



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE CAMPO PARA DETECCIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES EN PROPÓLEOS MEXICANOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

SOFÍA GUADALUPE VILCHIS FONSECA

ASESORES:

M. EN C. BETSABÉ RODRÍGUEZ PÉREZ
DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Tesis y Examen Profesional

Desarrollo de una prueba de campo para detección de fenoles y flavonoides en propóleos mexicanos.

Que presenta la pasante: **Sofía Guadalupe Vilchis Fonseca**

Con número de cuenta: **411084925** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
VOCAL	M. en C. Judith García Arellanes	
SECRETARIO	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	Dra. Ma. Olivia Noguez Córdova	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alma Susana García Barrón	

NOTA: los síndicales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga*

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyecto IT200915 denominado “Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelisis del conejo, el distemper canino y la otitis canina”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida (Folio 137615).

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, en las instalaciones del Laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) a cargo del Dr. Tonatiuh Cruz, y en Campo 1, en el Laboratorio L121 de Química Orgánica a cargo del Dr. Guillermo Penieres.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por darme todo lo necesario para estar en donde estoy el día de hoy, pero especialmente a mi mamá, por darme siempre más de lo debido y apoyarme hasta en mis más ridículos sueños. Jamás podría terminar de mencionar todo lo que has hecho por mí, ni he encontrado la forma de hacerte sentir lo mucho que agradezco que estés conmigo, pero esta tesis lleva mucho de tu trabajo, tus consejos, tu apoyo y tu amor.

A mi hermano, porque aunque eres pequeño has hecho grandes cosas para ayudarme.

A Víctor, mi persona favorita, por todas las razones que tú sabes, soy tan afortunada de haberte conocido.

A mis amigos y compañeros, sobre todo a aquellos que permanecieron hasta el final, Kath, Carmen, Cinthia, Gaby, Bris, Phanie, Dany, Dagmar y Chucho, por haber formado parte de mi desarrollo personal y profesional, y hacer de estos cuatro años los más divertidos y memorables que he tenido hasta ahora.

A mis profesores, desde la profesora Martha Hernández que encendió en mí la primera chispa de interés por la Química, hasta aquellos que jamás creí encontrar en el camino. A Lety Cubillo, mi profesora, y ahora compañera y amiga.

A mis asesores, Dr. Tonatiuh Cruz y M. C. Betsabé Rodríguez, por la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por la paciencia que han tenido y la confianza que han depositado en mí.

A mis profesoras y miembros de jurado, por su orientación no sólo en esta etapa, sino desde que nos conocimos en un salón de clases. Las admiro y las recuerdo con mucho cariño.

A los miembros del Laboratorio 6, Bere, Eli, Iris, Reina y Nelly por haber compartido conmigo sus conocimientos y su valiosa amistad, y hacer de MVZ mi segunda casa.

A todas las personas que de una u otra manera han aportado algo a vida.

Y finalmente, pero no menos importante, a mi bella Universidad Nacional Autónoma de México, porque aún después de terminar esta tesis me sigue abriendo las puertas a lo que sigue.

*A Banni,
te amo mi pequeña saltamontes.*

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS.....	x
ABREVIATURAS	xii
GLOSARIO	xiv
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Generalidades	3
3.1.1 Antecedentes	4
3.1.2 Uso del propóleo dentro de la colmena	4
3.1.3 Producción de propóleo en México	5
3.2 Propiedades físicas y químicas.....	7
3.2.1 Propiedades físicas.....	7
3.2.2 Propiedades químicas	8
3.3 Metabolismo secundario de las plantas	8
3.3.1 Fenoles	10
3.3.2 Flavonoides	14
3.3.3 Propiedad antioxidante.....	15
3.4 Actividad biológica del propóleo.....	16
3.4.1 Actividad antimicrobiana	17
3.4.2 Otras aplicaciones	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. OBJETIVOS	20
6. HIPÓTESIS	21
7. METODOLOGÍA.....	22
7.1 Preparación de muestras.....	23
7.2 Elaboración de tinturas y extracto blando de propóleo.....	23

7.3 Pruebas cualitativas	24
7.3.1 Fenoles	24
7.3.2 Flavonoides	24
7.3.3 Índice de oxidación.....	25
7.4 Pruebas cuantitativas.....	25
7.4.1 Fenoles	25
7.4.2 Flavonoides	26
7.5 Demostración del efecto antimicrobiano.....	28
7.5.1 Método de difusión en placa	28
8. RESULTADOS.....	30
8.1 Detección de fenoles	31
8.2 Detección de flavonoides.....	33
8.3 Determinación del índice de oxidación	34
8.4 Pruebas cuantitativas: fenoles y flavonoides.	36
8.5 Elaboración de escala de colores.....	39
8.6 Demostración de efecto antimicrobiano.....	41
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
10. CONCLUSIONES.....	52
11. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	53
12. REFERENCIAS	54
13. ANEXOS.....	548
Anexo 1. Preparación de reactivos	58
Anexo 2. Fichas de Seguridad Química.....	59
Anexo 3. Determinación del espectro de absorción para las pruebas cuantitativas.	72
Anexo 4. Curvas de calibración para las pruebas cuantitativas.	74
Anexo 5. Preparación de medios de cultivo	76

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Abejas Apis mellifera en colmena.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Distribución de Productores Apícolas por Entidad Federativa.</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3. Volumen de la Producción de polen y Propóleos en México durante el periodo 2000-2008.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4. Tonalidades de varias muestras de propóleo en greña.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 5. Rutas metabólicas de las plantas</i>	<i>9</i>
<i>Figura 6. Estructura de algunos compuestos fenólicos.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 7. Biosíntesis de fenoles y flavonoides.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 8. Esqueleto de los flavonoides. 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona).</i>	<i>14</i>
<i>Figura 9. Flavonoide base (naringenina chalcona) y formación de flavonona.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 10. Estructura química del CAPE.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 11. Diseño experimental para la determinación de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en propóleos.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 12. Prueba cualitativa de presencia de fenoles en propóleo en greña</i>	<i>31</i>
<i>Figura 13. Prueba cualitativa de presencia de fenoles en tintura de propóleo.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 14. Prueba cualitativa de presencia de fenoles en extracto blando de propóleo</i>	<i>32</i>
<i>Figura 15. Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en propóleo en greña</i>	<i>33</i>
<i>Figura 16. Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en tintura de propóleo.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 17. Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en extracto blando de propóleo.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 18. Prueba de determinación de índice de oxidación.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 19. Tonalidades de las soluciones de la curva de calibración para fenoles preparadas a partir del estándar de ácido gálico</i>	<i>37</i>
<i>Figura 20. Tonalidades de los soluciones de la curva de calibración para flavonoides preparadas a partir del estándar de quercetina</i>	<i>38</i>
<i>Figura 21. Escala de colores para la determinación cualitativa del contenido de fenoles en propóleo.....</i>	<i>39</i>

<i>Figura 22. Escala de colores para la determinación cualitativa del contenido de flavonoides en propóleo.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 23. Escala de colores para la determinación cualitativa del índice de oxidación en propóleo.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 24. Efecto inhibitorio de los EEP sobre S. aureus a una concentración de 4 mg/mL..</i> <i>.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 25. Prueba de difusión en agar para C. albicans a una concentración de 4 mg/mL..</i> <i>.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 26. Prueba de difusión en agar para E. coli a una concentración de 4 mg/mL.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 27. Modelo de rombo establecido por la ANPF para comunicar los riegos de materiales peligrosos.....</i>	<i>59</i>

