco A., Mendes D., Lima A., Pedro L., Barroso J., Figueiredo A. (2013). Propolis volatiles characterisation from acaricide-treated and -untreated beehives maintained at Algarve (Portugal). *Natural Product Research*, 27: 743–749.
- Miller, J. N. & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª. Edición. Editorial Prentice Hall. España, Cap. 8, pp. 221-248.
- Mirzoeva, O. & Calder, P. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55: 441-449.
- Mitscher, L. A., Pillai, S., Shankel, D. (2000). Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medicinal products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 8: 229-234.
- Montenergo, G., Gómez, M., Casaubon, G., Blancic, A., Mujica, A., Peña, R. (2009). Analysis of volatile compounds in three unifloral native Chilean honeys. *Phyton*, 78: 61-65.
- Mukherjee, P. K. (2005). Extraction of herbal drugs. *Quality Control of Herbal Drugs*. 1st Edition, Business Horizons. New Delhi, pp. 379–425.
- Naik D, Vaidya H, Namjoshi T. (2013). Essential oil of Indian propolis: chemical composition and repellency against the honeybee apis florea. *Chemistry & Biodiversity*, 10: 649–657.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. 2ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina, pp. 250-253.
- Nishimura, J., Saito, T., Yoneyama, H., Bai, L., Okumura, K., Isogai, E. (2012). Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* and Related Bacteria. *Advances in Microbiology*, 2: 208-215.
- Oliveira A., França H., Custer R., Teixeira L., Rocha L. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16: 121–130.

- Ota, C., Unterkitcher, C., Fantinato, V. Shimizu M. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44: 375-378.
- Pawliszyn J. (1997). *Solid phase microextraction, theory and practice*. Wiley-VCH, New York, pp. 203.
- Pearse, I., Gee, W., Beck, J. (2013). Headspace Volatiles from 52 oak Species Advertise Induction, Species Identity, and Evolution, but not Defense. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 90-100.
- Pellati, F., Prencipe, F., Benvenuti, S. (2013). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84: 103-111.
- Peres-Neto, P., Jackson, D., Somers, K. (2005). How many principal components? stopping rules for determining the number of non-trivial axes revisited. *Computational Statistics & Data Analysis*, 49: 974–997.
- Petri G, Lemberkovics E, Foldvar M. (1988). Examination of Differences Between Propolis (bee Glue) Produced from Different Floral Environments. In *Flavors and Fragrances: a World Perspective*. Edited by Lawrence BM, Mookherjee BD, Wills BJ. Amsterdam: *Elsevier*, 439–446.
- Pillonel, L., Bosset, J., Tabacchi, R. (2002). Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 35: 1-14.
- Pimenta, D., Alves, A., Morseli, A., Kenupp, J., Cropanese, A. (2004). Comparative Evaluation of *in vitro* Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27: 1834-1839.
- Pino JA, Marbot R, Delgado A, Zumarraga C, Sauri E. (2006). Volatile constituents of propolis from honey bees and stingless bees from Yucatan. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 53–56.
- Poerschmann, J., Gorecki, T., Kopinke, F. (2000). Sorption of very hydrophobic organic compounds onto poly(dimethylsiloxane) and dissolved humic organic matter. 1. Adsorption or partitioning of VHOC on PDMS-coated solid-phase

- microextractionfibers - A never-ending story? *Environmental Science & Technology*, 34: 3824-3830.
- Ríos, J., Recio, M. Villar, A. (**1988**). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127-149.
 - Rubinson, J., Rubinson, N. (**2000**). *Análisis instrumental*. Editorial Prentice Hall. Madrid, pág. 782.
 - Salatino, A., Fernandes-Silva, C., Righi, A., Salatino, M. (**2011**). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28: 925–936.
 - Salomao, K., Pereira, P., Campos, L., Borba, C., Cabello, P., Marcucci, M., De Castro, S. (**2008**). Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 5: 317-324.
 - Samaranayake, L. (**2006**). *Essential microbiology for dentistry*. 3rd. Edition. Churchill Livingstone. China, pp. 115-118, 255-282.
 - Seeley, T. D. & Morse, R. A. (**1976**). The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux, Paris*, 23: 495-512.
 - Sforcin J. M. & Bankova V. (**2011**). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 253-260.
 - Simionatto E., Facco J., Morel A., Giacomelli S., Linares C. (**2012**). Chiral analysis of monoterpenes in volatile oils from propolis. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57: 1240–1243.
 - Simone-Finstrom, M. & Spivak, M. (**2010**). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honeybees. *Apidologie*, 41: 295-311.
 - Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (**2008**). *Principios de Análisis Instrumental*, 6a. Edición. Cengage Learning. México, pp. 788-800.
 - Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., Namiésnik, J. (**2013**). Understanding Solid-Phase Microextraction: Key Factors Influencing the Extraction Process and Trends in Improving the Technique. *Chemical Reviews*, 113: 1667–1685.

- Starzyk, J., Scheller S., Szaflarski J., Moskwa M., Stojko, A. (1977). Biological properties and clinical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittelforschung*, 27: 1198-9.
- Stearman, A., Stierlin, E., Sigman, M., Roubik, D., 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.
- Summya, R., Nemat, A., Nafees, S., Tanveer, A., Wani, A., Syed, K., Kazim, H., Sarwat, S. (2013). Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 5: 337-345.
- Taveira, M., Guedes, P., Gonçalves, R., Andrade, B., Valentão, P. (2009). Determination of eighty-one volatile organic compounds in dietary *Rumex induratus* leaves by GC/IT-MS, using different extractive techniques. *Microchemical Journal*, 93: 67-72.
- Torres R., Lopes J., Moita J., Cito A., Das G. (2008). The volatile constituents of propolis from Piauí. *Química Nova*, 31: 479–485.
- Vaes, W., Mayer, P., Oomen, A., Hermens, J., Tolls, J. (2000). Comments on: Adsorption versus Absorption of Polychlorinated Biphenyls onto Solid-Phase Microextraction Coatings. *Analytical Chemistry*, 72: 639 - 641.
- Villanueva, H., Tuten, J., Haber, W., Setzer, W. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the bark essential oil of *Cedrela odorata* from Monteverde, Costa Rica. *Pharma Chemica*, 1: 14-18.
- Wejnerowska, G. & Gaca, J. (2008). Application of Headspace Solid-Phase Microextraction for Determination of Chloro-Organic Compounds in Sewage Samples. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18: 543-550.
- Williams, P., An, J., Brown, M., Carolan, J., Goulson, M., Huang, J. (2012). Cryptic Bumblebee Species: Consequences for Conservation and the Trade in Greenhouse Pollinators. *New Cryptic Asian Bumblebees*, 7: e32992.

- Xu, H., Wan, M., Dong, H., But, P., Foo, L. (2000). Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. *Biological Pharmacology Bulletin*, 23: 1072–1076.
- Xu, Y. Luo, L. Chen, B., Fu, L. (2009). Recent developments of chemical components in propolis. *Frontiers of Biology in China*, 4: 385–391.
- 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.
- Yildirim Z., Hacievliyagil S., Kurtlu N., Aydin N., Kurkcuglu M., Iraz M., Durmaz R. (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacological Research*, 49: 287–292.

Anexos

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo.

