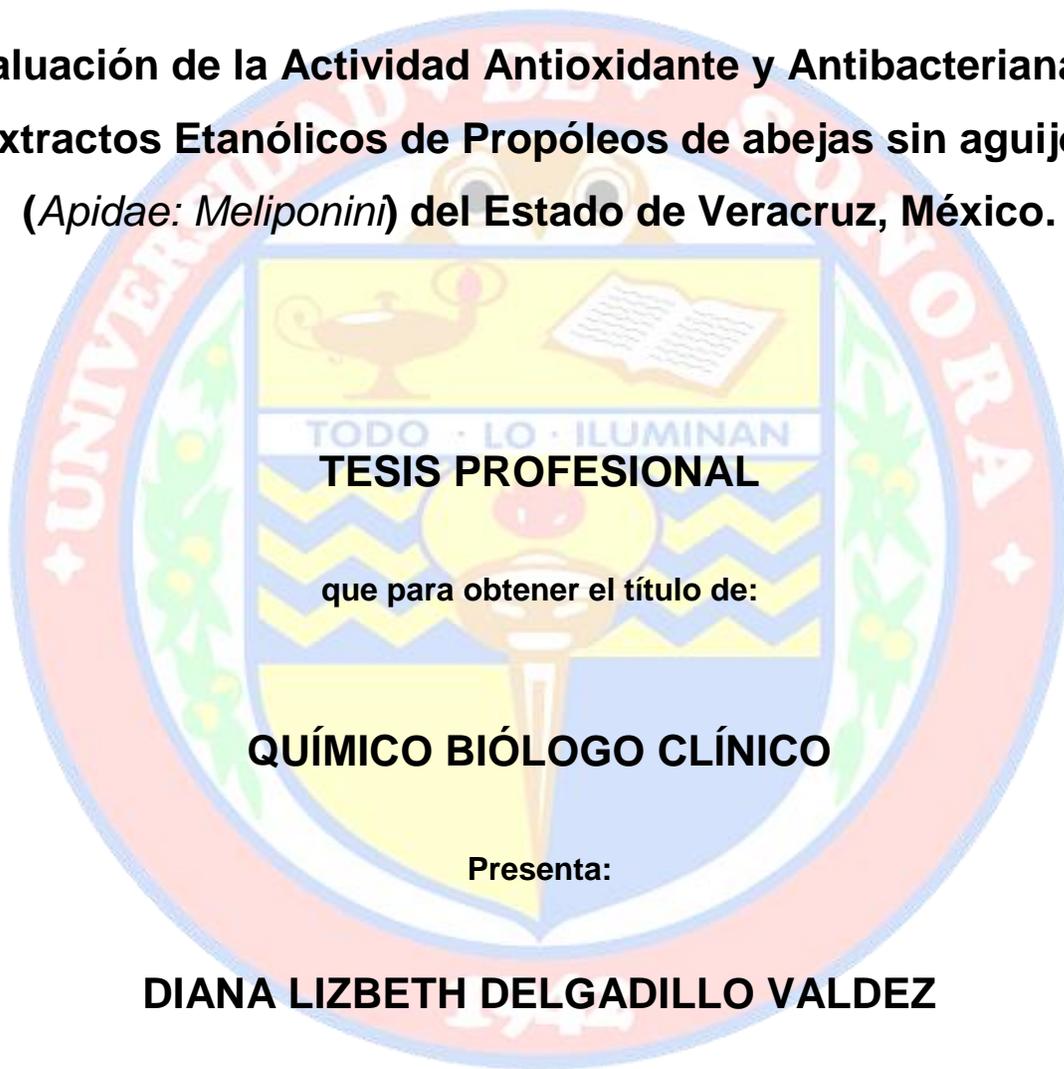


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

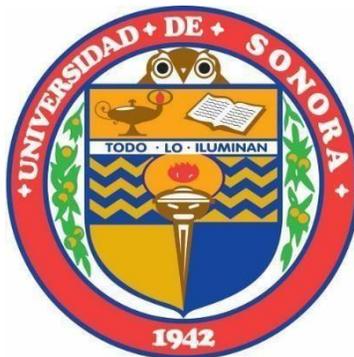
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Evaluación de la Actividad Antioxidante y Antibacteriana de
Extractos Etanólicos de Propóleos de abejas sin aguijón
(*Apidae: Meliponini*) del Estado de Veracruz, México.**



DIANA LIZBETH DELGADILLO VALDEZ

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEDICATORIA

A mis padres por apoyarme en cada paso que he dado, en cada decisión que he tomado y estar siempre a mi lado. Los amo.

A mi hermano favorito Poncho por estar siempre al pendiente con un Hola ¿Cuándo vienes y cuándo te vas?. Te amo y sabes que siempre puedes contar conmigo.

A toda mi familia; abuelitos, tías, tíos, primas y primos, por estar al pendiente de mí de cualquier forma y ser un pilar importante para poder llegar a este gran día.

A Claudia por ser una gran amiga y confidente, por soñar juntas, no hay otra como tú y Lili, por estar siempre ahí, por esas risas y frustraciones compartidas, gracias por brindarme tú amistad. La quiero mucho niñas.

A mis amigos de la prepa que a pesar de la distancia y los años, la amistad sigue; Sammy, Liliana, Flor, Carlitos, Ramón y Polo, sigo aprendiendo de ustedes, los quiero mucho.

A mi novio Gerardo por ser mi compañero de estudio, mi mejor amigo, siempre estar para alegrarme el día y motivarme.

Con mucho cariño,

Diana

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, creador de todas las cosas, me ha dado fortaleza para continuar con mis estudios, perseguir mis metas, cumplir mis sueños y por darme la oportunidad de concluir otra meta más.

A mis padres por formarme en cada aspecto de mi vida, alentarme siempre a ser la mejor persona y dar todo de mí para lograr mis objetivos, gracias por enseñarme a llevar la cabeza en alto en momentos de derrota, les estoy eternamente agradecida.

A la Universidad de Sonora y a todos los Maestros por ser parte de mi formación profesional.

A mi Maestro y asesor de tesis M.C. Moisés Navarro Navarro, por compartir sus conocimientos y brindarme su tiempo. Es usted una persona noble, honesta y respetable, lo admiro mucho. De grande quiero ser como usted.

A mis Sinodales y Maestros Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras, M.C. Martha Judith Valdez Ortega y M.C. María Lucila Rascón Durán, por acompañarme y ayudarme a crecer en todos los aspectos durante toda mi carrera, por su apoyo en la revisión de ésta tesis, así como por las facilidades prestadas en sus respectivos laboratorios.

A las chicas maravillosas del laboratorio de Investigación en Cáncer NCI-UNISON, que me soportaron muchas horas y días. A Anita Acosta por su paciencia, humildad y tiempo brindado para explicarme con detalle.

Se le agradece al Dr. Javier Hernández Martínez del Laboratorio de Físicoquímica y Productos Naturales (SARA) de la Universidad Veracruzana por su contribución al presente trabajo.

Gracias a la maestra Griselda Moreno Ibarra del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sonora por su disposición.

A mis compañeros y amigos de la carrera, fueron parte importante en cada clase y cada conocimiento compartido.

A mis compañeros de los laboratorios de investigación que siempre estuvieron en disposición de ayudarme y compartir sus conocimientos. Ana Laura, Mariana, Isaac, Alex, Hery, Max, Polly, Wences, David, Alejandra, Efraín, Jael y los que me faltan. Que de una u otra forma contribuyeron en este trabajo, aprendí mucho de ustedes. Muchísimas gracias.

A mi tía Judy y tío Carlos, por siempre preocuparse por mi bienestar, los quiero mucho, fueron mi segunda familia, gracias por aguantarme, les estoy infinitamente agradecida.

A mis primos Carlos y Pablo por adoptarme como su hermana, Pablito te regreso tú cama, gracias.

A mi tía Yadis por ser siempre toda oídos, darme consejos y ser otra mamá para mí, le tengo mucho aprecio y la quiero un montón.

A Gerardo mi amor, por haberme apoyado en todo momento, ser un aliento durante mi proyecto final y toda mi carrera, por su apoyo y comprensión. A su familia por su calidez, los aprecio mucho.

Gracias

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
CONTENIDO.....	6
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	11
HIPÓTESIS.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Particulares.....	17
ANTECEDENTES.....	18
Abejas y sus Bioproductos.....	18
Propóleos.....	18
Geopropóleos.....	19
Origen Botánico.....	21
Composición química.....	24
Actividades biológicas.....	26
Actividad Antioxidante.....	26
Actividad Antibacteriana.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Extractos Etanólicos de Propóleos (EEP).....	29
Evaluación de la Actividad Antioxidante (DPPH).....	29
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.....	31

Cepas.	31
Inóculo bacteriano.	31
Evaluación de la Actividad Antibacteriana.	31
Análisis Estadístico	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
Actividad Antioxidante	34
Actividad Antibacteriana	38
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Origen Botánico de los propóleos de diferentes áreas geográficas	22
2.	Actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos de abejas melipona y un extracto etanólico de propóleos de abeja <i>Apis mellífera</i> determinado por el método DPPH a la máxima concentración ensayada. .	36

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Patrones de distribución de la tribu Meliponini en México.	21
2.	Estructura química de los compuestos con actividad biológica más importantes del propóleos	25
3.	Representación de diseño experimental de la evaluación de la actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos de Veracruz.	30
4.	Representación de diseño experimental de la evaluación de la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos de Veracruz.	32
5.	Actividad antioxidante de Propóleos de Veracruz.	37
6.	Actividad antibacteriana vs. <i>E.coli</i> de Propóleos de Veracruz.	40
7.	Actividad antibacteriana vs. <i>S.aureus</i> de Propóleos de Veracruz.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
CAPE	Éster fenético del ácido caféico
DMSO	Dimetil sulfóxido
EEP	Extracto Etanólico de Propóleos
EMP	Extracto Metanólico de Propóleos
EEP-M	Extracto Etanólico de Propóleos de melipona
EEP- AM	Extracto Etanólico de Propóleos de <i>Apis mellifera</i>
EEG- SM	Extracto Etanólico de Geopropóleos de <i>Scaptotrigona mexicana</i>
EEG- NP	Extracto Etanólico de Geopropóleos de <i>Nannotrigona perilampoides</i>
EEG- MB	Extracto Etanólico de Geopropóleos de <i>Melipona becheeii</i>
IC 90	Concentración mínima inhibitoria al 90%
μM	Micromolar
μg	Microgramos
μL	Microlitros
nm	Nanómetros
λ	Longitud de onda
DO	Densidad Óptica
AAB	Actividad Antibacteriana
AAO	Actividad Antioxidante

RESUMEN

El propóleo es un producto resinoso elaborado por abejas de la especie *Apis mellifera* y *Melipona* spp. A partir de exudados de diversas plantas. Las abejas lo utilizan para construcción y mantenimiento de la colmena. El propóleo está formado por una mezcla de compuestos y posee diversa actividad biológica como antioxidante y antibacteriana, entre muchas otras. La actividad biológica de los propóleos dependerá de la región geográfica, estación del año y principalmente de la flora cercana a las colmenas. En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante (AAO) y actividad antibacteriana (AAB) de cinco extractos de propóleos (EP) de la misma región en el estado de Veracruz, México., recolectadas por 4 especies de la tribu meliponini; *Scaptotrigona mexicana* (SM), *Nannotrigona perilampoides* (NP1), *Nannotrigona perilampoides* (NP2), *Melipona beecheii* (MB) y una de la especie *Apis mellifera* (AM). Para evaluar la actividad antioxidante de propóleos se determinó mediante el método del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) a concentraciones de 25, 50, 100 y 200 µg/mL. Para estudiar la actividad antibacteriana de propóleos se utilizó el método de microdilución en placa sobre las bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/mL. Los EEP presentaron una AAO entre el 11.8% y 52.1%, siendo el extracto de AM el cuál mostró la más alta AAO (52.1 ± 0.80 %) a la máxima concentración ensayada (200 µg/mL). Los EEG-SM presentaron una AAB frente a *E.coli* de 18.0% y los EEG-NP frente a *S.aureus* fue de 9.0%, ambos a la máxima concentración evaluada (400 µg/mL). Los resultados demostraron que el extracto etanólico de propóleos de *Apis mellifera* mostró actividad antioxidante mayor a los de melipona y que el extracto etanólico de propóleos que mostró mayor actividad antibacteriana fue de *Scaptotrigona mexicana* frente a la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*.

HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de propóleos de abejas sin aguijón del estado de Veracruz, México poseen actividad antioxidante y antibacteriana.

JUSTIFICACIÓN

El propóleo es importante en las terapias naturales. Reportes científicos alrededor del mundo han descrito las propiedades biológicas de los propóleos.

En México se han estudiado las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiproliferativas entre otras de propóleos de *A. mellifera*, sin embargo, los estudios de propóleos producidos por abejas sin aguijón son escasos.

La composición química y las propiedades biológicas de los propóleos varían ampliamente de una región a otra.

En la presente investigación se propone evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana de propóleos producidos de abejas sin aguijón de la región de Veracruz, México.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es el nombre genérico de una sustancia resinosa de composición compleja recolectada por las abejas de la especie *Apis mellifera* y por abejas de la tribu *Meliponini*, llamadas abejas sin aguijón (El Sohaimy y Masry, 2014; Ferreira-Campos y col., 2014). Las abejas sin aguijón (*Apidae: Meliponini*) se encuentran ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, se conocen cerca de 500 especies y en México se han registrado 46 especies de 11 géneros, 12 de estas especies son endémicas en nuestro país (Reyes-González y col., 2014).

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) forman ésta sustancia a partir de secreciones vegetales (resinas), las cuales son mezcladas con enzimas salivales de las abejas, el material es mezclado con cera formando una mezcla pegajosa. (Bankova, 2005; Burdock, 1998; Ames y col., 1993), mientras que los meliponinos, recolectan resinas de plantas y le adicionan tierra o arcilla, para formar lo que se conoce como “geopropóleo” (Castaldo S. y Capasso F., 2002.; Silveira F.A. y col., 2002). Oliveira y Cunha (2005) afirman que las abejas *Apis mellifera* no incursionan en bosques continuos y los Meliponinos actúan como los principales polinizadores, siendo responsables por hasta 70 a 90% de la polinización de los árboles tropicales (Kerr y col., 1994; Ramalho, 2004).

Debido a su naturaleza y propiedades mecánicas, las abejas utilizan el propóleo en la construcción y reparación de sus colmenas utilizándolo para rellenar huecos y estrechar las entradas al nido, sellar ranuras y mantener un ambiente aséptico (Bankova y col., 2000; Simone-Finstrom y Spivak, 2010).

Por sus propiedades medicinales, el propóleo es utilizado en la medicina tradicional de diversos pueblos en Europa oriental, Sudamérica y Asia (Simone-Finstrom y Spivak., 2010). Recientemente, los propóleos han sido utilizados como aditivos en bebidas, alimentos y como suplementos nutricionales para mejorar la salud y prevenir enfermedades (Banskota y col., 2001). Los productos generados por las abejas sin aguijón incluyendo miel, polen y propóleos son conocidos por sus propiedades nutricionales y terapéuticas (Choudhari y col., 2012).

La composición química de los propóleos y su actividad biológica dependerá de la vegetación que se encuentre alrededor de la colmena (Bosio y col., 2003). Se han identificado más de 300 compuestos, presentando un alto porcentaje de ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas y flavonoides, a los cuales se les ha atribuido las propiedades biológicas de los propóleos (Paulino y col., 2003; Sá-Nunes y col., 2003; Kumar y col., 2008).

Algunos compuestos están probablemente presentes en todas las muestras de propóleos y contribuyen a sus propiedades biológicas. Otros están representados en muchas muestras de diferentes orígenes, pero algunos otros sólo se dan en propóleos de determinadas especies vegetales (Bankova, 2005).

Diversos estudios han demostrado que los propóleos de distintas regiones poseen actividad antiproliferativa (Valencia y col., 2012; Hernández y col., 2007; Li y col., 2009.), antioxidante (Velázquez y col., 2007; Lima y col., 2009), antifúngica (Majiene y col., 2007; Sforcin J.M. y col., 2001), antibacteriana (Velázquez y col., 2007; Popova y col., 2005; Sforcin J.M y col., 2001), antiviral (Schnitzler y col., 2010), anti-inflamatorio (Paulino y col., 2003), antiparasitaria (Machado y col., 2007; Freitas y col., 2006), entre otras, lo cual ha generado gran interés en la industria farmacéutica (Farré, 2004; Bankova, 2005; Viuda-Martos y col., 2008). Existen pocos informes científicos relacionados a la evaluación de la actividad biológica del propóleos de abejas sin aguijón de México (Suzuki y col., 2009).

Se ha registrado que los radicales libres están implicados en la causa de muchas enfermedades incluyendo las enfermedades degenerativas (Ames y col., 1993; Kim y col., 2003). Los radicales libres atacan el DNA y causan mutación provocando el cáncer. Por estas razones, los antioxidantes naturales son de interés para el tratamiento de muchos tipos de degeneración celular (Tutour B.L., 1990). Choi y col. (2006), evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de propóleos, encontrando alta actividad antioxidante por el método DPPH, por lo tanto, la identificación de constituyentes antioxidantes tanto en plantas como en los productos generados por las abejas está en constante búsqueda.

Diversos estudios tanto en Europa como en Latinoamérica han descrito las numerosas propiedades medicinales de los propóleos entre las cuales destaca la actividad antibacteriana sobre distintos géneros como (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, entre otras) (Manrique A. y Santana W., 2008). Fernandes y col. (2001), basados en los resultados obtenidos concluyen que, en general, las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los EEP que las Gram negativas (Velázquez y col., 2007).

El creciente interés de las terapias naturales y la investigación de éstas es un reto para el campo de la investigación. En México el estudio sobre propóleos de las abejas sin aguijón es escasa y por lo tanto un reto, ya que la composición química y sus actividades biológicas varían ampliamente de una región a otra, es por eso que el estudio de los compuestos bioactivos a los cuales se les atribuye dicha actividad es de suma importancia, así mismo tener un control y la estandarización de los propóleos y sus constituyentes para su uso como terapia alternativa.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos de Veracruz de diferentes especies de abejas sin aguijón.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana de cuatro extractos etanólicos de propóleos de abejas sin aguijón (*Apidae: Meliponini*) del Estado de Veracruz, México.

Objetivos particulares

Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos etanólicos de propóleos de abejas sin aguijón (*Apidae: Meliponini*), provenientes del Estado de Veracruz, México, por el método de DPPH.

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos de abejas sin aguijón (*Apidae: Meliponini*) del Estado de Veracruz, México, frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

ANTECEDENTES

Abejas y sus Bioproductos

Las abejas son insectos clasificados en el Orden: Hymenoptera ó bien conocidos como insectos himenópteros que comprende a las hormigas, abejorros, avispas y abejas. No se encuentran ubicados en alguna categoría taxonómica pero si dentro de la superfamilia: Apoidea por el número de características que comparten. Ésta superfamilia se divide en dos grupos: las avispas (Sphecoid) ó las abejas (Spheciformes ó Apiformes). Algunos autores utilizan como sinónimo de Apiformes, Anthophila.

Alrededor del mundo se conocen cerca de 20,000 especies de abejas y se clasifican en 7 familias: *Stenotritidae*, *Colletidae*, *Andrenidae*, *Halictidae*, *Melittidae*, *Megachilidae* y *Apidae*. Dentro de esta última se encuentra la subfamilia: Apinae, que comprende varias miles de especies divididas en 18 tribus de las cuales los miembros de las tribus Bombini, Apini (*Apis*) y Meliponini las cuales se caracterizan por ser sociales.

Se sabe que además de la miel, cera y la jalea real, las abejas elaboran el propóleos, siendo éste último uno de los productos más utilizados en la medicina tradicional y estudiado por investigadores por poseer diversas propiedades biológicas (Michener, 2000).

Propóleos

Los propóleos son productos naturales que las abejas *Apis mellifera* y abejas de la tribu *Meliponini*, elaboran a partir de exudados y resinas de árboles, plantas y flores (Russo y col., 2004; Uzel y col., 2005; El Sohaimy y Masry, 2014; Ferreira-Campos y col., 2014). Las abejas utilizan el propóleos en sus colmenas como protección contra la proliferación de microorganismos, reparar grietas, aislante térmico y prevención de posibles infecciones microbianas de las larvas (Bankova V., 2005; Bankova V.S. y col., 2000; Fokt H. y col., 2011).

Los propóleos no son un descubrimiento nuevo. El hombre ha investigado los productos de las abejas para su beneficio y el propóleos, una de las armas químicas más importantes de las abejas, no es la excepción, empleándose desde hace miles de años atrás (Sforcin M. y Bankova V., 2011; Sulaiman G.M., 2012; Castaldo S., 2002; Burdock G.A., 1998; Khalil M.L., 2006). Se calcula que el uso de los propóleos se remonta a tiempos muy antiguos, por lo menos a 300 años a.C, donde fue utilizado en la medicina popular y otras actividades en muchas partes del mundo (Burdock G., 1998). Las alusiones escritas más antiguas a los propóleos provienen

del Antiguo Egipto, dónde era bien conocido por los sacerdotes, que los utilizaban en técnicas de embalsamiento como consecuencia de su poder de conservación de cadáveres y su uso para prevenir la propagación de infecciones (Ricardo Silva C. y col., 2015). Los griegos y romanos lo utilizaban en tratamiento de heridas, como antiséptico y agente cicatrizante. Los persas describieron el propóleos como una sustancia capaz de actuar contra eczemas, mialgias y reumatismo. La civilización Inca también hizo uso del propóleos como un agente antipirético (Ricardo Silva C. y col., 2015).

En el año 1900, en la guerra Anglo-Bóer acontecida en el cono sur Africano, ésta sustancia salvó la vida a numerosos soldados. En aquel entonces, no se conocían los antibióticos y el empleo del propóleos sobre las heridas salvó a muchos soldados de la gangrena (González A., y col., 2012).

Actualmente, a los propóleos se le atribuye un amplio espectro de actividades biológicas. Es por esto que en varias partes del mundo como Taiwán, Japón, Brasil, EUA, Europa y México se haya extendido la recolección y el uso como un promotor de salud y exista una amplia variedad de productos derivados de ellos en diferentes presentaciones (Akao y col., 2003; Quintero., 2005).