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.	26
Tabla 2. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales.	27
Tabla 3. Rendimiento o Porcentaje de sólidos solubles en etanol de las tinturas de propóleo.	31
Tabla 4. Resultados de la determinación del Índice de oxidación.	35
Tabla 5. Resultados de la determinación cuantitativa de fenoles en extracto etanólico....	36
Tabla 6. Resultados de la determinación cuantitativa de flavonoides en extracto etanólico.	37
Tabla 7. Intervalos de tiempo para determinar la calidad del índice de oxidación en propóleo.	40
Tabla 8. Resultados de la determinación cualitativa de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en propóleo utilizando como referencia las escalas de colores correspondientes.	41
Tabla 9. Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento para las cepas <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i> por el método de difusión en agar.....	43
Tabla 10. Longitudes de onda ensayadas para la cuantificación de fenoles.	72
Tabla 11. Longitudes de onda ensayadas para cuantificación de flavonoides.	73
Tabla 12. Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración para fenoles totales.	74
Tabla 13. Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración para flavonoides totales.	75
Gráfica 1. Resultados de la determinación del índice de oxidación en propóleo.....	35
Gráfica 2. Resultados de la determinación cuantitativa de fenoles en extracto etanólico.	36

Gráfica 3. Resultados de la determinación cuantitativa de flavonoides en extracto etanólico.....	38
Gráfica 4. Espectro de absorción para cuantificación de fenoles.	72
Gráfica 5. Espectro de absorción para cuantificación de flavonoides.	73
Gráfica 6. Representación gráfica de la curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.	74
Gráfica 7. Representación gráfica de la curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales.	75

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AlCl ₃	Tricloruro de aluminio
ANEMAAC	Asociación Nacional de Exportadores de Miel de Abeja
ANMVEA	Asociación Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Abejas
ATCC	American Type Culture Collection (Colección cultivos de tipo americano)
°C	Grados Celsius
CAPE	Caffeic Acid Phenethyl Ester (Éster feniletílico del ácido cafeico)
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
FeCl ₃	Cloruro férrico
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ICSC	International Chemical Safety Cards (Fichas internacionales de seguridad química)
INEGI	Instituto Nacional de Geografía e Informática
IPCS	International Programme of Chemical Safety (Programa Internacional de Seguridad Química)
KMnO ₄	Permanganato de potasio
lbs	libras
mg	Miligramo
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
N	Normalidad

Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NOM	Norma Oficial Mexicana
nm	Nanómetro
OIT	Organización Internacional del Trabajo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONA	Organización Nacional de Apicultores
PAL	Fenilalanina Amonio Lipasa
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	Acetato de plomo
ppm	Partes por millón
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

GLOSARIO

ATCC: Material biológico de referencia certificado. Se trata de un cultivo puro que cumple con las características morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes a la cepa en cuestión.

Antocianinas: Flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos, por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3.

Cera: Sustancia grasa segregada por las glándulas ceras de las obreras jóvenes. Es utilizada por las abejas como material de construcción de las celdillas de la colmena.

Fenoles: Son compuestos con un grupo $-OH$ unido a un anillo de benceno (también llamado hidroxibenceno o ácido carbólico). Como metabolitos secundarios de las plantas, son compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático, que puede contener o no otro grupo funcional.

Flavonoides: Es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Derivados de la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona).

Flavonoles: Son una clase de flavonoides que tienen como columna vertebral a la 3-hidroxi-flavona. Su diversidad se deriva de las diferentes posiciones de los grupos fenólicos.

Isoflavonas: También llamadas isoflavonoides, son un grupo de flavonoides en los que la posición del anillo aromático (anillo B) cambia a la posición 3. Derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona).

Índice de oxidación: Determinación visual de la capacidad antioxidante de un compuesto al reducir el catión Mn^{+7} del permanganato de potasio ($KMnO_4$), que actúa como agente oxidante, a Mn^{+2} .

Metabolitos secundarios: Compuestos orgánicos derivados del metabolismo secundario de las plantas que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo de éstas. Se diferencian de los metabolitos primarios en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal y se sintetizan en pequeñas cantidades.

Propóleo: Nombre genérico que se da a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la flora circundante al apiario (las especies florales de las cuales las abejas colectaran las resinas dependerán del ecosistema donde se encuentre el apiario). De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de la planta de origen desde el

rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante.

Resina: Secreción orgánica que producen muchas plantas, particularmente los árboles de tipo conífera.

1. RESUMEN

México se encuentra entre los diez primeros lugares en producción y exportación de miel. En los últimos años las tendencias han demostrado que los consumidores prefieren productos identificados por su origen natural, lo que presenta una oportunidad de mercado para otros productos apícolas como el propóleo. La aceptación pública y certificación del producto requiere del establecimiento de parámetros de control de calidad que éste debe poseer para favorecer su inserción y competencia en el mercado.

En 2015 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la propuesta de **Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana “Propóleos. Especificaciones y Métodos de Prueba”**, que contempla las especificaciones técnicas que este producto debe cumplir, así como los métodos de prueba para verificar los parámetros establecidos, con la finalidad de conseguir la inserción, posicionamiento y consolidación del propóleo en el mercado.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar la propuesta de una **prueba de campo** para la detección de **fenoles, flavonoides e índice de oxidación de propóleos mexicanos**, utilizando una metodología rápida y fácil de interpretar mediante escalas de colores, para presentarla como una prueba de rutina confiable para el control de calidad del producto denominado propóleo, en beneficio de los productores apícolas.

Se realizaron determinaciones cualitativas y cuantitativas de la concentración de fenoles, flavonoides e índice de oxidación de cuatro propóleos provenientes del Estado de México, para elegir el método más adecuado que se pudiera incluir como parte de la prueba de campo. El propóleo con menor concentración de fenoles y flavonoides (Villa del Carbón) y los de mayor concentración (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y Lago de Guadalupe), se tomaron como referencia para construir escalas de colores que representaran el rango de resultados para cada determinación.

Como información complementaria se demostró la relación entre la composición química del propóleo con su efecto antimicrobiano en cepas ATCC de las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), y del hongo *Candida albicans* (ATCC 14053), mediante la técnica de difusión en agar.

Por último, se elaboró la propuesta del kit de determinaciones con el inserto correspondiente, donde además de las instrucciones e interpretación de resultados, se incluye un breve manual de recomendaciones para el manejo de propóleo. Dado que el objetivo es beneficiar al sector apícola mexicano, se utiliza un lenguaje sencillo e ilustraciones que dejen claro el procedimiento a seguir. Se utilizaron viales y se identificó cada reactivo y material incluido.

2. INTRODUCCIÓN

La gran fluctuación en los costos en los que se ha estado cotizando la miel de abeja en los últimos años, ha hecho que los apicultores le presten más atención a otros productos de la colmena como son el polen, la jalea real, cera, veneno y propóleos. De éste último, se ha incrementado la demanda en el mercado mundial debido al conocimiento de sus propiedades biológicas.

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada y procesada por las abejas de la flora circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de la planta de origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante. El propóleo se puede recolectar mediante raspaduras de los cuadros o rejillas colocadas por encima del nido, para posteriormente obtener extractos con los cuales se elaboran gran cantidad de productos con actividad biológica en beneficio de la salud, así como en la industria cosmética y alimenticia.

Existen diversos factores que determinan la producción de propóleo de un apiario como son: la raza, características genéticas de la colmena (conducta propolizadora), la técnica de recolección, las condiciones ambientales y la flora circundante del apiario.

Su composición química depende directamente de su origen geográfico. Entre los componentes principales se encuentran flavonoides como quercetina, pinocembrina y crisina, así como los ácidos fenólicos cumárico, cafeíco y cinámico y sus derivados, entre los que destaca el éster feniletílico del ácido cafeíco (CAPE), con interesantes propiedades biológicas en apoptosis, metástasis y sensibilidad a radiaciones de células cancerosas.

Países como Brasil, Cuba, Bélgica y Grecia poseen normas de calidad para productos apícolas que incluyen el propóleo. En México, en los últimos años se han elaborado o modificado normas que regulan la comercialización de productos como la miel y jalea real, así como programas de asistencia técnica y capacitación que ayudan a que la actividad apícola se siga desarrollando, sin embargo, aún hace falta establecer criterios para el resto de los productos de la colmena.

En apoyo a las acciones para mantener e incrementar la competitividad de los propóleos mexicanos en el mercado, el presente trabajo plantea una metodología para el Control de Calidad de propóleos (composición química y propiedad antioxidante) y enfatiza la necesidad de cumplir con estos nuevos parámetros de calidad establecidos, así como la propuesta de implementar un Manual de Buenas Prácticas de Manejo y Producción de Propóleo, para que tanto pequeños productores como grandes empresarios apícolas puedan ofertar un producto en óptimas condiciones.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades

La palabra propóleo es una palabra derivada del término griego *pro* y *polis*, “delante de la ciudad”, es decir, el propóleo se encuentra en la entrada de la colmena.