Compuesto	Muestra									
	1		2		3		4		5	
	Trojes		Tepenáhuatl		Bonilla		Acuexcómatl		Israel	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
AC1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.800	0.027
AC2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.959	0.169
AC3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	7.211	0.525
AC4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC8	1.312	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AD1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	30.263	3.151
AD2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.830	0.044
AD3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.763	0.336
AD4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	4.961	0.359
AD5	4.904	0.141	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.879	1.183
AD6	0.145	0.054	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AD7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AD8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.196	4.520	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	1		2		3		4		5	
	Trojes		Tepenáhuatl		Bonilla		Acuexcómatl		Israel	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
AF2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.737	1.042	0.000	0.000
AF3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.910	0.885
AF6	0.000	0.000	0.000	0.000	1.449	0.185	0.000	0.000	0.000	0.000
AF7	0.000	0.000	0.624	0.052	0.638	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000
AF8	0.000	0.000	0.572	0.042	7.230	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF9	0.000	0.000	2.363	0.624	8.339	0.148	0.000	0.000	0.000	0.000
AF10	0.000	0.000	0.000	0.000	9.541	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000
AF11	0.000	0.000	0.000	0.000	14.107	1.590	0.000	0.000	0.000	0.000
AF12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.297	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
AF13	0.000	0.000	0.012	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF14	0.000	0.000	0.719	0.156	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF15	0.000	0.000	0.341	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF16	0.000	0.000	0.333	0.104	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF17	14.822	1.170	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.007	0.019
C2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.168	0.064
C3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	1		2		3		4		5	
	Trojes		Tepenáhuatl		Bonilla		Acuexcómatl		Israel	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
E1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.252	0.356	0.940	0.172
E2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.120	0.034
E3	0.415	0.139	0.458	0.065	0.000	0.000	0.000	0.000	0.132	0.054
E4	4.110	0.145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.907	0.031
E5	0.464	0.141	0.072	0.101	0.000	0.000	0.000	0.000	0.145	0.205
E6	0.632	0.015	0.000	0.000	7.062	0.076	0.000	0.000	1.429	0.665
E7	1.065	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E15	0.000	0.000	0.000	0.000	4.538	0.199	0.000	0.000	0.000	0.000
E16	0.000	0.000	0.000	0.000	5.343	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E17	1.562	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T1	3.211	0.116	3.954	1.544	0.000	0.000	2.884	4.078	0.000	0.000
T2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.872	8.304	0.000	0.000
T3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.752	2.477	0.000	0.000
T4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.070	4.342	0.000	0.000
T5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.026	7.107	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	1		2		3		4		5	
	Trojes		Tepenáhuatl		Bonilla		Acuexcómatl		Israel	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T6	12.522	0.106	20.963	0.474	0.000	0.000	3.698	5.230	0.000	0.000
T7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.100	2.969	0.000	0.000
T8	1.067	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	1.605	2.269	0.000	0.000
T9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.179	3.081	0.000	0.000
T10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.142	0.201	0.000	0.000
T11	2.287	0.230	0.000	0.000	0.000	0.000	1.254	1.773	0.000	0.000
T12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.254	1.773	0.000	0.000
T13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.743	2.464	0.000	0.000
T14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.616	2.285	0.000	0.000
T15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.645	2.326	0.000	0.000
T16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.924	1.307	0.000	0.000
T17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.521	0.737	0.000	0.000
T18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	4.214	5.959	0.000	0.000
T19	0.225	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	1.281	1.811	0.000	0.000
T20	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.705	0.997	0.000	0.000
T21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.427	0.603	0.000	0.000
T22	33.435	2.217	20.782	1.534	1.835	0.238	0.000	0.000	8.763	1.066
T23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.786	1.300
T24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.121	0.171
T25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.910	0.885
T26	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T27	3.296	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	1		2		3		4		5	
	Trojes		Tepenáhuatl		Bonilla		Acuexcómatl		Israel	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T28	1.671	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T31	0.000	0.000	0.000	0.000	39.625	1.971	0.000	0.000	0.000	0.000
T32	0.407	0.134	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T36	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T37	0.000	0.000	21.200	0.849	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T38	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T39	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T40	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T41	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T42	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T43	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T44	0.178	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T45	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T47	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T48	0.000	0.000	0.870	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	1		2		3		4		5	
	Trojes		Tepenáhuatl		Bonilla		Acuexcómatl		Israel	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T50	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T51	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T52	0.747	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T53	4.198	0.117	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T54	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T55	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T56	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T57	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T58	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T59	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T60	2.036	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T61	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T62	0.629	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T63	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T64	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T65	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T66	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T68	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T69	0.775	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T70	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T71	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	1		2		3		4		5	
	Trojes		Tepenáhuatl		Bonilla		Acuexcómatl		Israel	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T72	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T73	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T74	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T75	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T76	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T77	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T78	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T79	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.911	2.702	0.000	0.000
T80	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T81	0.000	0.000	1.189	0.788	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T82	0.000	0.000	4.375	0.385	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T83	0.000	0.000	21.177	0.706	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T84	2.718	0.085	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T85	1.177	0.113	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	6		7		8		9		10	
	Don Nico		Panteón		Valentín		Mellipona		Scaptotrigona	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
AC1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC4	2.201	0.085	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AC5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.808	0.063
AC6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.284	0.067
AC7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.950	0.007
AC8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AD1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	7.172	0.081
AD2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AD3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AD4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.052	0.074	0.786	0.009
AD5	0.000	0.000	5.650	0.561	0.000	0.000	0.557	0.080	0.000	0.000
AD6	0.000	0.000	0.464	0.656	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AD7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.141	0.003
AD8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.272	0.014
AF1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF3	0.000	0.000	0.000	0.000	15.610	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
AF4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.827	0.250	0.000	0.000
AF5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	6		7		8		9		10	
	Don Nico		Panteón		Valentín		Mellipona		Scaptotrigona	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
AF8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AF17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C1	0.000	0.000	9.584	0.267	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.595	0.078	7.598	0.244
C4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.891	0.013
C5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.470	0.027
E1	16.681	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E7	1.534	0.626	0.000	0.000	0.258	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	6		7		8		9		10	
	Don Nico		Panteón		Valentín		Mellipona		Scaptotrigona	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
E8	5.278	0.076	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E9	0.000	0.000	0.304	0.429	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.756	0.001
E11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.823	0.032
E12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.512	0.001
E13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.514	0.004
E14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.675	0.110
E15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T1	1.093	0.080	1.318	0.243	0.000	0.000	1.488	0.042	0.000	0.000
T2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.227	0.004	0.000	0.000
T3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.367	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000
T5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	4.665	0.148	1.080	0.004
T6	2.749	0.334	11.620	0.839	15.573	0.538	3.138	0.017	2.144	0.001
T7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T8	0.000	0.000	0.000	0.000	6.750	0.141	2.320	0.002	0.000	0.000
T9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T11	0.000	0.000	0.000	0.000	5.220	0.073	2.476	0.134	0.000	0.000
T12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	6		7		8		9		10	
	Don Nico		Panteón		Valentín		Mellipona		Scaptotrigona	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T16	4.834	1.747	3.975	2.566	0.000	0.000	0.000	0.000	7.094	0.008
T17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T19	5.957	1.310	2.100	0.031	0.000	0.000	0.345	0.008	1.109	0.012
T20	1.793	0.931	0.927	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000	3.284	0.067
T21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.475	0.002
T22	21.179	7.734	12.633	0.152	14.818	0.007	22.313	0.654	0.979	0.008
T23	0.000	0.000	5.542	0.711	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T26	0.789	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T27	10.334	0.333	11.620	0.839	0.000	0.000	0.305	0.014	0.000	0.000
T28	7.003	0.820	2.080	0.011	0.000	0.000	1.705	0.014	0.951	0.070
T29	0.766	0.173	0.410	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T30	6.052	0.279	2.701	0.753	0.000	0.000	0.777	0.006	0.000	0.000
T31	3.728	1.855	2.370	0.383	0.000	0.000	0.457	0.010	5.671	0.017
T32	0.560	0.085	1.432	0.017	0.000	0.000	1.113	0.011	0.000	0.000
T33	0.666	0.045	0.069	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T34	1.161	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	6		7		8		9		10	
	Don Nico		Panteón		Valentín		Mellipona		Scaptotrigona	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T35	4.107	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.533	0.127	0.000	0.000
T36	0.486	0.069	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T37	0.000	0.000	12.739	1.578	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T38	0.000	0.000	1.766	2.497	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T39	0.000	0.000	0.585	0.827	0.000	0.000	0.464	0.008	0.000	0.000
T40	0.000	0.000	2.359	2.748	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T41	0.000	0.000	0.700	0.990	0.000	0.000	0.000	0.000	2.152	0.002
T42	0.000	0.000	0.257	0.363	0.000	0.000	0.000	0.000	8.145	0.003
T43	0.000	0.000	0.342	0.483	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T44	0.000	0.000	0.000	0.000	15.166	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
T45	0.000	0.000	0.000	0.000	3.767	0.066	2.496	0.001	0.000	0.000
T46	0.000	0.000	0.000	0.000	1.777	0.141	0.000	0.000	0.000	0.000
T47	0.000	0.000	0.000	0.000	1.094	0.007	0.673	0.039	0.000	0.000
T48	0.000	0.000	0.000	0.000	0.789	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000
T49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.718	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000
T50	0.000	0.000	0.000	0.000	0.719	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
T51	0.000	0.000	0.000	0.000	2.936	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T52	0.000	0.000	0.000	0.000	0.309	0.011	3.874	0.143	0.000	0.000
T53	0.000	0.000	0.000	0.000	5.087	0.620	1.103	0.008	0.000	0.000
T54	0.000	0.000	0.000	0.000	0.926	0.001	1.578	0.011	0.000	0.000
T55	0.000	0.000	0.000	0.000	1.722	0.073	3.782	0.124	0.000	0.000
T56	0.000	0.000	0.000	0.000	6.603	0.350	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	6		7		8		9		10	
	Don Nico		Panteón		Valentín		Mellipona		Scaptotrigona	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T57	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.385	0.120	0.000	0.000
T58	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.268	0.064	0.000	0.000
T59	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.233	0.003	0.000	0.000
T60	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.926	0.013	0.000	0.000
T61	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.251	0.093	0.000	0.000
T62	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.434	0.008	3.627	0.233
T63	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.656	0.026	0.976	0.035
T64	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.775	0.025	0.000	0.000
T65	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.687	0.012	4.849	0.086
T66	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.889	0.008	0.000	0.000
T67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.889	0.008	0.000	0.000
T68	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.438	0.003
T69	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.152	0.002
T70	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.687	0.006
T71	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.098	0.003
T72	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.867	0.047
T73	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.310	0.010
T74	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.284	0.067
T75	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.544	0.162
T76	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	4.089	0.087
T77	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.430	0.025
T78	0.000	0.000	0.000	0.000	0.295	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 11. Porcentaje de la composición de los compuestos volátiles de las muestras de propóleo (continuación).