Geopropóleos. Las abejas sin aguijón colectan resinas de las plantas y las mezclan con secreciones salivales, cera, arcilla o tierra, formando lo que se le conoce como "geopropóleos" (Castaldo S. y Caspaso F., 2002; Silveira F.A y col., 2002; Barth O.M., 2006).

Las meliponas almacenan una gran cantidad de éste material dentro de sus colmenas. El producto final es usado de manera similar a los propóleos de la abeja *A. mellifera* siendo utilizado para cerrar pequeñas grietas, prevenir la entrada de aire y como un agente antimicrobiano (Castaldo y Caspaso, 2002; Barth O.M, 2006).

Las abejas sin aguijón (Meliponinos o Melipona), pertenecen a la tribu Meliponini (Hymenoptera: Apoidea y Apidae) (Yañez-Ordoñez, 2008). Los Meliponinos son un grupo de insectos altamente sociables que viven en colonias permanentes con una reina y se encuentran en colonias que van desde varias docenas a 100,000 o más obreras (Michener, 2000).

La característica más importante de los meliponinos es la carencia de aguijón funcional, pero tienen otros métodos efectivos para defenderse de sus enemigos (Velthuis, 1997). Oliveira y Conha (2005) afirman que las abejas *Apis mellifera* no incursionan en bosques continuos y los Meliponinos actúan como los principales polinizadores siendo responsables por hasta 70 a 90% de la polinización de los árboles tropicales (Kerr y col., 1994; Ramalho., 2004).

Las meliponas son nativas de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, principalmente de América. Al sur se extienden hacia las regiones templadas (35°S en Australia y América del Sur, y 28°S en África), mientras que hacia el norte apenas rebasan el Trópico de Cáncer en los 23,5°N (Michener., 2000).

Actualmente se estima que el número de las diferentes especies de abejas sin aguijón sea alrededor de 300 distribuidas desde México hasta el norte de Argentina (Ayala., 1999). Ayala (1999) determinó 11 géneros y 46 especies de la tribu Meliponini, determinando que la distribución geográfica de éstas pueden seguir tres patrones: amplia distribución tropical y subtropical; distribución asociada al bosque tropical perennifolio; y endemismos.

Yáñez-Ordóñez, y col. (2008) trazaron los patrones de distribución de las abejas de la tribu Meliponini en México obteniendo un trazo desde el noroeste del país, en el sur de Sinaloa, corriendo por la Costa del Pacífico y extendiéndose hasta Chiapas; otro por la Costa del Golfo desde San Luis Potosí, este de Hidalgo, norte de Puebla y centro de Veracruz. En el norte de Chiapas, el trazo se bifurca al sur hacia América del Centro, y hacia el noreste hasta la Península de Yucatán. Lograron captar un trazo que une los patrones de las costas, el cuál pasa por Puebla y la frontera entre Guerrero y Oaxaca. En la Figura 1. Se muestran los patrones de distribución en México.



Figura 1. Diagrama de los patrones de distribución de la tribu Meliponini en México. Tomado de Yáñez-Ordóñez O., y col. (2008).

Origen Botánico

La composición química del propóleo dependerá de la composición de las plantas que se encuentren alrededor de la colmena, será por lo tanto, cualitativamente y cuantitativamente variable dependiendo del sitio y tiempo de recolección (Valencia D. y col., 2012; Bankova., 2005; Ahn y col., 2004). En regiones de Europa, Asia y Norte América la principal fuente de las resinas recolectadas por las abejas tienen su origen en especies diferentes de árboles de álamo, principalmente *Populus nigra* (Bankova., 2000).

Bankova y col. (2005), reportaron que especies de *Baccharis* y *Araucaria* son fuente importante del propóleo en São Paulo en Brasil, mientras tanto, en Uruguay se han descrito que

las plantas que dan origen al propóleo en ésta región son: *Eucalyptus globules*, *Populus sp.*, *Betula sp.*, y *Salix sp.* (Bonvehí y col., 2000).

En propóleos sonorenses, las altas concentraciones de ciertos compuestos entre ellos, flavonoides, sugirió que su principal fuente botánica fuera el árbol de *Populus fremontii* el cual se encontraba ampliamente distribuido alrededor del área de recolección (Valencia y col., 2012; Hernández J. y col., 2007). En la Tabla. 1 Se muestra el origen botánico de los propóleos de diferentes regiones geográficas del mundo.

Tabla 1 .Origen Botánico de los propóleos de diferentes áreas geográficas.

Origen Geográfico	Planta
Europa, Norte América, Nueva Zelanda y zonas templadas de Asia.	<i>Populus spp.</i> , más predominante <i>P. nigra</i>
Brasil Propóleos verdes Propóleos rojos	<i>Baccharis spp.</i> , predominante <i>B. dracunculifolia</i> <i>Dalbergia ecastaphyllum</i>
Russia	<i>Betula spp.</i> , más específico <i>B. verrucosa</i> , <i>B. pendula</i> y <i>B. pubescens</i>
Cuba, Venezuela	<i>Clusia spp.</i> , más específico <i>C. rosea</i> y <i>C. minor</i>
Mediterráneo Grecia Suiza Malta Turquía Algeria	Probablemente <i>Conifer spp.</i> <i>P. tremula</i> <i>Ferula spp.</i> , más probable <i>Ferula communis</i> <i>Populus spp.</i> , <i>Eucalyptus spp.</i> , y <i>Castanea sativa</i> . <i>Populus spp.</i> <i>Cistus spp.</i>
Australia Apis mellifera	<i>Acacia paradoxa</i>

Abeja sin aguijón <i>Tetragonula Carbonaria</i>	Árboles de <i>C. torelliana</i> (Resinas de frutas)
África Nigeria Kenya Oman Etiopía	Probablemente <i>M. schweinfurthii</i> <i>Azadirachta indica</i> , <i>Acacia spp.</i> , y <i>Mangifera indica</i> Probablemente <i>Acacia spp.</i>
Tailandia	Árboles de <i>Styrax</i>
Región del Pacífico Okinawa, Hawaii y Taiwán Indonesia, Myanmar	<i>Macaranga tanarius</i> <i>Mangifera indica</i>

(Tomado de Silva-Carvalho y col., 2015)

Actualmente, la investigación sobre el origen botánico del geopropóleos es escasa a comparación con el propóleos de *Apis mellifera*. Sin embargo, en regiones como lo es Brasil, autores han coincidido que, en muestras de geopropóleos de abejas de la tribu: Meliponini, obtienen resinas de *Schinus terebenthifolius* y resinas de pinos, mientras que Araucaria es una fuente importante de resinas de otras especies de abejas sin aguijón al sur de Brasil (Sawaya y col., 2006; Sawaya y col., 2007; Sawaya y col., 2009). Al Noreste de Brasil *Trigona spinipes* visita especímenes de *Eucalyptus citriodora* (Freitas M.O. y col., 2008).

También la presencia de ciertos metabolitos se le atribuye a la familia de plantas *Clusiaceae* las cuales, se distribuyen en esta misma región y también en Venezuela (Cunha M.G. y col., 2013).

En México se conoce gran variedad de abejas meliponas, sin embargo, la investigación del geopropóleos es escasa pues solo algunos estudios se han realizado en la identificación de sus componentes y estudios sobre su origen botánico es nulo ya que solo se puede inferir de acuerdo a los componentes que se encuentren en los extractos. En el estado de Yucatán se identificaron compuestos volátiles pero no se determinó el origen botánico de las muestras (Pino y col., 2006).

Composición Química

El conocimiento de los propóleos se ha ampliado a través del tiempo, debido a estudios exhaustivos respecto a su composición química. En los 60's, se pensaba que pese a su complejidad, la composición química era más o menos constante. Sin embargo, en los años siguientes, un sin número de análisis de muestras de diferentes áreas geográficas, revelaron que la composición química de los propóleos es altamente variable y difícil de estandarizar ya que depende de la vegetación que se encuentre en un radio de 3 a 4 kilómetros alrededor de la colmena, estación del año y condiciones del medio ambiente del sitio de recolección (Sforcin M. and Bankova V., 2011; Barlak Y. y col., 2011; Bankova V. 2005; Bosio y col., 2003).

Hoy en día se sabe que el propóleos es una mezcla compleja que de manera general están constituidos de resinas y bálsamos (50-55%), ceras (25-35%), aceites volátiles (10%), polen (5%), minerales y sustancias orgánicas (5%) (Vargas-Sánchez y col. 2014). A la fecha se han identificado más de 300 constituyentes en los propóleos y estudios recientes mostraron la presencia de compuestos nunca antes mencionados entre los que se encuentran: ácidos fenólicos, terpenos, ácido cinámico, flavonoides, ácido caféico y algunos de sus ésteres (Paulino y col., 2003; Fokt H. y col., 2011; Khalil M.L., 2006; Falcão S.I., 2010, Alday E. y col., 2015).

Los principales constituyentes de los propóleos en Europa, China y Norte América son flavonoides y ésteres de ácido fenólico (Bankova y col., 2000; Chen y col., 2004; Lotti y col., 2010). Mientras que en los propóleos Brasileños, los principales compuestos encontrados fueron diterpenos, lignanos, derivados prenilados de ácido *p*-cumárico, sesquiterpenos y acetofenonas (Bankova., 2005; Piccinelli y col., 2005). En muestras de propóleos de Uruguay (al Sur de Brasil) se obtuvieron dieciocho flavonoides, cuatro ácidos carboxílicos aromáticos y siete ésteres de ácidos fenólicos (Kumazawa S., 2002).

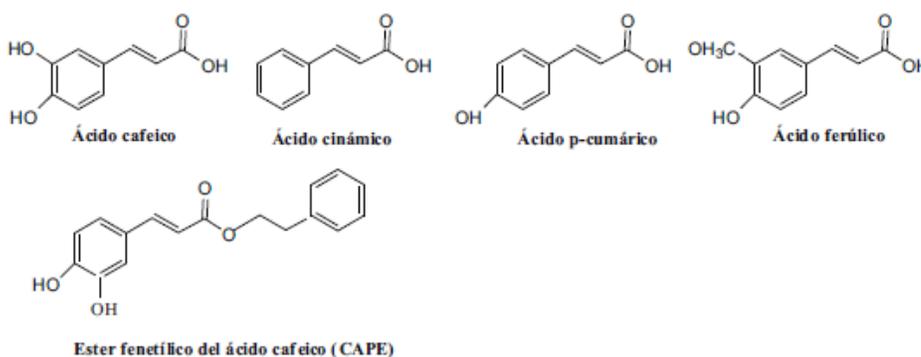
Barrientos L. y col., (2003), detectaron en muestras de propóleos del centro y de las regiones del sur de Chile la presencia de pinocebrina y galangina, siendo la primera, el principal compuesto presente en los propóleos chilenos. Estos mismos son también los principales compuestos de los propóleos de Argentina (Agüero y col., 2010).

En México, Pino J. y col., (2006) identificaron los componentes volátiles presentes en los propóleos del estado de Yucatán dónde los mayores compuestos encontrados fueron α -pineno, ácido hexadecanóico y trans-verbenol. Por otro lado, los propóleos evaluados de diferentes regiones del estado de Sonora revelaron altas concentraciones de flavonoides (Hernández J. y col., 2007).

Uno de los constituyentes más estudiados de los propóleos es el CAPE, el cual ha sido identificado como uno de los principales compuestos activos de los propóleos con capacidad antioxidante (Kuo y col., 2005; Chen y col., 2003).