El origen del propóleo es principalmente vegetal. Se trata de resinas o gomas viscosas e impermeables al agua que las abejas pecoreadoras van a recolectar en las yemas de los árboles como el álamo, los abedules, castaños, entre otros. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)

La recolección del propóleo se lleva a cabo por un número reducido de abejas (de más de 15 días de vida) y es realizada durante las horas más calientes del día. Cada abeja después de haber localizado con sus antenas la partícula más adecuada de resina en alguna planta, procede a desprenderla valiéndose de sus mandíbulas y del primer par de patas, auxiliándose de la secreción de sus glándulas mandibulares que le permiten el ablandamiento de la goma. (SAGARPA, 2010)

La cantidad de propóleo recolectada por las abejas varía de una raza a otra y de una colonia a otra. Una colmena puede producir hasta 300 gramos por año de propóleo. (Jean-Prost & Le Conte, 2007). Las abejas *Apis mellifera caucasica* y *A. mellifera intermissa* son consideradas altamente propolizadoras, ya que forman cortinas que bloquean la entrada a la colmena (piquera), permitiendo el paso de tan sólo una abeja. (Asís, 1989). En períodos de sequía, aparentemente la recolección de propóleos reemplaza a la recolección de néctar como actividad importante de la colmena. (Mendizabal, 2004)

La limitada producción de propóleos se debe al tipo de apicultura practicado, que se enfoca principalmente en la extracción de miel, así como al desconocimiento por parte de los apicultores de la técnica de extracción, o en algunos casos, el ignorar que dicha resina tiene valor comercial. (SAGARPA, 2010)

Actualmente se cuenta con diferentes técnicas de producción de propóleos, desde el simple raspado de las paredes internas de la tapa, cuadros y caja, hasta el uso de mallas plásticas y diversos tipos de rejillas. (SAGARPA, 2010)

Los principales países productores de propóleo en el mundo son: China, Brasil, Argentina, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá, así como, los países importadores que captan dicha producción son: Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Ucrania y Estados Unidos de Norte América. Cabe señalar que el número de países consumidores de propóleo va en aumento. (SAGARPA, 2010)

3.1.1 Antecedentes

Las propiedades terapéuticas de los productos de la colmena eran conocidas desde tiempos remotos y empleados empíricamente en el tratamiento de diversas afecciones. Los primeros reportes del uso farmacológico del propóleo aparecen a principios del presente siglo, incrementándose en los últimos años las investigaciones científicas enfocadas a su uso y elaboración de formas medicamentosas que han sido aplicadas con resultados alentadores. (Ghisalberti, 1979)

En México existen antecedentes de la actividad apícola con más de 3000 años en la cultura Olmeca, sin embargo, es en la cultura Maya donde hay mayores datos de antecedentes y prácticas apícolas que incluso se siguen practicando al día de hoy. (INEGI, 2009)

Las culturas prehispánicas cultivaban a las abejas sin aguijón (meliponinos) con fines alimenticios, medicinales y religiosos. La apicultura tecnificada se inició aproximadamente en el año 1920. La apicultura moderna se desarrolla a partir de las primeras exportaciones de miel alrededor de 1950. (INEGI, 2009)

3.1.2 Uso del propóleo dentro de la colmena

Las abejas utilizan el propóleo como masilla, cemento o bálsamo para cubrir el interior de la colmena con el fin de reforzarla y optimizar la regularización del microclima. Es así como las abejas agregan el propóleo a las construcciones injertadas artificialmente por el hombre. (Mendizabal, 2004)

También cumple las funciones de:

- fijar panales entre sí y a las paredes
- soldar las fisuras y las ranuras de la colmena, y así impedir el ingreso de elementos extraños (insectos, polvo, agua, viento, entre otras.)
- cubrir las superficies extrañas para formar una capa antiséptica que impide que se forme dentro de ella cualquier tipo de infección y/o que ésta se propague. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)



Figura 1. Abejas *Apis mellifera* en colmena.

FUENTE: SAGARPA, 2010

3.1.3 Producción de propóleo en México

La actividad apícola está presente en toda la República Mexicana, sustentada por los climas benéficos para la actividad, así como la variedad y abundancia de flora, principalmente en las zonas tropicales. De forma más significativa, la zona de mayor producción de miel se concentra en el sureste del país, específicamente en los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas. (INEGI, 2009)

La apicultura está en manos de casi 41,000 apicultores, siendo las principales asociaciones del sector:

- La Organización Nacional de Apicultores (ONA), compuesta por 167 Asociaciones Ganaderas Especializadas en Apicultura con aproximadamente 13,000 agremiados.
- La Asociación Nacional de Exportadores de Miel de Abeja (ANEMAAC), con 10 socios.
- La Asociación Ganadera Nacional de Criadores de Abejas Reina y Núcleos, que albergan entre 40 y 50 socios.
- La Asociación Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Abejas, A. C. (ANMVEA) con aproximadamente 40 agremiados.



Figura 2. Distribución de Productores Apícolas por Entidad Federativa.

FUENTE: Coordinación General de Ganadería/SAGARPA, 2010

México es el sexto productor y el tercer mayor exportador de miel a nivel mundial, situación que obedece a los aumentos de consumo de la miel y a la calidad del producto nacional. Sin embargo, a pesar de esta situación de oportunidad, todavía no se aprovechan las posibilidades para la explotación del comercio exterior de otros productos apícolas como el propóleo. Muchos países son importadores de productos de la colmena, como lo es Japón, que adquiere alrededor del 85 por ciento de la producción mundial de propóleos.

La Figura 3 muestra las unidades de producción de polen y propóleo en México hasta 2008. Durante los primeros años se registró cierta variación como consecuencia de la afectación de la producción apícola por factores climatológicos. Sin embargo, los indicadores mostrados ofrecen una visión de las oportunidades que se pueden desarrollar para otros productos de la colmena, lo que aumentaría su rentabilidad en beneficio del productor y en general de todos los sectores. (SAGARPA, 2010)

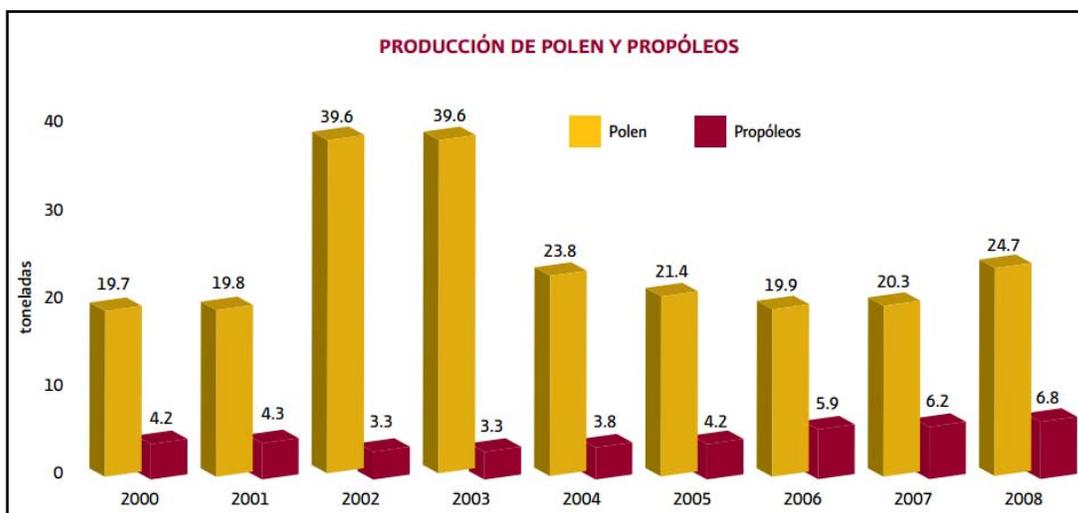


Figura 3. Volumen de la Producción de polen y Propóleos en México durante el período 2000-2008.