Compuesto	Muestra									
	6		7		8		9		10	
	Don Nico		Panteón		Valentín		Mellipona		Scaptotrigona	
	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)	Área (%)	DE (%)
T79	0.000	0.000	2.485	0.732	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T80	1.538	0.420	4.085	1.218	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T81	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T82	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T83	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T84	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
T85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

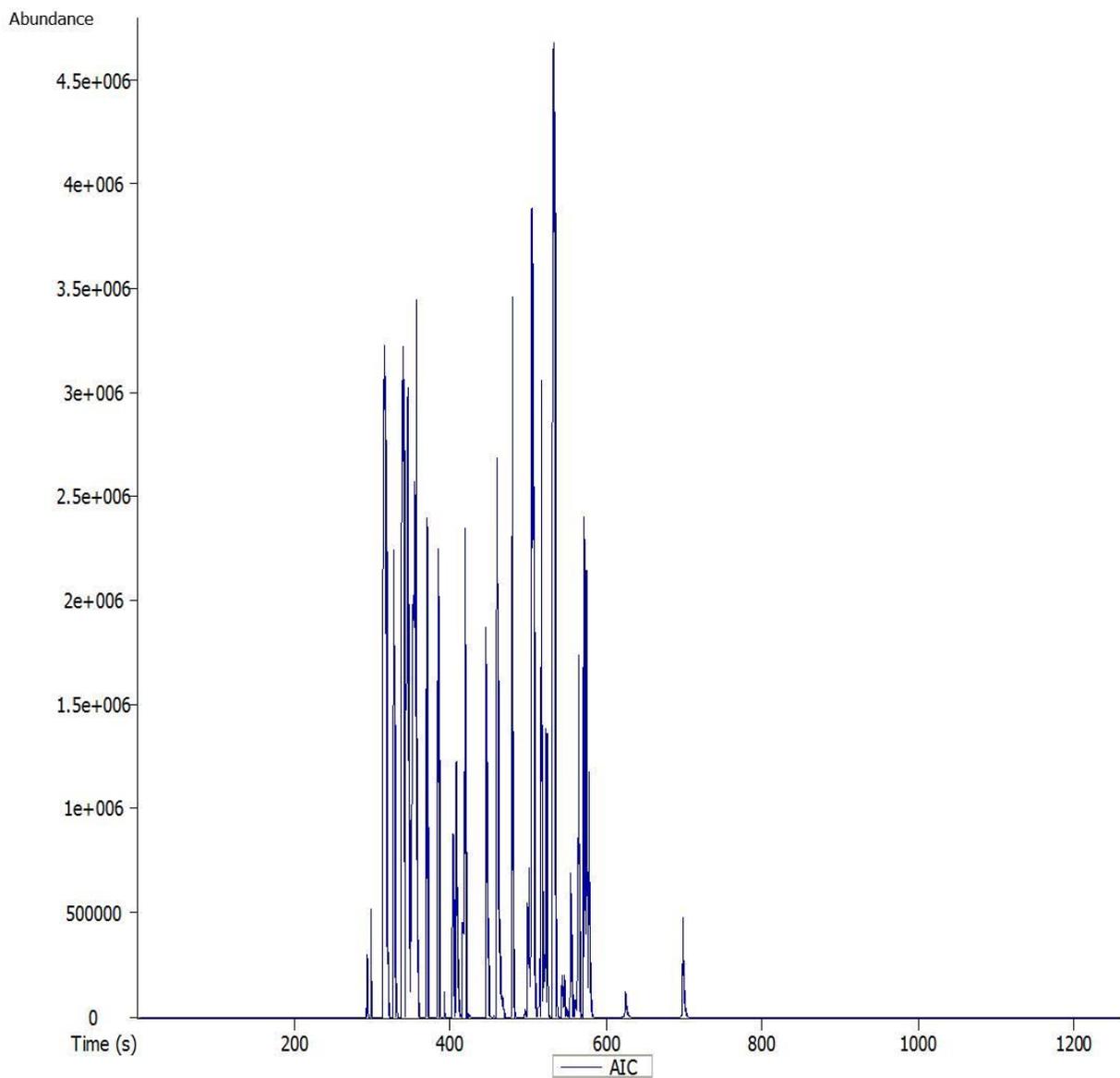


Figura 28. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Acuexcómatl" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