Mientras tanto, los constituyentes de tipo flavonoides son importantes en términos de acción farmacológica. En los últimos años se ha incrementado el interés por los derivados de éstos ya que ellos son en parte responsables de la actividad biológica incluyendo la actividad antibacteriana (Bankova, 2005). En la figura 2 se muestran las estructuras químicas de los compuestos con actividad biológica más importantes del propóleos.

Ácidos fenólicos



Flavonoides

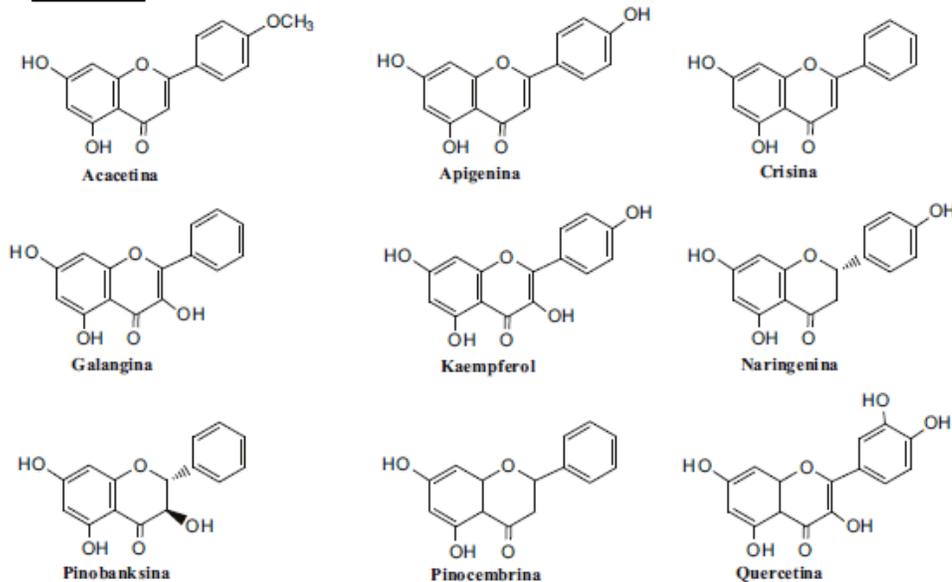


Figura 2. Estructura química de los compuestos con actividad biológica más importantes del propóleos (Tomada de Vargas-Sánchez R.D. y col., 2014).

La composición química del geopropóleo de la misma forma que el propóleo, dependerá de manera específica de la flora local que se encuentre alrededor del sitio de recolección de las muestras. Muchos de los constituyentes ya han sido identificados principalmente del propóleo elaborado por las abejas *Apis mellifera* (Alves S. y col., 2013).

Las abejas de la tribu Meliponini están limitadas a áreas tropicales y los estudios sobre la composición química de los geopropóleos son escasos. En geopropóleos de diferentes especies de abejas meliponas en Brasil, se lograron identificar principalmente compuestos fenólicos (Bankova y col., 2000). Cunha y col. (2013) obtuvieron benzofenonas preniladas así como ausencia de flavonoides. En México se identificaron 92 compuestos volátiles en geopropóleos del estado de Yucatán destacando α -pineno, β -bourboneno, β -cariofileno, espatulenol y óxido de cariofileno éstos de *Melipona beecheii* (Pino, 2006).

Recientemente el análisis de geopropóleos elaborados por abejas meliponas de la región de Teocelo, Veracruz demostraron que poseen escasos o nulos compuestos de tipo fenólico así mismo permitió rectificar con autores citados anteriormente que los flavonoides se encuentran ausentes y que los compuestos principales son de tipo triterpénico (Morales H., 2015, Tesis de Licenciatura). Pino J. y col., (2006) determinaron compuestos volátiles en muestras de propóleos en Yucatán, México y establecieron que los compuestos característicos de propóleos de *Apis mellifera* como los de abejas meliponas son similares pero se encuentran diferencias cualitativas en éstos.

Actividades Biológicas

Actividad Antioxidante de los Propóleos

El metabolismo oxidativo es un proceso biológico normal capaz de generar radicales libres oxigenados altamente reactivos como: el radical superóxido (O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO). Sin embargo, siempre se están generando radicales OH por la constante exposición a las radiaciones (Murillo, 2004).

Es de gran interés para la comunidad científica el estudio de la actividad antioxidante ya que se ha demostrado que los antioxidantes son moléculas capaces de retrasar o prevenir la oxidación de otras moléculas ya que los radicales libres están involucrados con el proceso de degeneración celular y llevan a la muerte celular y contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas como: cáncer, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, entre otras (Alves S. y col., 2013). Es por eso su importancia para el

desarrollo de nuevos tratamientos para las diferentes condiciones y su avance en el área de la salud es prometedor.

Se ha reportado que el propóleo pueden ser una fuente potencial de agentes antioxidantes por su rico contenido en polifenoles y flavonoides por lo tanto se ha destacado como un antioxidante natural para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades de origen oxidativo y es por ello que se han realizado numerosas investigaciones en busca de éstos (Moreno y col., 2000; Kumazawa y col., 2003; Russo y col., 2004; Farré y col., 2004).

Existen varios métodos para determinar la actividad antioxidante, en el caso de los propóleos uno de los métodos más utilizados es el ensayo del radical libre DPPH (1,1 –difeníl-2-picril-hidrazilo) (Usia y col., 2002; Chen y col., 2004).

Velázquez C. y col., (2007) evaluaron la actividad antioxidante de propóleos de *Apis mellifera* de Caborca, Sonora obteniendo resultados similares a la vitamina C a una concentración de 100 µg/mL. Los reportes de actividad antioxidante en muestras de propóleos de abejas sin aguijón se encuentran en investigación. Recientemente se evaluaron geopropóleos de la región centro del estado de Veracruz los cuales mostraron baja actividad antioxidante a concentración de 100 µg/mL lo cual se le atribuyó a la cantidad de fenoles contenidos en las muestras (Morales H., 2015, Tesis de Licenciatura).

Actividad Antibacteriana de los Propóleos

El propóleo es un remedio natural el cual ha sido empleado desde tiempos antiguos como antiséptico (Castaldo y Caspasso., 2002).

Actualmente varios estudios bacteriológicos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el propóleo posee actividad antibacteriana ante varias cepas, demostrando mayor eficacia en bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y en menor grado sobre bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Salmonella* serotipo Typhi) (Pepeljnjak y Kosalec, 2004; Uzel y col., 2005).

Velázquez y col., (2007) evaluaron la actividad antibacteriana de muestras de propóleos recolectadas en diferentes áreas del desierto de Sonora (Noroeste de México) de la abeja *Apis mellifera* obteniendo una fuerte actividad contra bacterias Gram positivas siendo *S. aureus* el microorganismo sobre el que se encontró la más alta efectividad (MIC, 100 µg/mL y 200 µg/mL), sin embargo, ni una de las muestras tuvo efecto contra las bacterias Gram-negativas, como *E.coli* a las concentraciones probadas.

Otro estudio fue realizado por Navarro M. y col., (2012) en otras regiones del estado de Sonora, se probaron EP contra *S. aureus* la cual, fue casi completamente inhibida y frente a *Vibrio*

cholerae O1 se obtuvo una inhibición del 83,0%, ambas a una concentración de 200 µg/mL, mientras, que *E. coli* tuvo un efecto inhibitorio moderado con 72,0% a la máxima concentración de 400 µg/mL.

Dicha actividad biológica se le atribuye a la presencia de algunos compuestos fenólicos como flavonoides los cuales han sido relacionados como los principales responsables de la actividad antibacteriana (Lofty., 2006; Sagdic y col., 2007). Algunos compuestos responsables de las actividades biológicas se muestran en la Figura 3.

La investigación de la actividad antibacteriana de geopropóleos en México es nula hoy en día pues los estudios realizados de dicha actividad biológica se han realizado en mayor parte en Brasil. Ferreira y col., (2014) analizaron geopropóleos de *Melipona orbinyi* los cuales mostraron efecto bactericida contra *S. aureus* a una concentración de 3.1 mg/mL, pero no contra *E. coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extractos Etanólicos de Propóleos (EEP)

Los EEP fueron preparados y donados por el Dr. Javier Hernández Martínez de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica de la Universidad Veracruzana.

Los EEP fueron producidos por 4 especies de la tribu meliponini; *Scaptotrigona mexicana* (SM), *Nannotrigona perilampoides* (NP1), *Nannotrigona perilampoides* (NP2), *Melipona beecheii* (MB) y una de la especie *Apis mellifera* (AM). El lugar de recolección fue en el Rancho el Rinconcito, Xalapa, Veracruz (19° 23' 38" LN; 096° 58' 96.1" LW) a 1145 m.s.n.m.

Evaluación de la Actividad antioxidante

Método de DPPH (Velázquez y col., 2007).

Se determinó evaluando la capacidad de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) para estabilizar el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), la cual es una molécula conocida como un radical libre estable por la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa. El método se realizó conforme al descrito por Velázquez y col. (2007). Diferentes concentraciones de propóleos se mezclaron por triplicado con volúmenes iguales de una solución etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich) (300 µmol/L) y se agitó por 10 segundos. En la figura 3. Se muestra de manera visual el diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante de los EEP la cual se realizó en microplacas de 96 pozos. Después de 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, se realizaron lecturas de absorbancia a 517 nm. Como controles se utilizaron: ácido ascórbico (70 µM), CAPE (70 µM) y TROLOX (70 µM).

Al reaccionar la molécula de DPPH con el sustrato antioxidante que donde un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. Por lo tanto la actividad antioxidante se expresa en porcentaje por la proporción de degradación de DPPH comparando la absorbancia de la prueba con la del control negativo constituido por DPPH y etanol utilizando la siguiente fórmula:

Absorbancia de la muestra / Absorbancia del estándar x 100 = % de inhibición

$$100\% - \% \text{ de inhibición} = \% \text{ de Actividad antioxidante}$$

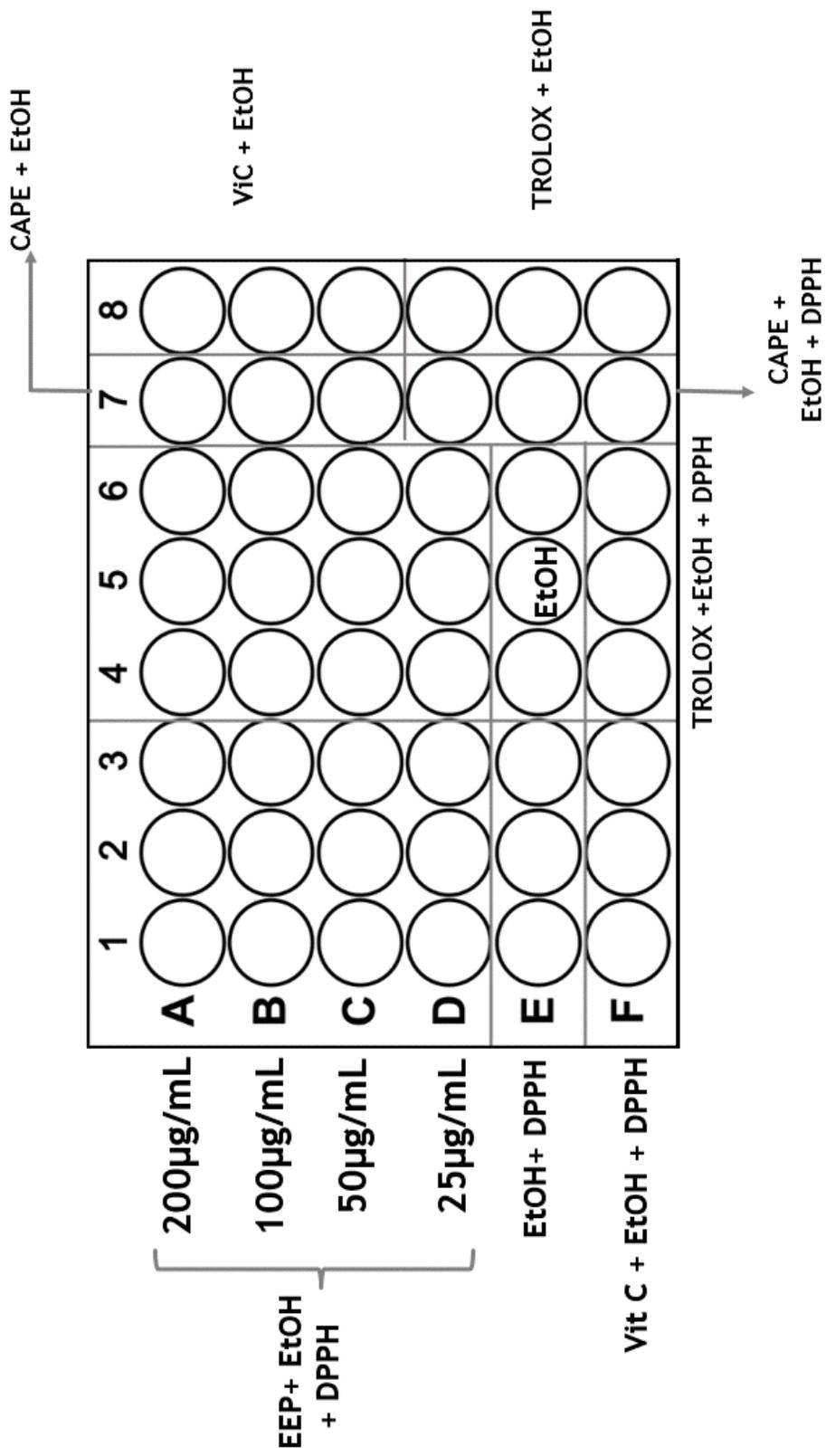


Figura 3. Representación de diseño experimental de la evaluación de la actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos de Veracruz.

Evaluación de la Actividad antimicrobiana

Cepas

Para determinar la actividad antibacteriana, se utilizaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, las cuales fueron donadas por el cepario del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora.

Inóculo Bacteriano

El inóculo bacteriano se preparó en solución salina estéril 0.85%, a partir de un desarrollo de 12 h en agar Mueller Hinton, hasta lograr una densidad óptica 0.09 ± 0.005 , igual a la lectura de DO del estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland a 620nm. El inóculo fue equivalente a 10^8 UFC/mL. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas para absorbancia / ELISA iMark (Velázquez y col., 2007).

Evaluación de la Actividad antibacteriana

Método de microdilución en placa

Según el método descrito por Velázquez y col. (2007), se tomaron por triplicado 200 μ L de cada una de las concentraciones de los propóleos y se depositaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano. A un conjunto de estos pozos se les adicionó el inóculo bacteriano y se preparó otro conjunto sin bacterias. Se prepararon tres pozos con 200 μ L de caldo de cultivo con el antibiótico gentamicina (12,0 μ g/mL), tres pozos con 200 μ L de caldo de cultivo con la máxima concentración de solvente al que las bacterias estén expuestas en los pozos de prueba y otros tres más con el caldo de cultivo como control de esterilidad. Los pozos de prueba y los controles se inocularon con 15 μ L de una suspensión bacteriana previamente estandarizada (10^8 UFC/mL). Una vez inoculada la placa, se incubó a 36° C. En la figura 4. Se muestra de manera visual el llenado de la microplaca para la evaluación de la actividad antibacteriana de los EEP. Se leyó la densidad óptica a 620 nm (DO_{620}) de los pozos a las 0, 6, 12, 24 y 48 h. La DO de los pozos de prueba se corrigió sustrayendo la DO de los pozos con caldo y propóleos. Con las lecturas se realizaron curvas de desarrollo bacteriano, graficando tiempo vs. DO_{620} .

El porcentaje de inhibición y la mínima concentración inhibitoria (MIC) se determinó aplicando la siguiente fórmula (Baizman y col. 2000): $(DO \text{ bacterias sin tratamiento}) - (DO \text{ concentración de prueba}) / (DO \text{ bacterias sin tratamiento}) \times 100$

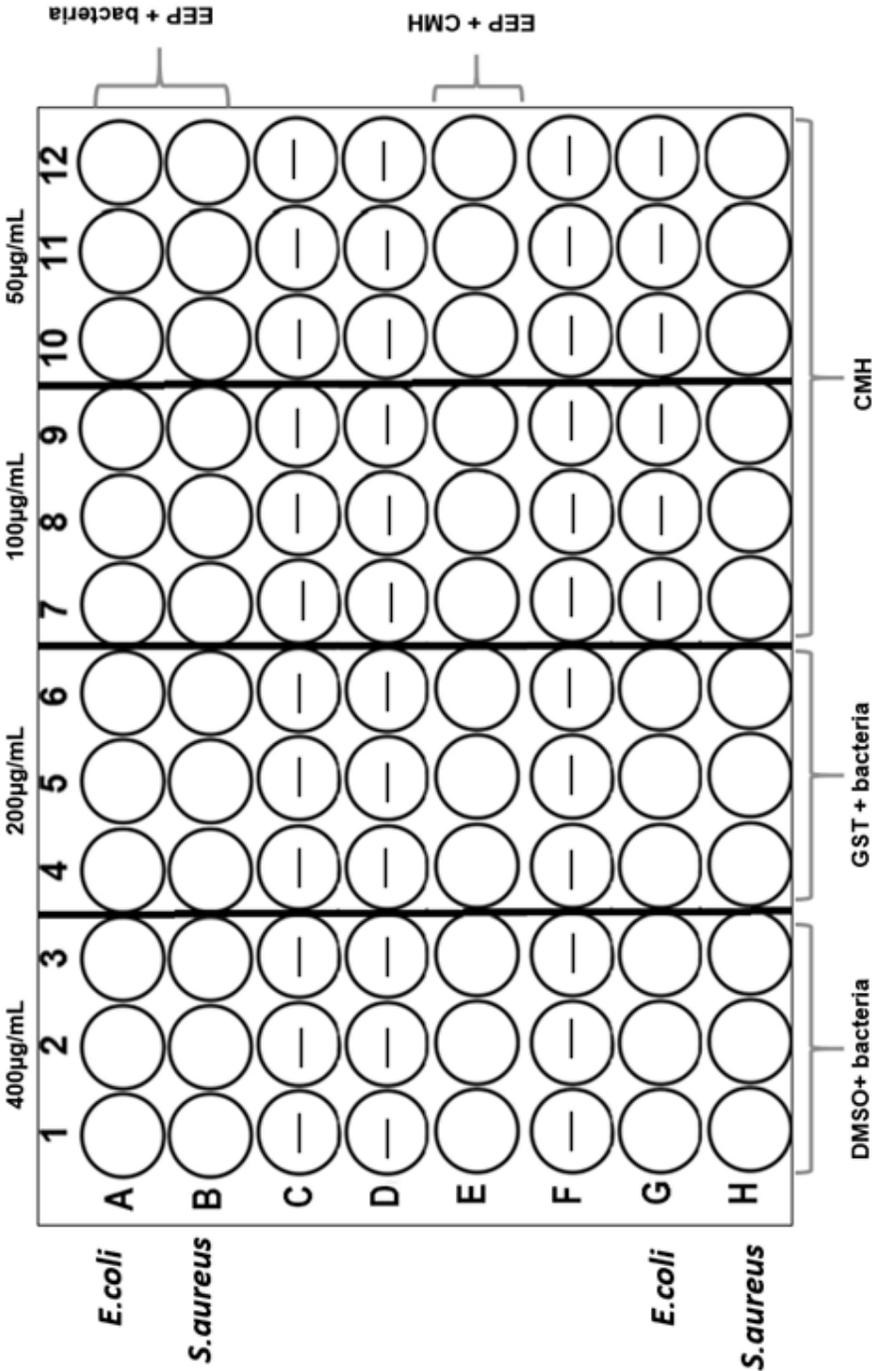


Figura 4. Representación de diseño experimental de la evaluación de la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos de Veracruz.

Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza utilizando la prueba de comparación U de Mann-Whitney con el programa estadístico SPSS 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propóleo es un producto resinoso procesado por abejas de la especie *Apis mellifera* y *Melipona* spp. (Sahinler y Kaftanoglu., 2005; Bankova., 2005). Diversos estudios han demostrado que el propóleo contiene compuestos del tipo flavonoide y fenoles los cuáles han sido evaluados en actividades biológicas entre las que se encuentran la actividad antioxidante y antibacteriana (Akao y col., 2003; Manrique A., 2008), sin embargo, los estudios de éstas actividades biológicas de abejas melipona en México son escasos. En el presente trabajo se continuó con el estudio de la actividad antioxidante y antibacteriana de cinco EEP del estado de Veracruz, México.

Actividad antioxidante

Con el fin de estudiar geopropóleos de abejas sin aguijón, se evaluó la capacidad de los extractos para neutralizar el radical libre DPPH evaluando los EEP en placas de 48 pozos a concentraciones de 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL y 200 µg/mL. Los estándares de referencia: Trolox, Vitamina C y CAPE [70 µM]. En la Tabla 2 se muestra que de los EEP, el extracto que mostró mayor actividad antioxidante a la máxima concentración evaluada (200 µg/mL), fue el de *Apis mellifera* (AM) con 52.1% seguido de los extractos etanólicos de abejas de la Tribu: *Meliponini*: EEG-MB (20.7%) > EEG-NP(I) (16.8%) > EEG-NP (II) (13.8%) > EEG-SM (11.8%), todos los EEP presentaron menor actividad antioxidante a comparación con los compuestos estándares (Figura 5). Los EEP mostraron diferencia significativa en comparación con la Vitamina C. Los resultados fueron representativos de al menos tres experimentos independientes y se realizaron determinaciones por triplicado.

En un estudio anterior realizado por Velázquez y col., (2007) evaluaron la AAO de extractos metanólicos de propóleos Sonorenses de la abeja *Apis mellifera*, se demostró una potente actividad antioxidante de 86.0 % de la región de Caborca, muy similar al control de vitamina C a una concentración máxima de 100 µg/mL. En otro estudio realizado por Navarro y col., (2012) se determinó de igual manera la AAO de propóleos sonorenses de la región de Magdalena de Kino y Sonoyta, a la misma concentración del estudio mencionado anteriormente y la AAO de los EMP resultó ser de 35%. Estos resultados sugieren que la composición química de los propóleos varíe según la fuente botánica que las abejas utilicen para producir dichos propóleos.