FUENTE: Coordinación General de Ganadería/SAGARPA (2008 cifras preliminares)

En abril de 2015 se publicó en el Diario Oficial de la Federación dentro del Programa de Normalización 2015, el **Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana “Propóleos. Especificaciones y Métodos de Prueba”**, que contempla las especificaciones técnicas que este producto debe cumplir, así como los métodos de prueba para verificar los parámetros establecidos, con la finalidad de conseguir la inserción, posicionamiento y consolidación del propóleo en nuevos mercados, o mercados potenciales ya conocidos, y al mismo tiempo asegurar que los productos que se ofrecen para la salud humana y animal sean de calidad.

3.2 Propiedades físicas y químicas

La preparación del propóleo bruto para su uso pasa por varias operaciones: limpieza, congelación, molido, disolución en alcohol, filtración, evaporación de la disolución alcohólica y mezcla en la proporción deseada con vaselina o lanolina. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)

Su composición química depende directamente de su origen geográfico. De manera general, separado de la cera, el propóleo contiene hidrocarburos, lípidos, alcoholes, aldehídos y ácidos, sustancias flavonoides, vitaminas, cumarinas y terpenoides. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)

3.2.1 Propiedades físicas

El propóleo puede adoptar tonalidades de color castaño, marrón, pardo, rojizo y verde, en algunos casos negros según su origen. Presenta una densidad mayor que la cera de abeja, se disuelve fácilmente en éter y cloroformo, parcialmente soluble en etanol. A temperaturas de 15°C es duro y quebradizo, a temperaturas más altas se ablanda y se vuelve pegajoso. Se funde entre 60° y 69°C. (SAGARPA, 2010)

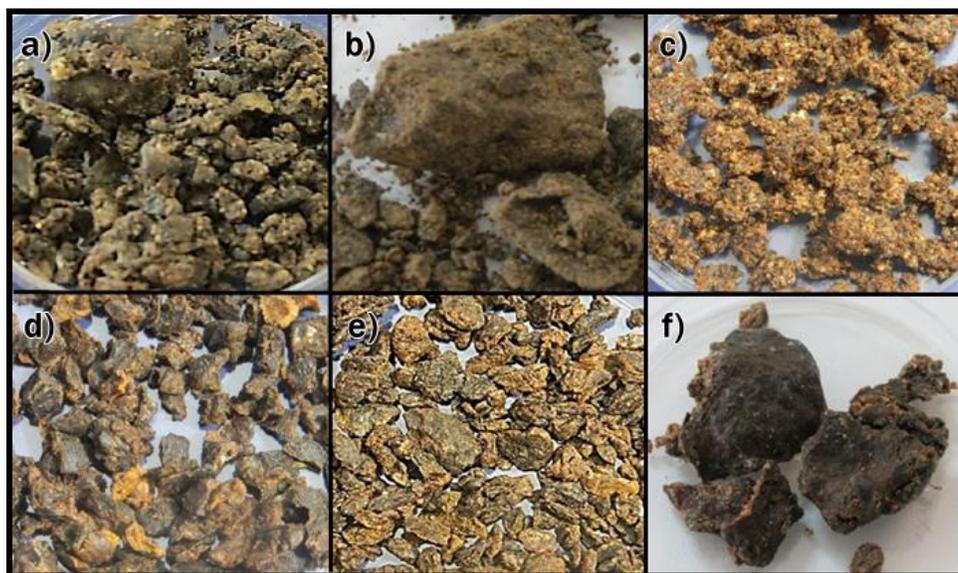


Figura 4. Tonalidades de varias muestras de propóleo en greña. a) Cuautilán Izcalli, Estado de México. b) El Oro, Estado de México. c) Villa del Carbón, Estado de México. d) Tianguismanalco, Puebla. e) San José Iturbide, Guanajuato. f) Tlalpujahua, Michoacán.

FUENTE: Rodríguez, 2015

3.2.2 Propiedades químicas

En lo referente a su composición química, aun no se logra conocer la totalidad de sus componentes. Por métodos cromatográficos se han logrado identificar más de 300 compuestos. Contiene un 50% de resinas (compuestas de flavonoides, ácidos orgánicos, ésteres y aldehídos), 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de otros compuestos orgánicos. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)

Se encuentra constituido principalmente por flavonoides, flavonoles, flavononas, flavonas y ácidos orgánicos como el ferúlico, cinámico, cafeíco y benzoico. (Rojas, 1990)

El propóleo también contiene minerales como el magnesio, calcio, yodo, potasio, sodio, cobre, zinc, hierro y manganeso, así como vitaminas B1, B2, B6, C y E. (Lotfy, 2006).

Los compuestos volátiles se encuentran en bajas concentraciones, pero su aroma y actividad biológica significativa los hacen importantes para la caracterización del propóleo. (Bankova, 2014). Además, Leonhardt *et. al.*, han demostrado que las abejas sin aguijón en Borneo usan terpenos volátiles como señales olfativas para encontrar fuentes de resina adecuadas para la elaboración del propóleo. (Leonhardt, 2010)

3.3 Metabolismo secundario de las plantas

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen con el nombre de *metabolitos secundarios*, *productos secundarios* o *productos naturales*.

Los metabolitos secundarios parecen no tener una función reconocida o directa en los procesos del metabolismo primario, como la fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Sin embargo, se ha observado que en organismos fotosintéticos, metabolitos secundarios como los carotenos desempeñan un papel vital en los centros de reacción, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía, o protegiendo el centro de reacción contra la autooxidación.

Los metabolitos secundarios difieren de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, lípidos) en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o en un grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal. (Zeiger, 2006)

Muchos metabolitos secundarios tienen importantes funciones ecológicas en las plantas:

- Protección de la ingestión de los herbívoros y de la infección por patógenos microbianos.
- Atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas, y como agentes en la competencia planta-planta.

El estudio de estos compuestos se inició por los químicos orgánicos del siglo XIX y principios del XX, quienes las llamaron *productos naturales*, debido a su importancia como drogas, venenos, saborizantes y materias industriales.

De acuerdo con los biólogos evolucionistas, las defensas vegetales deben haber surgido a través de los fenómenos de mutación hereditaria, selección natural y cambios evolutivos en las rutas metabólicas básicas.

Los metabolitos secundarios vegetales pueden dividirse en diversos grupos químicamente diferentes como los terpenos, fenoles, acetogeninas, cumarinas y compuestos que contienen nitrógeno. La Figura 5 muestra un esquema simplificado de las rutas metabólicas en la biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interconexiones con el metabolismo primario. (Zeiger, 2006)

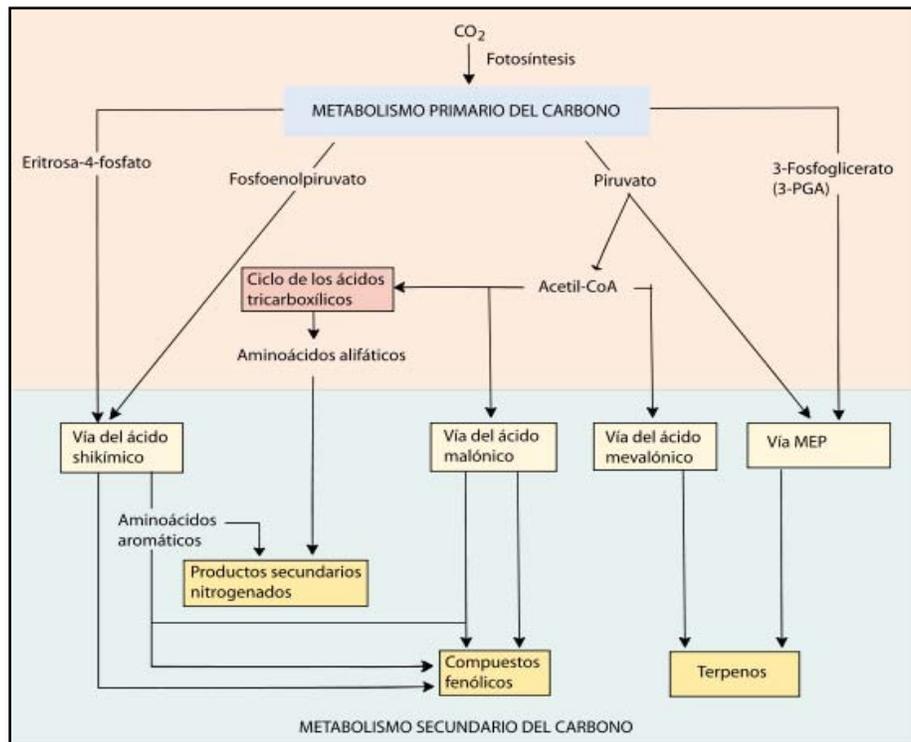


Figura 5. Rutas metabólicas de las plantas que producen tres tipos de compuestos secundarios: productos nitrogenados, compuestos fenólicos y terpenos.