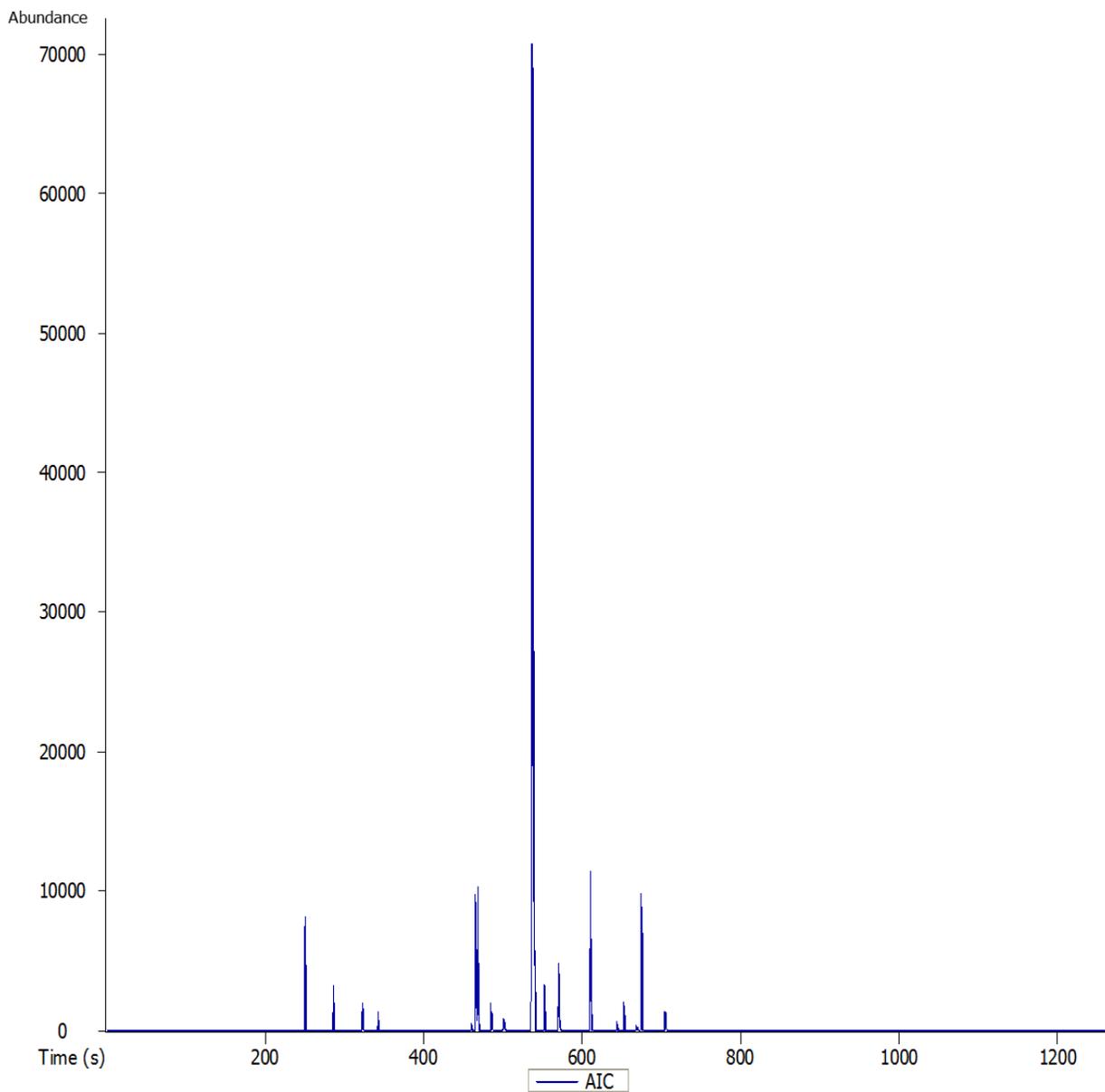


Figura 29. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo “Bonilla” a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