Siguiendo con las investigaciones mencionadas anteriormente, Valencia y col., (2012) evaluaron la composición química y la AAO de propóleos de la región de Ures, Sonora., la cual,

fue de 19.7% a 100 µg/mL, siendo la última muestra la que tuvo mayor cantidad de compuestos fenólicos y los autores concluyeron que éstos son los responsables para que el extracto presente una buena AAO. Sin embargo, en el trabajo descrito por Pereira-Dutra R. y col., (2014) evaluaron geopropóleos de *Melipona fasciculata* y evaluando un extracto en solventes diferentes, las dos muestras con mayor cantidad de fenoles totales resultaron ser las muestras con mayor actividad antioxidante, coincidiendo así con el estudio anterior. En el presente trabajo se observó de manera similar que el EEP que mostró mayor AAO el de la abeja *Apis mellifera* y comparando con la AAO del resto de los EEP, se puede concluir que el EEP-AM puedan contener más compuestos fenólicos que los EEP-M.

En el trabajo realizado por Morales H., (2015) se realizó el contenido total de fenoles totales de muestras de meliponas en Veracruz, México y el geopropóleos de *Melipona beecheii* fueron las muestras que presentaron la mayor cantidad de fenoles totales, que comparando con los resultados de este trabajo el EEP-MB fue la muestra con mayor AAO de los EEP-M.

Un estudio sobre la capacidad antioxidante de geopropóleos realizado por Manrique y col. (2008), encontraron que los EEP presentaron elevada AAO pero bajo contenido de flavonoides y también los EEP de dos especies diferentes de abejas sin aguijón provenían del mismo meliponario y mostraron el mismo comportamiento, lo cual pudiese relacionarse con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 2. Actividad antioxidante de extractos etanólicos de propóleos de abejas melipona y un extracto etanólico de propóleos de abeja *Apis mellífera* determinado por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a la máxima concentración ensayada (200 µg/mL).

Extracto	Actividad antioxidante (%) ± D.S. Conc. ensayada 200,0 µg/mL
<i>Apis mellífera</i>	52.1 (± 0.80)
<i>Melipona beecheii</i>	20.7 (± 1.12)
<i>Nannotrigona perilampoides</i> (I)	16.8 (± 0.35)
<i>Nannotrigona perilampoides</i> (II)	13.7(± 0.50)
<i>Scaptotrigona mexicana</i>	11.8 (± 4.16) ^a

a desviación estándar

(I) y (II) EEP de colmenas diferentes.

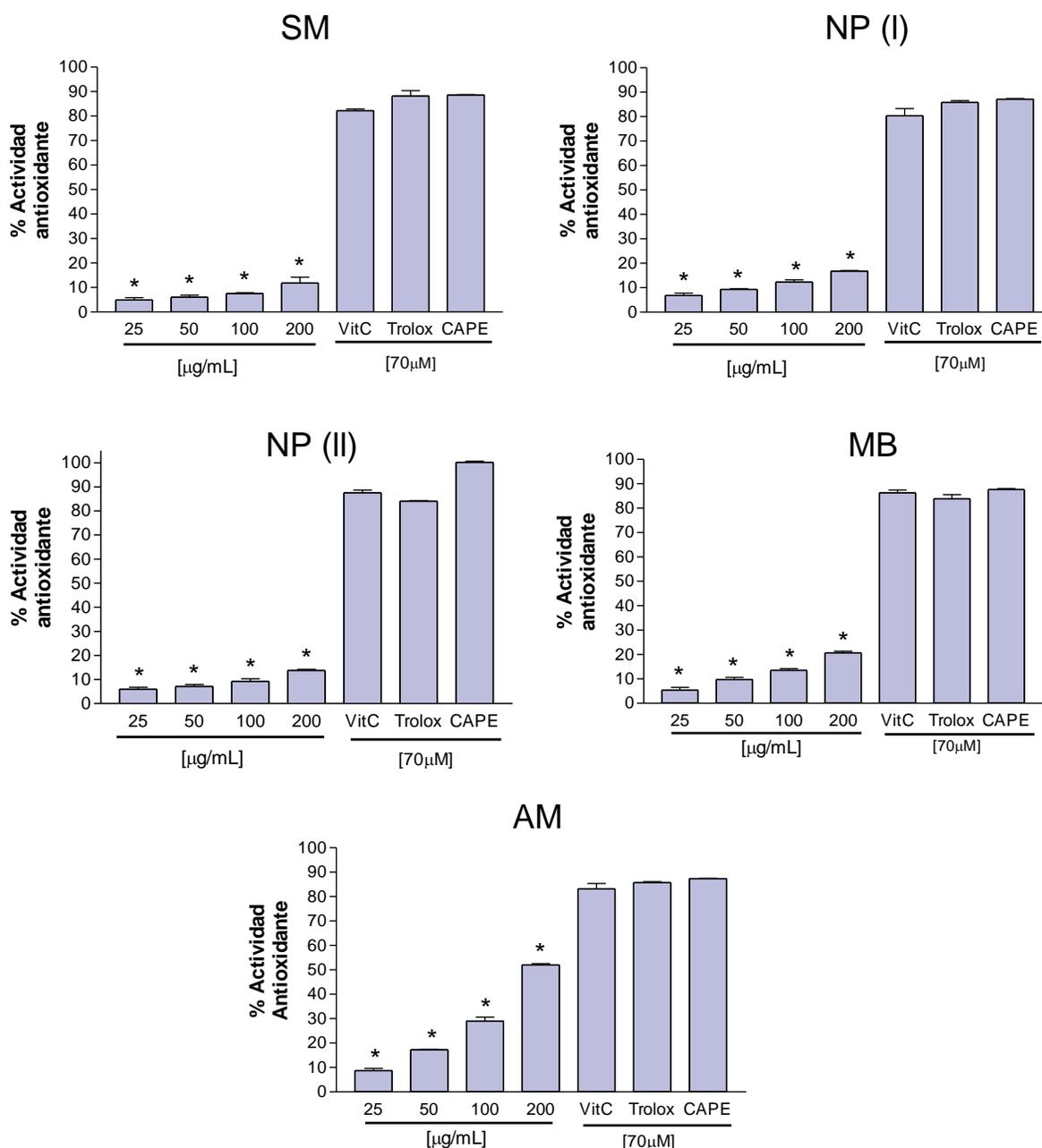


Figura 5. Actividad antioxidante de Propóleos de Veracruz SM, NP (I), NP (II), MB y AM determinado por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a diferentes concentraciones: 25,0 µg/mL; 50,0 µg/mL ; 100,0 µg/mL ; 200,0 µg/mL. Los resultados obtenidos son representativos de al menos tres experimentos independientes y todos los valores representan la media de determinaciones por triplicado. El * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a la Vit C a las concentraciones probadas.

Actividad antibacteriana

Existen numerosos estudios de extractos de propóleos de *Apis mellifera* alrededor del mundo que demuestran tener actividad antimicrobiana entre las cuáles se encuentra la actividad antibacteriana, la cual es considerada como una alternativa a tratamientos y prevención de diversas enfermedades infecciosas (Barrientos y col., 2003).

Diversos autores concluyen que las bacterias Gram-positivas son más susceptibles que las Gram-negativas esto se debe a que las Gram-negativas tienen una pared celular más compleja y con un alto contenido en lípidos. Velázquez y col., (2007) analizaron la actividad antibacteriana de tres muestras de propóleos provenientes de regiones diferentes del desierto de Sonora, al norte de México, en el cual, los EP presentaron AAB contra las bacterias Gram-positivas y las diferencias entre los extractos fueron atribuidas a las diferencias cualitativas y cuantitativas de las muestras. Navarro y col., (2012) evaluaron la AAB de propóleos Sonorenses de dos regiones diferentes contra bacterias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* O1), el extracto de Magdalena de Kino presentó una inhibición de *S.aureus* cercana al 100% a la concentración de 200 µg/mL y el mismo extracto presentó una MCI₉₀ de 400 µg/mL contra *V. cholerae* O1.

En el presente trabajo los EEP fueron evaluados por el método de microdilución en placa de 96 pozos a concentraciones de 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL y 400 µg/mL utilizando Gentamicina como control de inhibición bacteriana. Se observó que los EEP de Veracruz mostraron un porcentaje de inhibición menor al 20.0% frente a *E. coli* y *S. aureus* en todas las concentraciones probadas. El extracto de *Scaptotrigona mexicana* mostró el mayor porcentaje de inhibición de 18.0% frente *E. coli* a una concentración de 400,0 µg/mL. Por otra parte, se observó que los EEP no inhibieron el crecimiento bacteriano y por lo tanto, no mostraron actividad MIC₅₀ en un intervalo de 50-400 µg/mL. Los resultados fueron representativos de al menos tres experimentos independientes y se realizaron determinaciones por triplicado.

La AAB se ha correlacionado con la presencia de algunos compuestos fenólicos: acacetina, CAPE, crisina, galangina, pinocembrina, pinobanksina y naringenina (Sagdic y col., 2007) compuestos que no todos fueron encontrados en la evaluación de los extractos por Morales H., (2015), por lo tanto otros estudios para verificar los compuestos mencionados anteriormente serían importantes para determinar su relación con la baja AAB de los EEP evaluados en este trabajo. En Brasil se realizó un estudio de la composición química y AAB de geopropóleos de abejas sin aguijón en los cuales los principales compuestos fueron fenólicos y triterpenos

(Mendes Araujo M.J.A. y col., 2015). Este último coincide con los resultados obtenidos de los EP de Veracruz, México (Morales H., 2015, Tesis de Licenciatura).

Manrique A. y col.,(2008) evaluaron la composición química de abejas sin aguijón y a pesar que diversos autores atribuyen a los flavonoides parte de la actividad antibacteriana, las muestras evaluadas mostraron valores muy bajos de flavonoides y se infiere que pudieran existir otras variables que influyeran en esta actividad biológica.

A la fecha no se tienen reportes del estudio de actividad antibacteriana de propóleos de meliponas en México, pero en comparación con la investigación realizada por Cunha M.G. y col., (2013) quienes evaluaron la AAB de geopropóleos de *Melipona scutellaris* de Brasil, obtuvieron buena actividad contra las bacterias Gram-positivas pero baja inhibición contra *P. aeruginosa*, un bacilo Gram-negativo de. Ferreira J. y col., (2014) también evaluaron la AAB de gepropóleos de *Melipona orbinyi* en Brasil y de igual manera mostraron buena actividad contra *S. aureus* tiendo un efecto bactericida sobre ésta a 3.1 mg/mL, pero no presentó AAB contra *E. coli*. Éstos últimos autores coinciden con estudios realizados con propóleos de *Apis mellifera* y difieren de los extractos evaluados en el presente trabajo por presentar mayor AAB el EEPM-EM siendo éste de una melipona.