FUENTE: Zeiger, 2006

El propóleo bruto o en greña proviene de una mezcla de sustancias resinosas recogidas de los vegetales, en las que se encuentran estos metabolitos secundarios, sustancias procedentes de regurgitaciones glandulares segregadas por las abejas, y de ceras y polen. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)

A continuación se describen detalladamente dos de los principales componentes del propóleo provenientes del metabolismo secundario de las plantas, los cuales le confieren mayoritariamente sus propiedades terapéuticas.

3.3.1 Fenoles

Son compuestos con un grupo –OH unido a un anillo de benceno (también llamado hidroxibenceno o ácido carbólico).

Los fenoles se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y sirven como intermediarios en la síntesis industrial de productos tan diversos como adhesivos y antisépticos.

El fenol es un desinfectante general que se encuentra en el alquitrán de hulla; el salicilato de metilo es un componente del aceite de Gaulteria; y los urusioles son los constituyentes alergénicos del roble venenoso y de la hiedra venenosa (Figura 6). (McMurry, 2012)

Nomenclatura

Los fenoles se nombran como compuestos aromáticos, utilizando el sufijo *-fenol* como el nombre principal.

Cuando tienen más de dos sustituyentes se escoge un punto de unión como carbono 1 y se numeran los sustituyentes en el anillo de tal manera que el segundo sustituyente tenga el número lo más bajo posible. Si sigue existiendo ambigüedad, se numera de tal manera que el tercero o cuarto sustituyente tenga un número lo más bajo posible hasta que se encuentre un punto de diferencia. Los sustituyentes se enlistan alfabéticamente cuando se escribe el nombre. (McMurry, 2012)

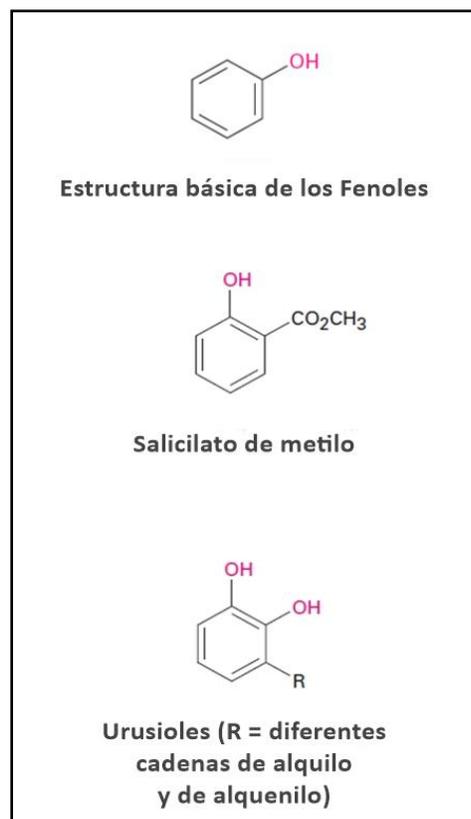


Figura 6. Estructura de algunos compuestos fenólicos.

FUENTE: McMurry, 2008

Propiedades

Los alcoholes y fenoles tienen casi la misma geometría del agua alrededor del átomo de oxígeno. El ángulo del enlace R-O-H tiene aproximadamente un valor tetraédrico y el átomo de oxígeno tiene hibridación sp^3 .

Tienen puntos de ebullición altos debido al enlace por puentes de hidrógeno. Un átomo de hidrógeno del -OH polarizado positivamente de una molécula es atraído a un par de electrones no enlazado en el átomo de oxígeno electronegativo de la otra molécula, lo que resulta en una fuerza débil que mantiene juntas a las moléculas.

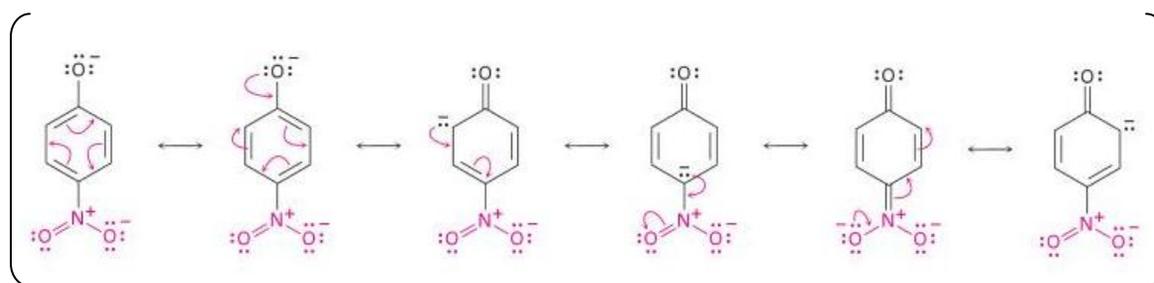
Son ácidos y bases débiles; como bases débiles, son protonados de manera reversible por ácidos fuertes para producir iones oxonio $AROH_2^+$.

Como ácidos débiles, se disocian ligeramente en disolución acuosa diluidas donando un protón al agua, lo que genera H_3O^+ y un ion fenóxido, ARO^- .

Los fenoles son mucho más ácidos que los alcoholes, debido a que el anión fenóxido está estabilizado por resonancia. La deslocalización de la carga negativa sobre las posiciones orto y para del anillo aromático resulta en la estabilidad incrementada del anión fenóxido en relación con el fenol no disociado.

Por tanto, son solubles en NaOH acuoso diluido y con frecuencia pueden separarse de una mezcla simplemente por extracción básica en disolución acuosa, seguida por la reacidificación.

Los fenoles sustituidos pueden ser más ácidos o menos ácidos que el fenol, dependiendo de si el sustituyente es atractor (o sustractor) de electrones o donador de electrones. Los fenoles con un sustituyente atractor de electrones son más ácidos debido a que estos sustituyentes deslocalizan la carga negativa; los fenoles con un sustituyente donador de electrones son menos ácidos debido a que estos sustituyentes concentran la carga negativa. Como ejemplo, un grupo nitro (atractor de electrones) en la posición orto o para incrementa la acidez del fenol.



[McMurry, 2008]

Biosíntesis de fenoles

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10 000 compuestos. Algunos son solubles sólo en disolventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glicósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles.

Las compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas, por ello, constituyen un grupo heterogéneo desde un punto de vista metabólico. Existen tres rutas básicas implicadas: la ruta del ácido shikímico, la ruta del ácido malónico y la ruta del ácido mevalónico. La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas. La vía del ácido malónico, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos, es un poco menos empleada en plantas superiores. Por ejemplo, en la biosíntesis de tetrahidrocannabinol (THC) en *Cannabis sativa*, y las antraquinonas presentes en plantas del género *Aloe*.

La ruta del ácido shikímico convierte los precursores de carbohidratos derivados de la glicólisis y de la ruta de las pentosas fosfato en aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano). Uno de los intermediarios de la ruta es el ácido shikímico, que ha dado su nombre a toda la serie de reacciones.

La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico. Esta reacción es catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), que está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos.

Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos *trans*-cinámico y *p*-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides.

Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides por contener un anillo de benceno (C6) y una cadena lateral de tres carbonos (C3). Los fenilpropanoides son unidades básicas para la formación de compuestos fenólicos más complejos. (Zeiger, 2006)

3.3.2 Flavonoides

Entre los compuestos fenólicos de las plantas también se encuentran los flavonoides. Se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas superiores, principalmente en las partes aéreas: hojas, flores y frutos. Son en su mayoría los pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y algunos frutos.

En general, los flavonoides son protectores capilares y venosos, favoreciendo la correcta síntesis de colágeno. Inhiben la agregación plaquetaria y muchos de ellos son protectores hepáticos. Algunos presentan además propiedades diuréticas, espasmolíticas, antiinflamatorias y antimicrobianas. (Martínez, 2005)

Nomenclatura

La mayoría de los flavonoides poseen nombres triviales con la terminación *-ina* u *-ol*. Estos nombres les han sido asignados por los investigadores que los han ido descubriendo uno a uno en la naturaleza.

Propiedades

Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas. (Zeiger, 2006)

Todos los flavonoides poseen las características de ser polifenólicos y solubles en agua. La extracción de los heterósidos de flavonoides se realiza con disolventes orgánicos de alta polaridad como el etanol.

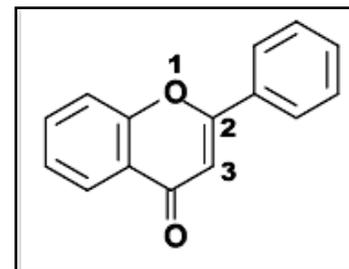


Figura 8. Esqueleto de los flavonoides. 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona).

FUENTE: Williams, 2004

Biosíntesis de flavonoides

En la ruta de la biosíntesis de flavonoides, la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de *p*-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por chalcona sintasa y da lugar a naringenina chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación de estilbenos implicados en el mecanismo de defensa de las plantas frente a patógenos. (Zeiger, 2006)

El primer flavonoide sintetizado por la vía del ácido shikímico es una chalcona, cuyo esqueleto es un anillo bencénico unido a una cadena propánica que está unida a su vez a otro anillo bencénico. En la mayoría de los flavonoides la cadena de reacciones continúa, por lo que la cadena carbonada que une los anillos aromáticos se cicla por acción de una enzima isomerasa, creando una flavonona.

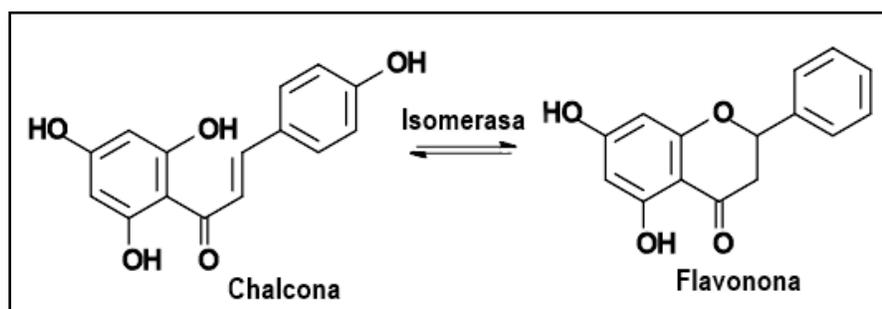


Figura 9. Flavonoide base (naringenina chalcona) y formación de flavonona.

FUENTE: Moritani, 2000

3.3.3 Propiedad antioxidante

Dentro de los procesos oxidativos de las células que dan lugar generalmente a la transferencia de electrones al O_2 para formar agua sin liberación de intermediarios, se forma inevitablemente un pequeño número de radicales oxigenados debido a pérdidas en las reacciones de transferencia de electrones.

La fuente celular más importante de radicales oxigenados es la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en donde se produce superóxido por transferencia de un electrón al O_2 . Entre los radicales de oxígeno formados en la mitocondria se encuentran el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los peroxisomas y el sistema del citocromo P450 localizado en el retículo endoplásmico también pueden producir radicales oxigenados.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son una parte vital para el proceso de cicatrización y sirven como mensajeros celulares que llevan a cabo diversos aspectos moleculares y biológicos de las células, sin embargo, las altas concentraciones de estos radicales también pueden perjudicar a la célula.

Las ERO's reaccionan con las principales macromoléculas celulares causándoles lesiones. Los fosfolípidos presentes de la membrana plasmática y de orgánulos están sujetos a peroxidación lipídica. Un ejemplo de los efectos de la peroxidación lipídica en el hombre son las manchas marrones que se observan frecuentemente en las manos de las personas ancianas.

Una consecuencia significativa de la peroxidación lipídica es un aumento de la permeabilidad de las membranas a una afluencia de calcio y otros iones con la consiguiente hinchazón de la célula. La acumulación de cantidades excesivas de calcio en las mitocondrias puede desencadenar la apoptosis. (Devlin, 2006)

La propiedad antioxidante que presenta el propóleo lo convierte en un candidato prometedor para usarse como profiláctico. El éster fenilético del ácido cafeíco (CAPE) es un componente del propóleo que ha demostrado combatir eficientemente la formación de radicales libres, así como tener propiedades antiinflamatorias en estudios crónicos y agudos en modelos de mamíferos. (Castaldo, 2002)

El CAPE es un potente inhibidor específico de la activación de moléculas que determinan la proliferación celular, interrupción del ciclo celular y apoptosis de células tumorales. (Domínguez, 2008)

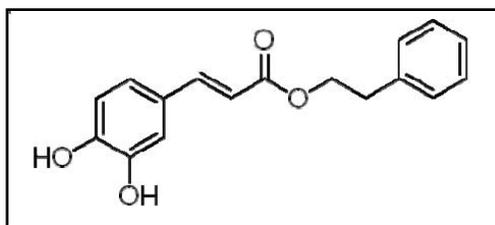


Figura 10. Estructura química del CAPE.

Fuente: Domínguez, 2008

3.4 Actividad biológica del propóleo

Sus propiedades son variables según su origen botánico y geográfico, pudiendo así mencionar propiedades antisépticas, cicatrizantes, antiinflamatorias, anestésicas, así como su actividad antiviral, bacteriostática y bactericida, antifúngica, entre otras.

Las propiedades terapéuticas del propóleo dependen de la calidad de éste, así como de las proporciones de sus constituyentes y el sinergismo entre éstos y no sólo de una sustancia en particular. (Gutiérrez, 2011)

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* ponen de manifiesto que los flavonoides que contiene el propóleo tienen acciones farmacológicas. Se han reportado efectos antioxidantes, reducción de la formación de radicales libres, inhibición de la peroxidación lipídica (liquiritigenina), efectos antimutagénicos protección vascular, anti-aterogénica, anti-anginosa, anti-tumoral, analgésica, anti-inflamatoria, antialérgica, anti-ulcerosa y hepatoprotectora (isobutrina, hispidulina, flavanolignanos, silimarina), antiespasmódicas (apigenina, quercetina, canferol), diuréticas (hesperidina), antibacterianas (quercetina, rutina, crisina), antivirales *in vitro* (rutina, dihidroquercetina, 3-hidroxi y 3-metoxiflavonas no heterosídicas), antitumorales *in vitro* (tangeretina, nobiletina), entre otras. (Bonkanka, 2006)

Además, algunos estudios recientes sugieren que las isoflavonas, compuestos fenólicos con estructura similar a los estrógenos, disminuyen los síntomas de la menopausia ya que se pueden unir al receptor estrogénico y mimetizar la acción de la hormona natural; así como disminuir el riesgo de desarrollo de osteoporosis. (Gimeno, 2004; Martínez, 2005)

De todos los productos de la colmena que han demostrado tener beneficios en la salud de los consumidores, el propóleo es tal vez el más versátil por sus usos medicinales.