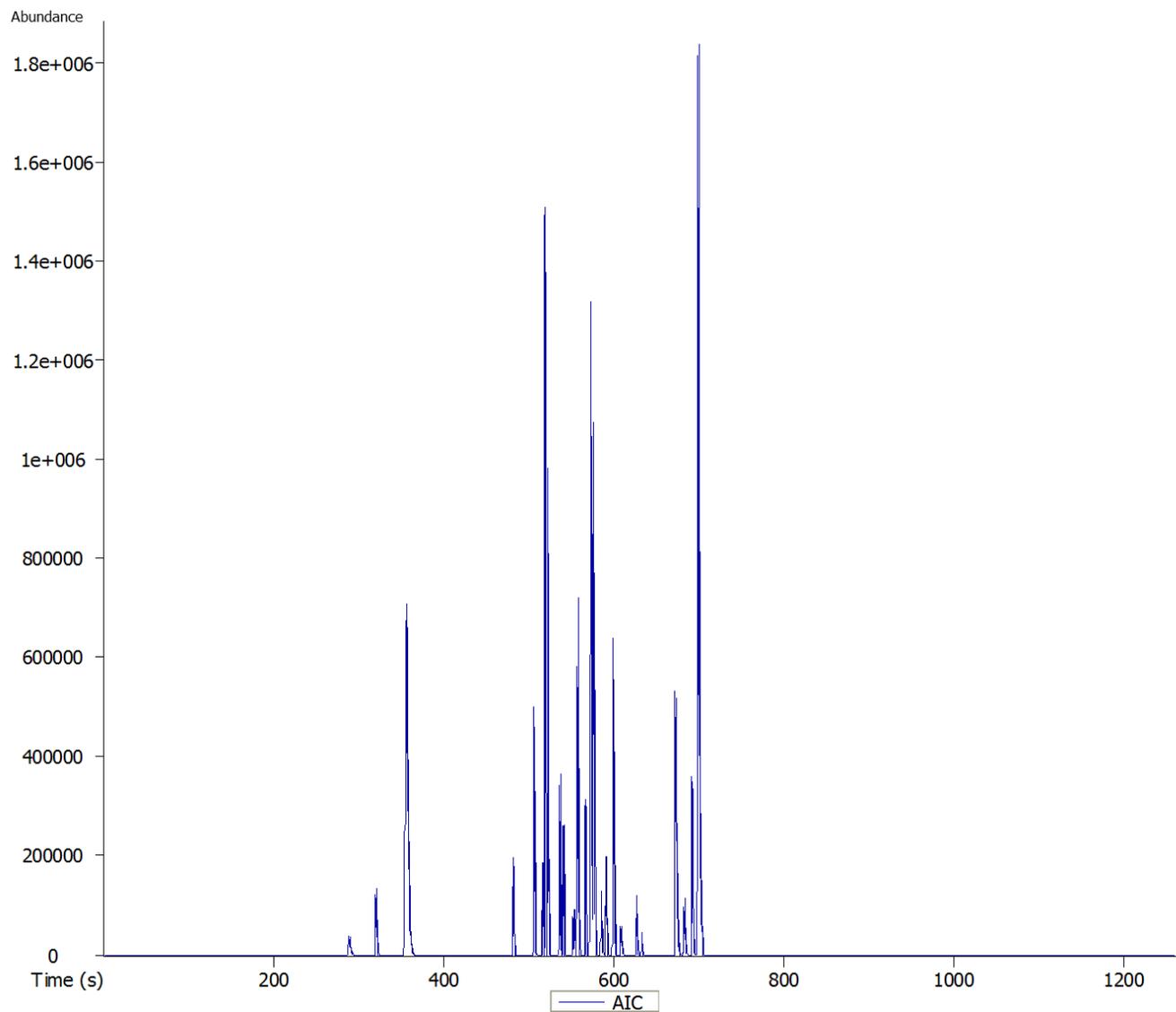


Figura 30. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Don Nico" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

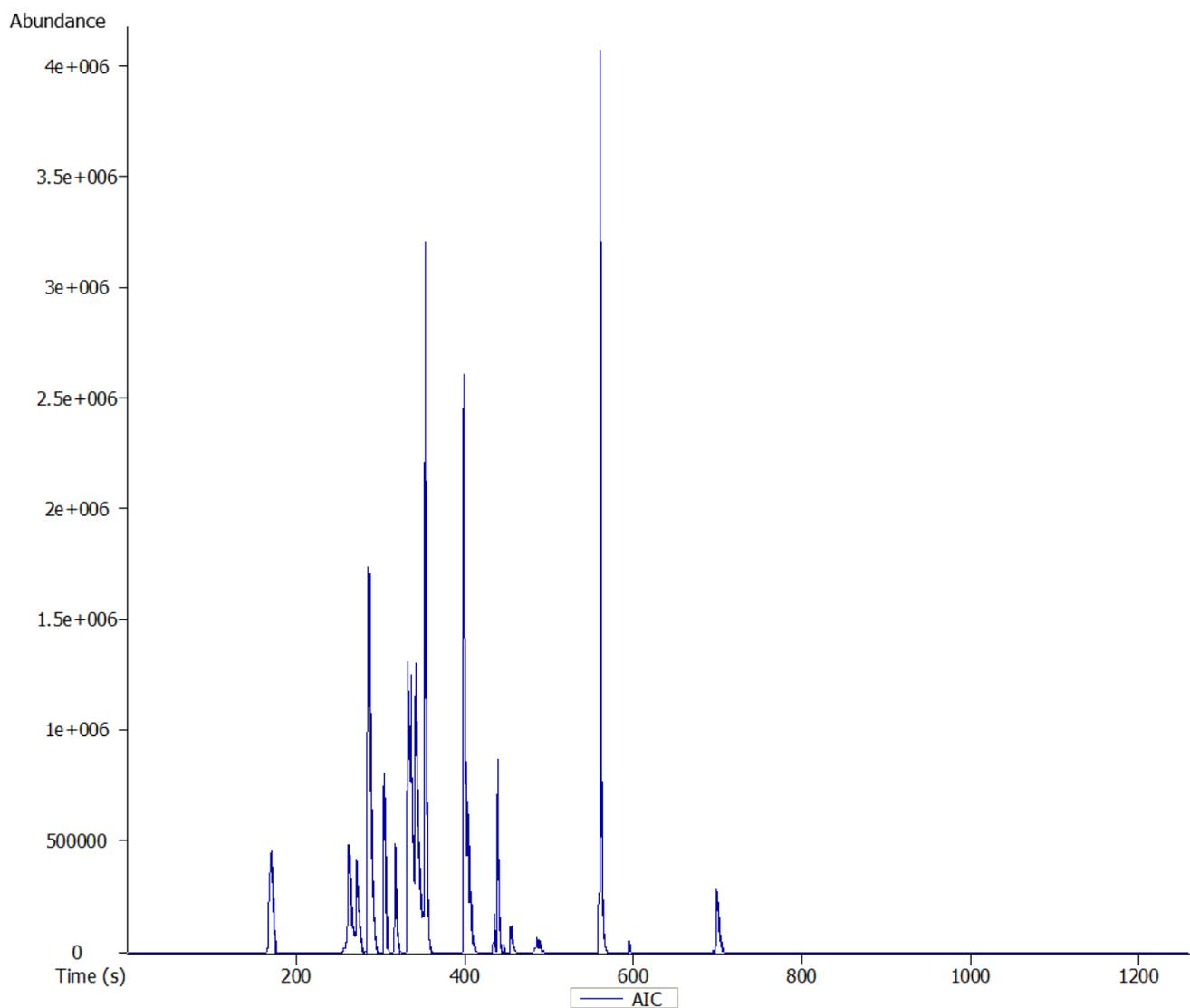


Figura 31. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Israel" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