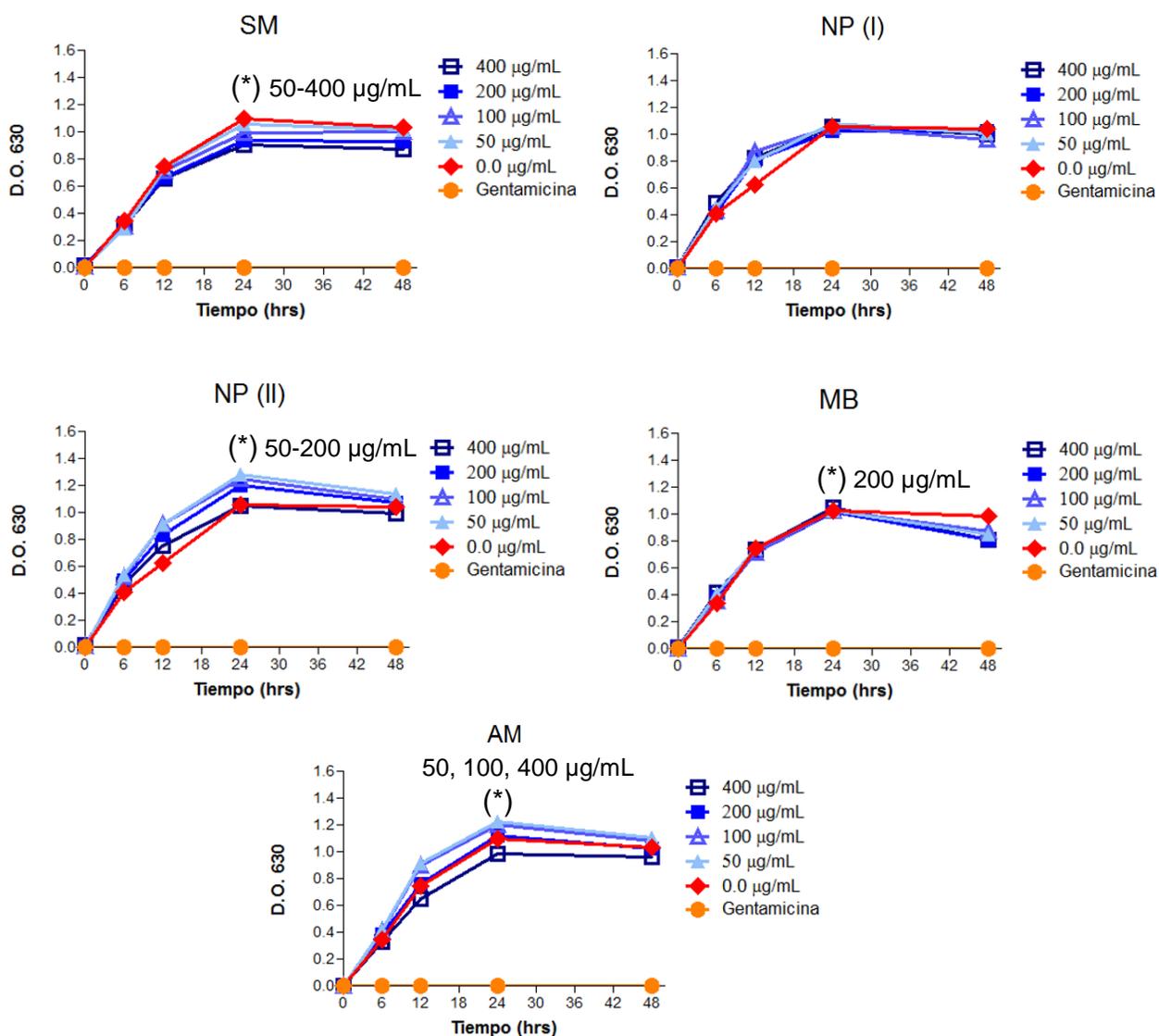


Figura 6. Actividad Antibacteriana vs. *E.coli* de Propóleos de Veracruz SM, NP (I), NP (II), MB y AM determinado por el método microdilución en placa a diferentes concentraciones: 50 µg/mL; 100,0 µg/mL; 200,0 µg/mL y 400,0 µg/mL. Los resultados obtenidos son representativos de al menos tres experimentos independientes y todos los valores representan la media de determinaciones por triplicado. (*) Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) conforme al desarrollo control (0.0 µg/mL) a las 24 horas.

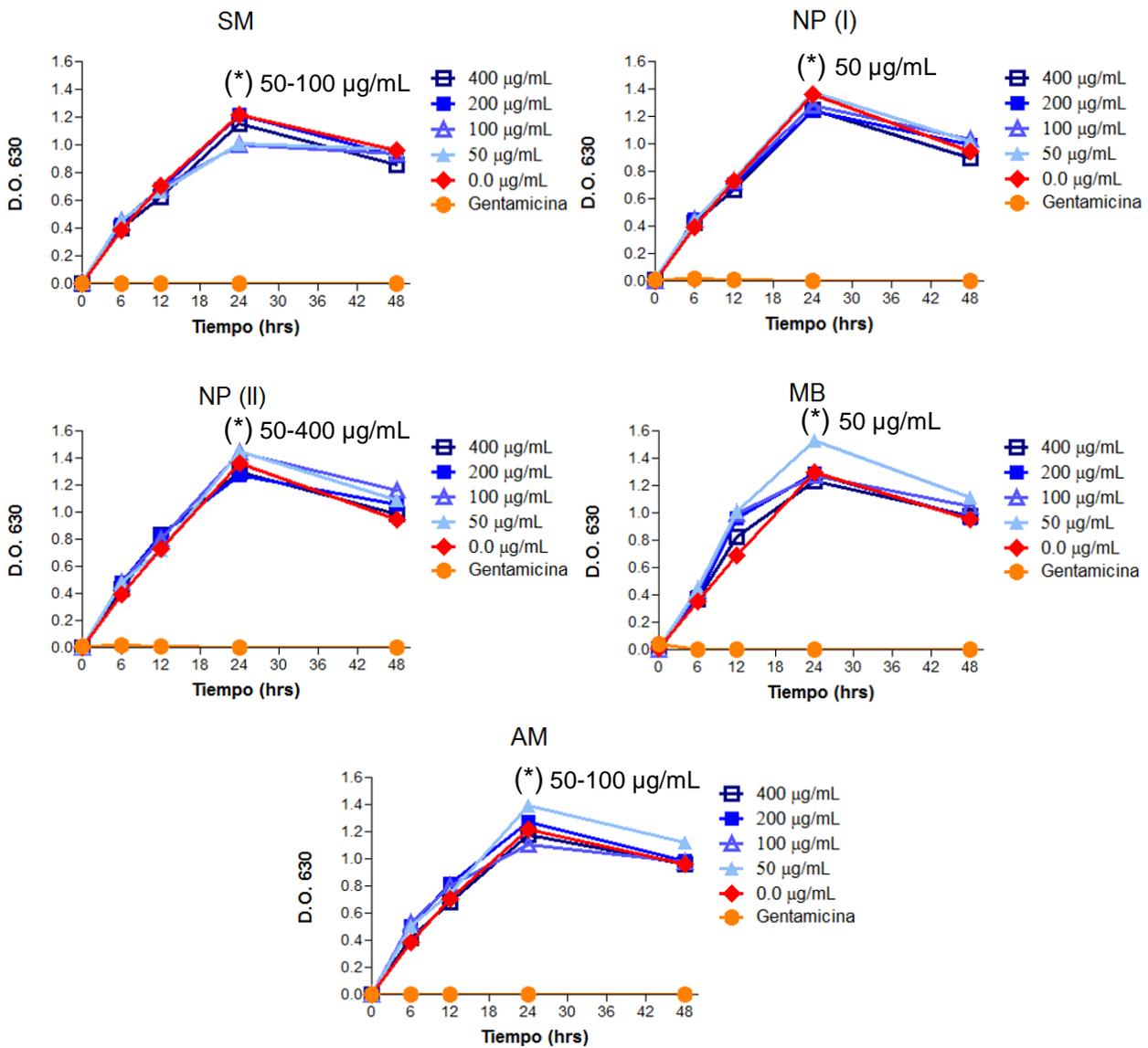


Figura 7. Actividad Antibacteriana vs. *S.aureus* de Propóleos de Veracruz SM, NP (I), NP (II), MB y AM determinado por el método microdilución en placa a diferentes concentraciones: 50 µg/mL; 100,0 µg/mL; 200,0 µg/mL y 400,0 µg/mL. Los resultados obtenidos son representativos de al menos tres experimentos independientes y todos los valores representan la media de determinaciones por triplicado. (*) Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) conforme al desarrollo control (0.0 µg/mL) a las 24 horas.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de propóleos de *Apis mellifera* mostró actividad antioxidante mayor a los de melipona, a la mayor concentración evaluada (200 µg/mL).

El extracto etanólico de geopropóleos que presentó mayor actividad antioxidante fue el de *Melipona beecheii*.

Los extractos etanólicos de geopropóleos de Veracruz no mostraron actividad antibacteriana significativa contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

El extracto etanólico de propóleos que mostró mayor actividad antibacteriana fue de *Scaptotrigona mexicana* frente a la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922.

RECOMENDACIONES

Estudiar los compuestos activos con actividad antioxidante presentes en los geopropóleos de Veracruz.

Estudiar los compuestos activos con actividad antioxidante en propóleos de *Apis mellifera* de Veracruz.

Es recomendable ampliar la evaluación hacia otras actividades biológicas: la actividad antimicótica, antiparasitaria, antiviral, cicatrizante, anti-inflamatoria, entre otras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S., Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7286–7292.
- Akao Y., Maruyama H., Matsumoto K., Ohguchi K., Nishizawa K., Sakamoto T., Araki Y., Mishima S., y col. (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull*. 26:1057-1059.
- Alday E., Valencia D., Carreño A.L., Picerno P., Piccinelli A.L., Rastrelli L., Robles-Zepeda R., Hernández J., Velázquez C. (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B- cell lymphoma cell line. *Chemico-Biological Interactions* 242: 35-44.
- Alves S., Amorim C., Sarmiento E.M., Sarmiento T.M. (2013). Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1:801383.
- Amed G., Hegazia., Faten K., Abd El Hady. (2002). Egyptian Propolis: Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Redained Lands. *Z Naturforsch*. 57c. 395-402.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the generative disease of aging. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 90: 7915-7922.
- Arjun H., Banskota., Takem N., Lucia Y., Yasuhiro T., Suresh A; Kiyoshi M., Katsumichi M., Shiguetoshi K. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 80:67-73.
- Ayala R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana* 106:1-123.

- Baizman E.R., Branstrom A.A., Longley C.B., Allanson N., Sofia M.J., Gange D., Goldman R.C. (2000). Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. *Microbiology (UK)*. 146: 3129-3140.
- Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Sforcin J.M., Frete X., Kujumgiev A., Maimoni-Rodella R., Popov S. (1999). Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Z. Naturforsch.* 54: 401-405.
- Bankova V., Castro S.L., M.C. Marcucci. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31:3-15
- Bankova V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2(1):29-32
- Banskota A.H., Tezuka Y., Kadota S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. 15:561- 571.
- Barlak Y., Değer O., Colak M., Karatayli S.C., Bozdayi A.M., Yücesan F. (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Science*. 9:1-5
- Barrientos L., Herrera C., Montenegro G., Ortega X., Veloz J., Alvear M., Cuevas A., Saavedra N., Salazar L. (2013). Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(2): 577-585.
- Barth O.M. (2006). Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. *Apiacta* 41: 71-85.
- Bonvehí, J.S.; Coll, F.V. (2000). Study on propolis quality from China and Uruguay. *Z. Naturforsch.* 55:778-784.