En forma de ungüento o extracto alcohólico, el propóleo acelera la cicatrización de heridas y quemaduras, y hace desaparecer verrugas, sabañones, eczemas, etc. Las inhalaciones con propóleo se emplean para acabar con la rinofaringitis, bronquitis y otras afecciones de vías respiratorias. (Lotfy, 2006)

Se ha encontrado también que tiene efecto hipolipidémico e hipocolesterolémico en suero de ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol, por lo que sería ideal su consumo como suplemento alimenticio. (Albokhadaim, 2015)

Se sabe que es relativamente atóxico: dosis diarias de 1.400 mg/kg no causan ningún efecto negativo en ratones, aunque masticar grandes cantidades de propóleos en bruto puede producir náuseas y otros trastornos digestivos. (Krell, 1996)

Entre las alergias producidas por propóleo, se pueden encontrar dermatitis de contacto en personas sensibles, así como una afección muy rara, el eczema de los apicultores, que se presenta solo en 1 de cada 2000 casos. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)

3.4.1 Actividad antimicrobiana

La mayoría de los componentes aislados del propóleo son flavonoides. Los flavonoides son bien conocidos por su acción antibacterial, antifúngica y antiviral, por lo que se piensa que éstos componentes son los principales responsables de la actividad antimicrobiana del propóleo.

Los flavonoides y el ácido cinámico, desacoplan la energía de transducción en la membrana citoplasmática inhibiendo la motilidad bacteriana y haciéndola más vulnerable al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos, provoca desorganización en el citoplasma y en la pared celular causando bacteriólisis e inhibiendo síntesis proteica. (Mirzoeva. O., 1997)

Se han realizado diversas investigaciones de la actividad antibacteriana del propóleo sobre el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Bacillus cereus*. También ha mostrado inhibir

parcialmente el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* y no tener efecto sobre *Klebsiella pneumoniae* y cocos Gram negativos. (Lotfy, 2006)

Tiene efecto fungicida frente a numerosas especies como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Malassezia pachydermatis*. (Heinze, 1998)

En ratones infectados con *Paracoccidioides brasiliensis* (un hongo patógeno para el hombre endémico en América Latina), el propóleo incrementa la actividad de los macrófagos. (Lotfy, 2006)

También muestra actividad biológica significativa contra el virus de VIH, Herpes, Adenovirus y Rotavirus, y parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Trichomonas vaginalis*. (Lotfy, 2006)

Recientemente se ha comprobado el efecto antimicrobiano del propóleo sobre virus, bacterias y hongos de interés veterinario como el virus de Aujeszky, un herpes virus que afecta a muchas especies animales, y la bacteria *Pasteurella multocida*, patógeno del tracto respiratorio de cerdos y conejos. (González, 2013; Gutiérrez, 2011)

3.4.2 Otras aplicaciones

Los extractos alcohólicos y acuosos también tienen uso cosmético en la elaboración de jabones, cremas y ungüentos contra herpes y psoriasis.

En la elaboración de dentífricos, el propóleo ha demostrado ser un ingrediente seguro y efectivo reduciendo la acumulación de placa dental, comparado con pastas dentales comerciales. (Asawa, 2015)

En la industria alimenticia, se ha utilizado como aditivo antioxidante y antimicrobiano para extender la vida útil de las carnes en refrigeración. (Vargas-Sánchez, 2014)

Incluso es utilizado en la fabricación de barnices para los violines y otros instrumentos de cuerda, confiriéndoles una mejor sonoridad. (Jean-Prost & Le Conte, 2007)

4. JUSTIFICACIÓN

La producción de propóleos en México es muy limitada y no hay normativas que regulen su calidad. En abril de 2015 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el primer Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana “Propóleos. Especificaciones y Métodos de Prueba”, con la finalidad de conseguir la inserción, posicionamiento y consolidación del propóleo en el mercado.

Dentro de este marco normativo se mencionan los métodos de prueba, así como propiedades físicas, químicas y antimicrobianas que los propóleos deben presentar para considerarse de buena calidad.

Sin embargo, muchas de estas técnicas necesitan instrumental, reactivos y capacitación específica para realizarse, además de ser costosas y no estar al alcance de pequeños y medianos productores.

Es por ello que se detectó la necesidad de diseñar un conjunto de determinaciones químicas en propóleos, mediante metodologías tan sencillas que se puedan llevar a cabo como pruebas de campo, y que puedan ser adquiridas a un precio razonable para cualquier estrato de productores apícolas.

El objetivo del desarrollo de esta prueba de campo para la determinación de fenoles, flavonoides e índice de oxidación, se encuentra orientado a apoyar el cumplimiento de la normatividad que próximamente entrará en vigor, de modo que la realización de estas determinaciones químicas se puedan incluir dentro de la rutina de producción como un parámetro de evaluación de la calidad de las cosechas de propóleo.

Por ser un producto que da alternativas económicas al apicultor, mediante la capacitación en métodos de control de calidad de propóleos, se puede fomentar el uso de la ciencia y la tecnología para obtener propóleo de mejor calidad en el mediano plazo para cubrir la demanda nacional e incursionar en largo plazo en mercados internacionales.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una prueba de campo para la determinación de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en propóleos mexicanos a través de reacciones coloridas de fácil interpretación, para que lo utilicen los apicultores como prueba de rutina y como un parámetro de calidad de su producto.

Objetivos particulares

1. Recolectar muestras de propóleo de apiarios ubicados en el Estado de México, procesarlas y obtener la tintura y el extracto etanólico de cada una de ellas.
2. Determinar de forma cualitativa la presencia de fenoles y flavonoides en el propóleo en greña, tinturas y extractos etanólicos a través de una prueba donde se lleve a cabo la formación de un complejo colorido.
3. Evaluar el potencial antioxidante del propóleo en greña, tinturas y extractos etanólicos de forma cualitativa con base en su mecanismo de reacción frente al permanganato de potasio.
4. Determinar de forma cuantitativa el contenido de fenoles y flavonoides en las tinturas y extractos etanólicos de propóleo mediante pruebas colorimétricas con el reactivo de Folin-Ciocalteu y Tricloruro de aluminio.
5. Relacionar la concentración de fenoles y flavonoides con la actividad antimicrobiana del propóleo frente a bacterias y hongos, empleando la prueba cualitativa de difusión en placa.
6. Elaborar una escala de colores para determinar de manera semicuantitativa el contenido de flavonoides y fenoles totales en las muestras de propóleo.
7. Elaborar una escala para evaluar el índice de oxidación en las muestras de propóleo.
8. Diseñar un kit para prueba de campo que incluya el inserto correspondiente, las escalas de colores y su interpretación, así como los reactivos y materiales necesarios para las determinaciones.

6. HIPÓTESIS

Si se desarrolla una metodología rápida y sencilla para la detección de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en propóleo en greña, tintura y extractos etanólicos, a través de una escala de colores, se podrá utilizar de manera confiable por la comunidad de apicultores como prueba de campo para evaluar el contenido de estos compuestos en sus propóleos, lo que les ayudará a conocer la calidad de su producto y cotizarlo a un mejor precio en el mercado.