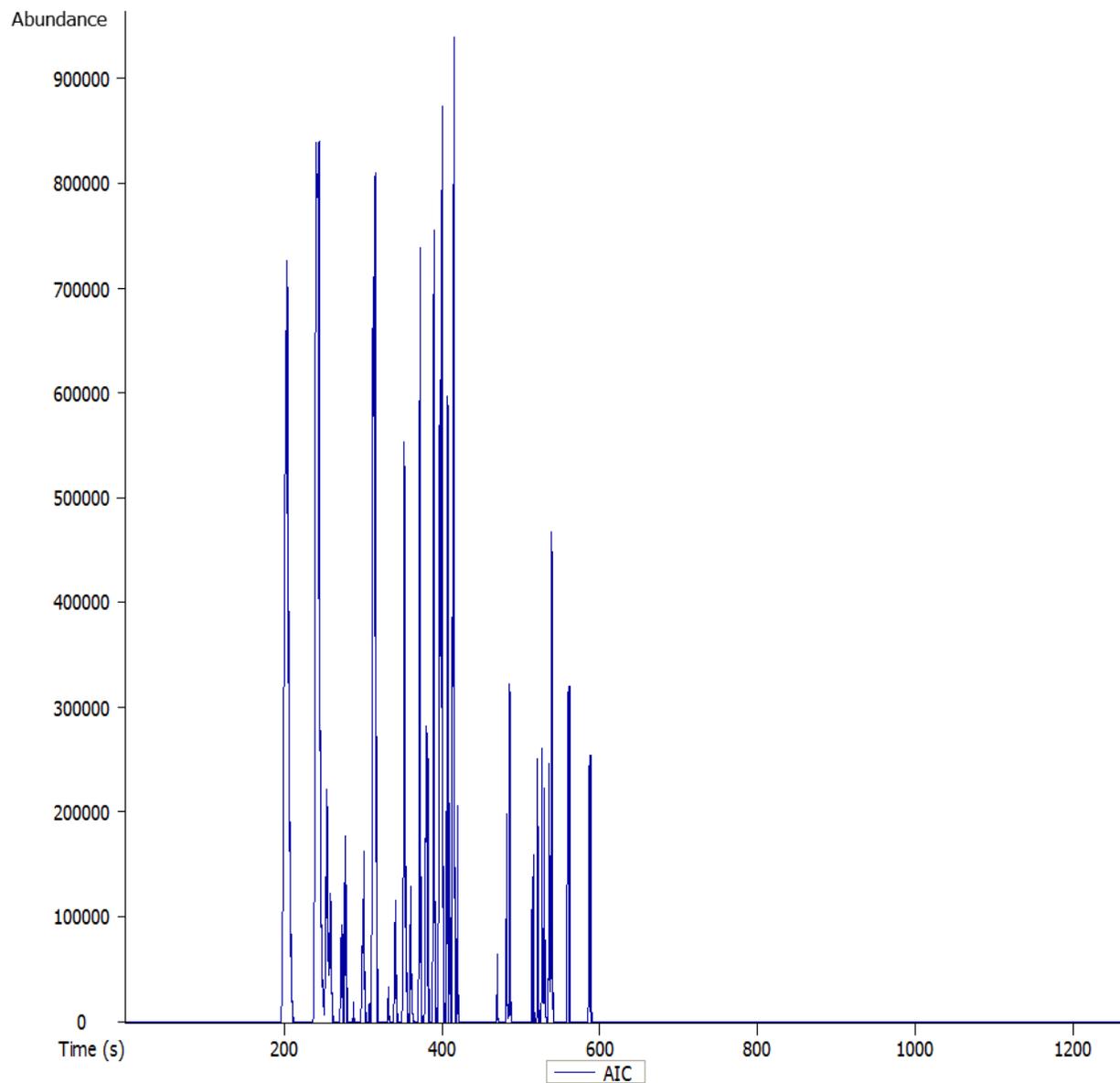


Figura 32. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Mellipona" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

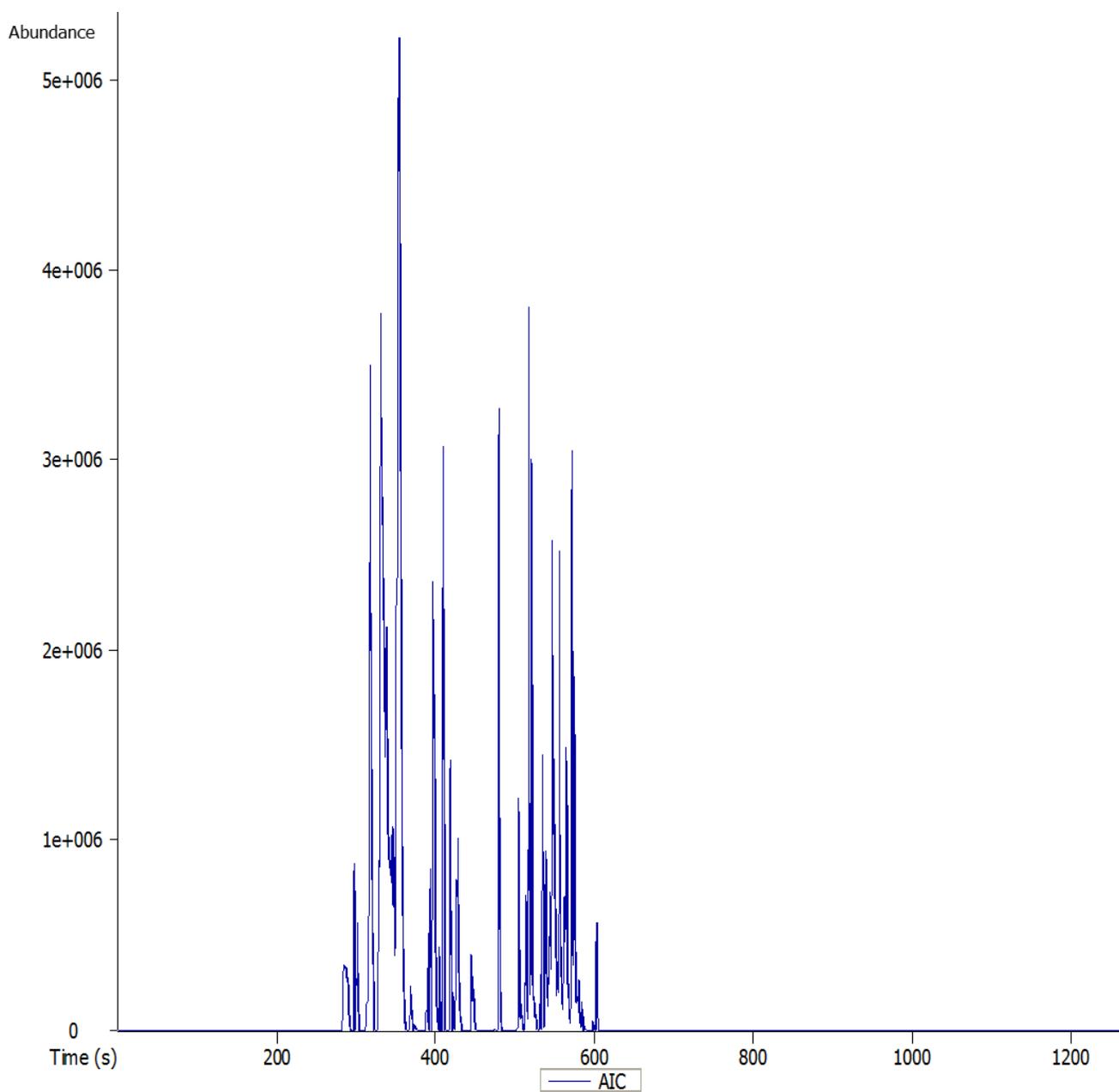


Figura 33. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Panteón" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