- Bosio K., Avanzini C., D'Avolio A., Ozino O., Savoia D. (2003). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. Letters in Applied Microbiology. 31:174-177.
- Burdock G. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis) Food and Chemical Toxicology. 36:347-363.
- Cadwell K.L., Winek J.L., Becvar D.S. (2006). The relationship between marriage and family therapists and complementary and alternative medicine approaches: a national survey. Journal of Marital and Family Therapy. 32:101-114.
- Castaldo S., F. Capasso. (2002). Propolis, and old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 73:S1-S6.
- Chen C.N., Weng M.S., Wu C.L., Lin J.K. (2004). Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. eCAM. 1(2):175-185
- Chen C.N., Wu C.L., Lin J.K. (2003). Cytotoxic prenylflavones from Taiwanese propolis. Journal of Natural Products. 66: 503-506.
- Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., y Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis form several regions of Korea. LWT- Food Science and Technology. 39:756-761
- Choudhari M.K., Punekar S.A., Ranade R.V., Paknikar K.M. (2012). Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona sp.*) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. J. Ethnopharmacol. 141: 363-367.
- Cunha M.G., Franchin M., Galvão L.C., Tasca-Gois A.L., Carvalho J.E., Ikegaki M., Alencar S.M., Koo H., Rosalen P.L. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis.13:23

- El Sohaimy S.A., Masry S.H.D. (2014). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian and Chinese Propolis. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*; 14(10): 1116-1124.
- Falcão S.I., Vilas-Boa M., Estevinho L.M., Barros C., Domingues M.R.M., Cardoso S.M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2):887-897.
- Farnesi A.P., Aquino-Ferreira R., De Jong D., Bastos J.K., SOares A.E.E. (2009). Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet. Mol. Res.* 8:635-640.
- Farré R., Frassetto F.R., Sánchez A. (2004). El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* 45:21-43.
- Fernandes Jr A., L. Leomil, Fernandes A.H. y Sforcin J.M. (2001). The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J. Venom. Ani. Toxins*, 7(2): 173-182.
- Ferreira-Campos J, Pereira dos Santos U, Benítez Macorini L.F., Mestriner Felipe de Melo A.M., Perrella Balestieri J.B., Paredes-Camero E.J, Lima Cardoso C.A., de Picoli Souza K., Lucas dos Santos E. (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbinyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chemical Toxicology*. 65:374-380.
- Fokt H., Pereira A., Ferreira A.M., Cunha A., Aguiar C. (2010). How do bees prevent hive infections?. The antimicrobial properties of propolis, in *Current Research. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Mendez-Vilas, A., Ed., *Microbiology Book* 1(2):481-493.
- Freitas S.F., Shinohara L., Sforcin J.M., Guimarães S. (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*. 13: 170-175.
- Freitas M.O., Ponte F.A.F., Lima M.A.S., Silveira E.R. (2008). Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. *J.Braz.Chem. Soc.* 3:532-535.

- González A.A.P., Domínguez A.A.N., Días J.J., Almenteros R.E.L. (2012). Universidad de Ciencias Médicas Pinar del Río. Revista Universidad Médica Pinareña. 8(1)
- Hernandez J., Goycoolea F.M., Quintero J., Acosta A., Castaneda M., Dominguez Z., y col. (2007). Sonoran Propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*, 73, 1469-1474.
- Kerr W. E., Nascimento V., Carvalho G.A. (1994). Há salvação para os meliponíneos? En Zucchi Drumond R.P., Fernandes-da-Silva P.G., Augusto S.C. (Eds) Anais 1er Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, FFCLRP, Ribeirão Preto. 1:60-65.
- Khalil M.L. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 1:22-31.
- Kim K.S., Lee S., Lee Y.S., Jung S.H., Park Y., Shin K.H., Kim B-K. (2003). Antioxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *Journal of Ethnopharmacology*. 85:69-72.
- Kumazawa S., K. Hayashi., Kajiya K., Ishii T., Hamasaka T., Nakayama T. (2002). Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:4777- 4782.
- Kuo, H.C., Kuo W.H., Lee Y.J., Lin W.L., Chou F.P., Tseng T.H. (2005). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in Vitro*. *Cancer Letters*. 20:1-10.
- Li F., Awale S., Zhang H.Y., Tezuka Y., Esumi H., Kadota S. (2009). Chemical Constituents of Propolis from Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against a Human Pancreatic Cancer Cell Line. *Journal of Natural Products*. 72: 1283-1287.
- Lima B., Tapia A., Luna L., Fabani M.P., Schmeda-Hirschmann G., Podio N.S., y col. (2009). Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 2691-2698.

- Lofty M. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific J Cancer Prevention*. 7:22-31.
- Lotti C., Fernandez M.C., Piccinelli A.L., Cuesta-Rubio O., Hernandez I.M., Rastrelli L. (2010). Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2209-2213.
- Machado G.M., Leon L.L., Lisboa De Castro S. (2007). Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. [<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v102n1/5682.pdf>]. 102(1): 73-77
- Majiene D., Trumbeckaite S., Pavilonis A., Savickas A., Martirosyan D.M. (2007). Antifungal and Antibacterial Activity of Propolis. *Current Nutrition and Food Science*. 3: 304-308.
- Manrique A., Santana W. (2008). Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Trop*. 26(2): 157- 166.
- Mendes Araujo M.J.A., Búfalo M.C, Conti B.J., Fernandes Jr. A., Trusheva B., Bankova V., Sforcin J.M. (2015). The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *Journal of Molecular Pathophysiology*. 4(1):12-10.
- Michener C.D. (2000). *The Bees of the World*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, Boston
- Moreno M.I.N., Isla M., Samprieto A.R., Vattuone A. (2000). Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 109-114.

- Murillo Franco E. (2004). Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de té comercializadas en Costa Rica. Estudio Antioxidantes de Bebidas. Universidad de Panamá, Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT). Laboratorio de Alimentos y Nutrición.
- Oliveira M., Cunha J. (2005). Albehas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae) exploran recursos na floresta amazónica. Rev. Acta Amazõ. 35 (3): 389-394.
- Paulino N., Dantas A.P., Bankova V., Taggliari D., Scremin A., Lisboa de Castro S., Batista J. (2003). Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits *in vitro* contractios of airway smooth muscle. Journal of Pharmacology Sciences. 93:307-313
- Pepeljnjak S. y Kosalec I. (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple – resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters 240:111-116
- Pereira Dutra R., Vinicius B.A., Soares Cunha M., Aranha M.C., Brandão Torres L.M., Fernandes F.R., Sousa M.N., Meireles R.N. (2014). Phenolic acids, Hidrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. J. Agric. Food Chem. 62:12:2549–2557
- Piccinelly A.L., Fernandez M.C., Cuesta-Rubio O., Hernandez I.M., De Simone F., Rastrelli L. (2005). Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 9010-9016.
- Pino J., Marbot R., Delgado A., Zumárraga C., Sauri E. (2006). Journal Essent Oil Res. 18: 53-56.
- Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankova V. (2005). Antimicrobial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine. 12: 221-228.
- Ramalho M. 2004. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. Acta Bot. Bras. 18(1): 37-47.

- Reyes-González A., Camou-Guerrero A., Reyes-Salas O., Argueta A., Casas A. (2014). Diversity, local knowledge and use of stingless bees (*Apidae: Meliponini*) in the municipality of Nocupétaro, Michoacan, Mexico. *J Ethnobiol Ethnomed.*10: 47-58.
- Russo A., Cardile V., Sanchez N, Troncoso N., Vanella A., Garbarino J.A. (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life sciences* 76: 545-558.
- Sagdic O., Silici S., Yetim H. (2007). Fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in apple juice treated with propolis extract. *Annals of Microbiology.* 57(3): 345-348.
- Sahinler N., Kaftanoglu O. (2005). Natural product propolis: chemical composition. *Nat Prod Res.* 19: 183-188.
- Sá-Nunes A., Faccioli L.H., Sforcil J.M. (2013). Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. São Paulo, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 87:93-97
- Sawaya A.C.H.F., Cunha I.B.S., Marcucci M.C., Rodrigues R.F.O., Eberlin M.N. (2006). Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. *Apidologie.* 37:398-407.
- Sawaya A.C.H.F., Cunha I.B.S., Marcucci M.C., Aida D.S., Silva E.C.A., Carvalho C.A.L., Eberlin M.N. (2007). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. *Apidologie.* 38:93-103.
- Sawaya A.C.H.F., Calado J.C.P., dos Santos L.C., Marcucci M.C., Akatsu I.P., Soares A.E.E., Abdelnur P.V., Cunha I.B.S., Eberlin M.N. (2009). Composition and antioxidant activity of propolis from three species of Scaptotrigona stingless bees. *Journal ApiProduct ApiMedical Sci.* 1:37- 42.
- Schnitzler P., Neunner A., Nolkemper S., Zundel C., Howack H., Heinz K., Reichling Jürgen. (2010). Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research.* 24:20-28.

- Sforcin J.M., Fernandes A., Lopes C.A.M., Bankova V., Funari S.R.C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 73: 243-249.
- Sforcin J.M., Fernandes Junior A., Lopes C.C.M., Funari S.R.C., Bankova V. (2001). Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 7: 1-7.
- Sforcin J.M. and Bankova V., (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. 33(2):253-260.
- Silva-Carvalho R, Baltazar F., Almeida-Aguiar C. (2015) Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* 2015 (2015): 206439. PMC. Web. 13 Aug. 2015.
- Silveira F.A., Melo G.A.R., Almeida E.A.B. (2002) *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação, Composição e Arte*, Belo Horizonte, Brazil. 253
- Simone-Finstrom M, Spivak M. (2010) Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41:295-311.
- Sulaiman G.M., Ad'hiah A.H., Al- Sammarrae K.W. y col. (2012). Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo, *Food and Chemical Toxicology*, 50(5): 1632-1641.
- Suzuki S., Amano K., Suzuki K. (2009). Effect of propolis volatiles from a stingless honeybee (*Apidae: Meliponinae*) on the immune system of elderly residents in a nursing home. *Int J Indust Entomol*; 19:193-197.
- Tutour B.L. (1990). Antioxidative activities of algal extracts. Synergistic effect with vitamin E. *Phytochemistry*. 29:3759-3765.

- Uzel A., Sorkun K., Öncag Ö., Cogulu D., Gencay Ö y Sali B. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research*. 160:189-195.
- Usia T., Banskota A.H., Tezuka Y., Midorikawa K., Matsushige K., Kadota S. (2002) Constituents of chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of Natural Products*. 65:673-676.
- Valencia D., Alday E., Robles R., Garibay A., Galvez J.C., Salas M., Jiménez M., Velázquez E., Hernández J., Velázquez C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*. 131:645-651.
- Vargas-Sánchez R.D., Torrescano-Urrutia G.R., Mendoza-Wilson A.M., Vallejo-Galland B., Acedo-Félix E., Sánchez-Escalante J.J., Peñalba-Garmendia MC., Sánchez-Escalante A. (2014). Mecanismos Involucrados en la Actividad Antioxidante y Antibacteriana del Propóleos. 16(1):32-37.
- Velázquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Dominguez Z., Robles Z., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F.M., Velázquez E.F., Astiazaran H., Hernández J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 103:1747-1756.
- Velikova M., Bankova V., Marcucci M.C., Tsvetkova I., Kujumgiev A. (2000). Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Z Naturforsch* 55: 785-789.
- Velthuis H. (1997). The biology of stingless bees. Dept of Entomology and Socio-ecology. Utrecht University, The Netherlands. :33
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *J Food Science*; 73: 117-124.
- Yáñez-Ordóñez O., Ortega M.T., Bousquets J.L. (2008). Distribution patterns of species of the Meliponi (hymenoptera: apoidea: apidae) tribe México.