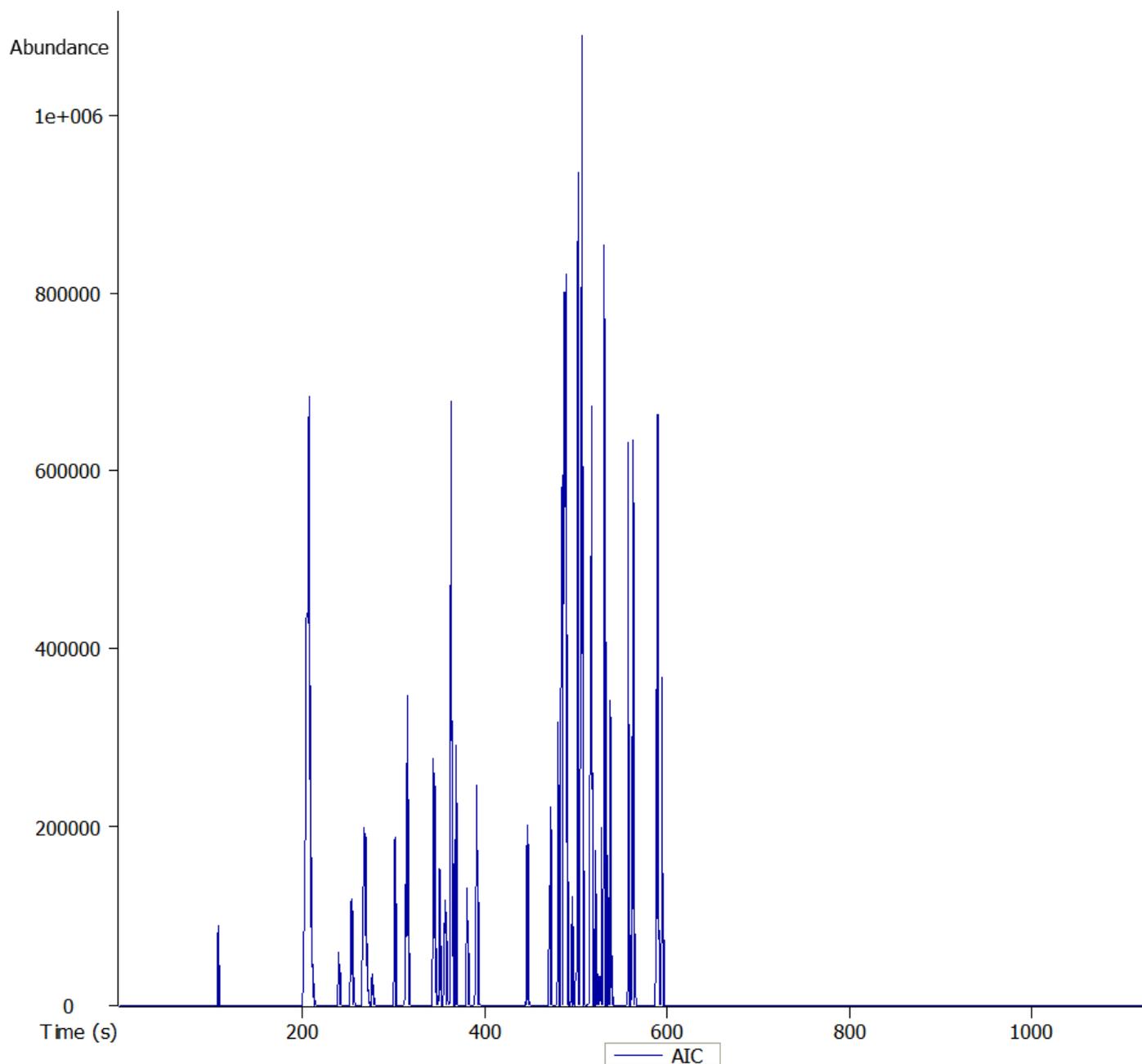


Figura 34. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Scaptotrigona" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

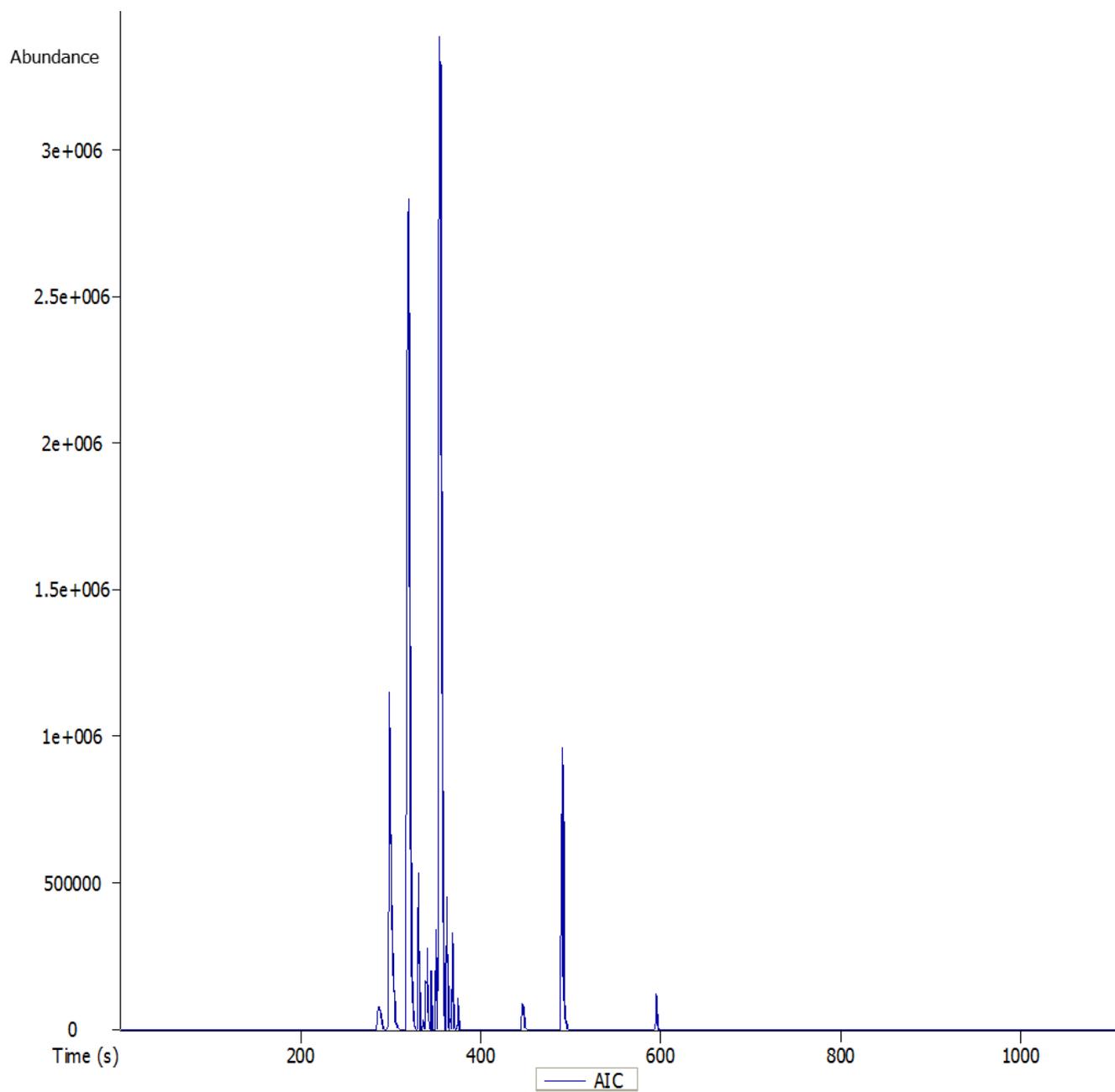


Figura 35. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Tepenáhuatl" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

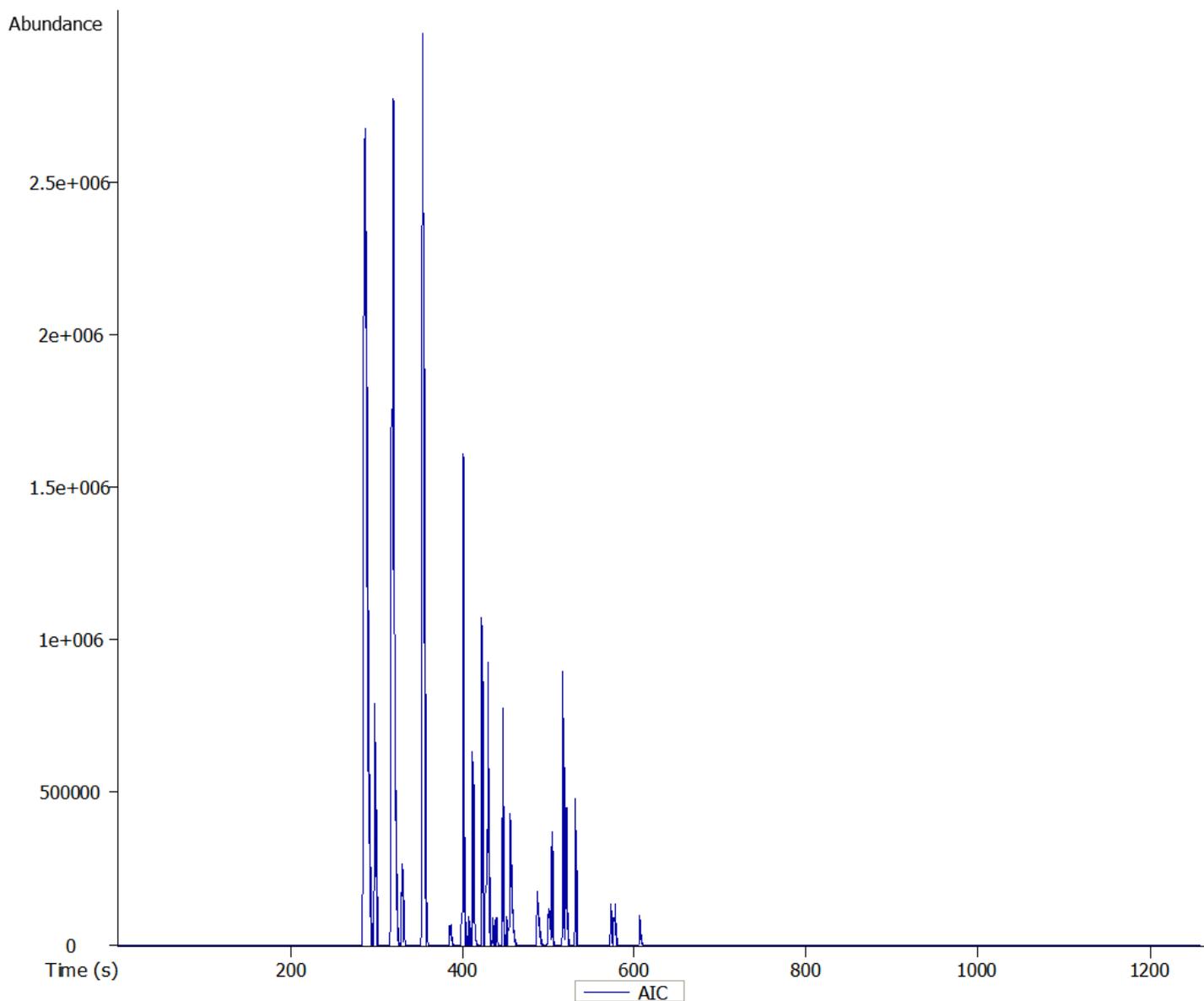


Figura 36. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo "Trojes" a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

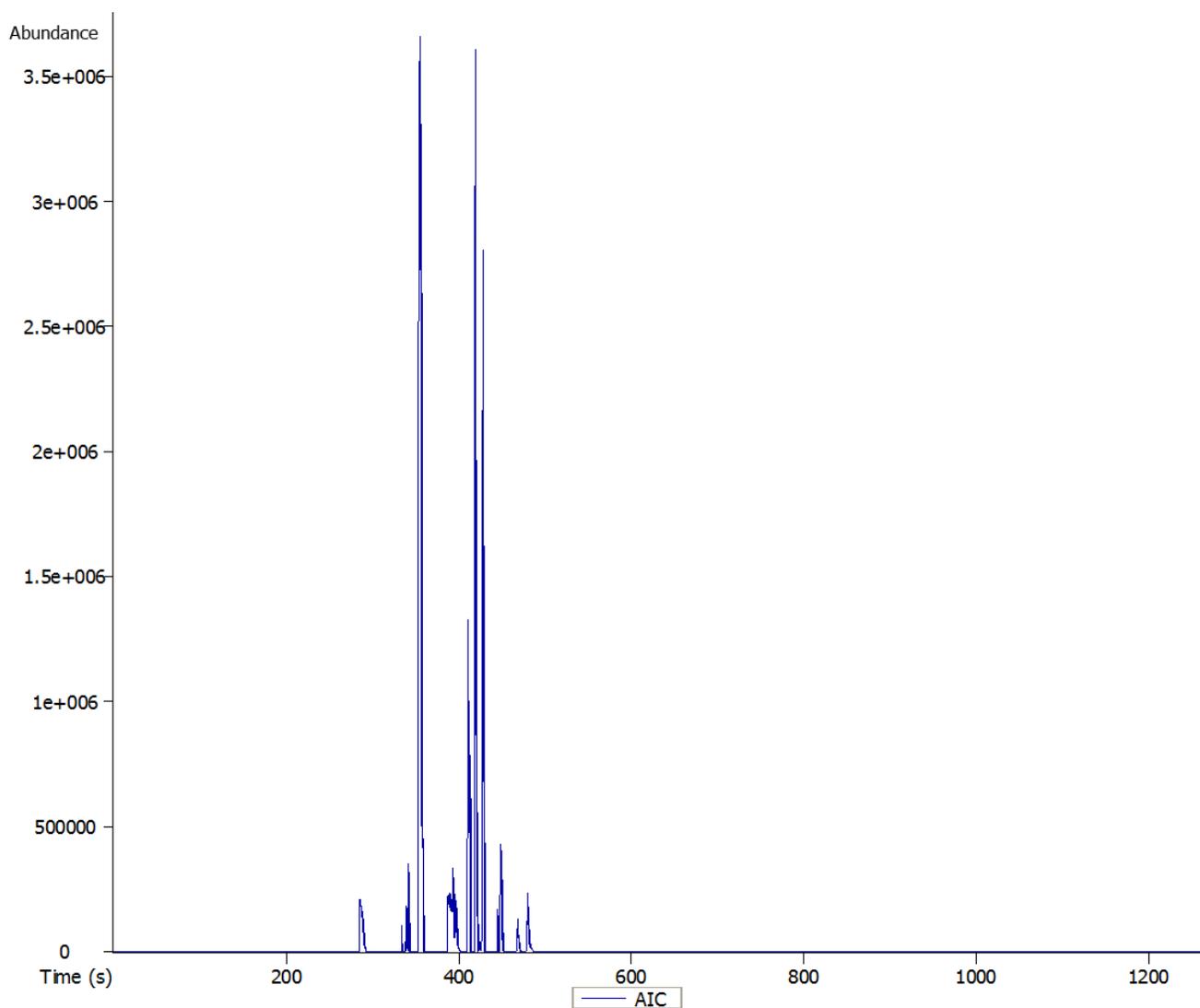


Figura 37. Cromatograma iónico analítico (AIC) de la muestra de propóleo “Valentín” a través de la técnica HS-MEFS/CG-EM-TOF obtenido a partir de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

"Lo que observamos, no es la naturaleza en sí misma, sino la naturaleza expuesta a nuestro método de observación".

Werner Karl Heisenberg