7. METODOLOGÍA

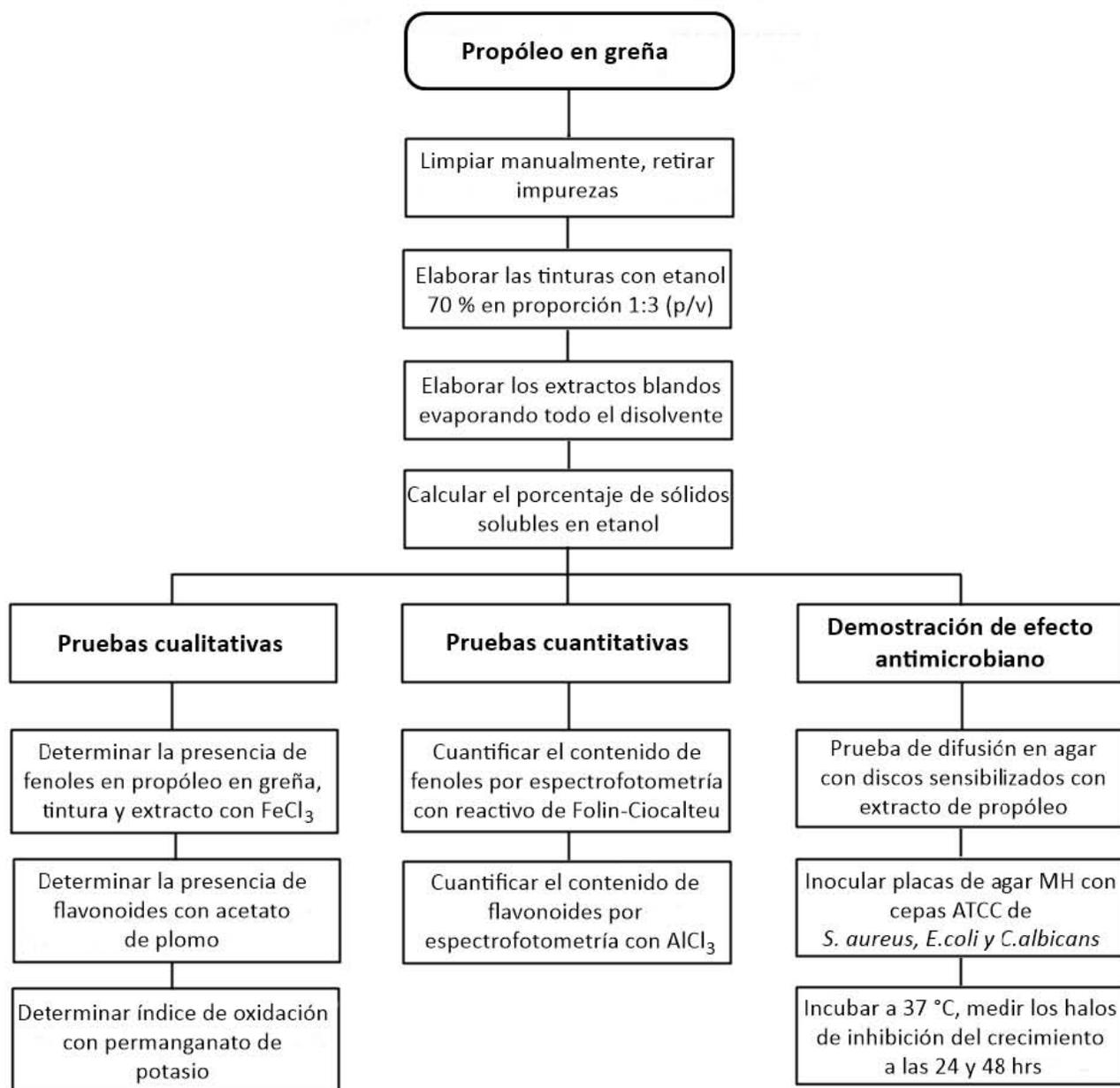


Figura 11. Diseño experimental para la determinación de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en propóleos.

7.1 Preparación de muestras

Se emplearon cuatro muestras de propóleo en greña provenientes de apiarios ubicados en diferentes regiones del Estado de México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (2015), Lago de Guadalupe (2015), El Oro (2013) y Villa del Carbón (2013).

Cada uno se limpió manualmente, retirando impurezas y ceras propias de la colmena, y se conservaron en congelación y protegidos de la luz para evitar su descomposición hasta su utilización.

7.2 Elaboración de tinturas y extracto blando de propóleo

Para la elaboración de las tinturas, el propóleo se trituró hasta formar un polvo fino y se realizó una extracción con etanol 70% en una proporción 1:3, pesando 3 gramos de propóleo y disolviéndolos en 9 mL de etanol 70%. La mezcla se dejó en refrigeración durante 7 días, homogenizando periódicamente, y una vez transcurrido el tiempo se filtró por gravedad con papel Whatman. Al producto obtenido (fracción soluble) se le denominó tintura de propóleo.

Una parte de la tintura se concentró utilizando un rotovapor (Modelo Büchi R-205 B-490) bajo las siguientes condiciones: 85 revoluciones de rotación, temperatura de vapor de 27 °C y temperatura de baño de 55 °C. Se dejó por un período de 5 a 7 días a sequedad utilizando una bomba de vacío (Gutiérrez, 2011).

El porcentaje de sólidos solubles en etanol de los extractos se determinó por diferencia de peso con relación al peso inicial del propóleo. Para ello se tomó 1 mL de tintura de propóleo y se colocó en un vaso de precipitados de 10 mL pesado previamente. Se dejó evaporar la totalidad del disolvente y se pesó el vaso con los sólidos restantes. El cálculo del rendimiento de cada propóleo estudiados, se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra (g)}} \right) \times 100 = \text{Porcentaje de Sólidos Solubles en Etanol}$$

Este procedimiento se realizó por triplicado y se obtuvo el promedio de las tres mediciones.

Adicionalmente se prepararon soluciones estándar de cada muestra de propóleo a una concentración de 0.05 mg/mL para emplearse en las determinaciones cuantitativas. Para ello se preparó una disolución estándar a partir de tintura de propóleo. Se tomó como

referencia el peso y el volumen inicial con el que se elaboró la tintura (3 g de propóleo en greña en 9 mL de etanol, es decir 0.33 g/mL), y se realizó el cálculo para medir el volumen de tintura que se requiere tomar para preparar 20 mL de la disolución estándar de la siguiente manera:

$$\text{Volumen de tintura (mL)} = \frac{\left(\frac{0.05 \text{ mg}}{\text{mL}}\right) (20 \text{ mL})}{330 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}$$

$$\text{Volumen de tintura} = 0.003 \text{ mL} = 3 \mu\text{L}$$

Tal como se hizo con las muestras de propóleo, las tinturas, extractos y soluciones estándar preparadas también se mantuvieron en congelación y protegidas de la luz durante la realización del proyecto.

7.3 Pruebas cualitativas

Se realizaron tres pruebas cualitativas para determinar la presencia de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en los cuatro propóleos utilizando las muestras de propóleo en greña, tintura y extracto etanólico.

7.3.1 Fenoles

Para propóleo en greña y extracto etanólico, se tomó una pequeña muestra de propóleo (aproximadamente del tamaño de una lenteja) y se colocó en un tubo con 1 mL de etanol 70%. Se agregó 1 gota de cloruro férrico al 1% (FeCl_3) y se observó el desarrollo de color, que dependiendo del compuesto puede ser azul, violeta, púrpura, verde, o rojo-marrón.

Se realizó la misma prueba con la tintura de propóleo, agregando 1 gota de tintura a 1 mL de agua destilada y posteriormente se adicionó 1 gota de cloruro férrico al 1% (FeCl_3).

7.3.2 Flavonoides

Este análisis químico fue realizado usando la metodología propuesta por la Norma Ramal Cubana Apicultura NRAG 1129.1994, basado en la formación de compuestos coloreados por la reacción de los flavonoides con acetato de plomo, que deben colorearse rápidamente de un color anaranjado-amarillento. (Rodríguez, 2015)

Para propóleo en greña y extracto etanólico, se tomó una pequeña muestra (aproximadamente del tamaño de una lenteja) y se colocó en un tubo con 1 mL de etanol 70%. Se agitó para disolver lo más posible y posteriormente se agregó una gota de acetato de plomo $[Pb(C_2H_3O_2)_2]$ al 10%.

Se realizó la misma prueba con la tintura de propóleo, agregando 1 gota de tintura a 1 mL de agua destilada. Se agitó para incorporarse y se agregó una gota de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ al 10%.

7.3.3 Índice de oxidación

Para propóleo en greña y extracto etanólico, se tomó una pequeña muestra (aproximadamente del tamaño de una lenteja) y se colocó en un tubo con 1 mL de etanol 70%. Se agregó 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 20%, se agitó y se dejó reposar durante 1 minuto. Se agregó 1 gota de permanganato de potasio ($KMnO_4$) a una concentración de 0.1 N y se cuantificó el tiempo que tardó en realizarse la decoloración total de la disolución.

Por separado, se colocaron 2 gotas de tintura de propóleo en un tubo con 1 mL de agua destilada y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, midiendo el tiempo que tardó en realizarse la decoloración total de la disolución a partir del momento en que cae la gota de $KMnO_4$ al tubo.

7.4 Pruebas cuantitativas

Se construyó una curva de barrido de fenoles y flavonoides utilizando una disolución estándar de ácido gálico y quercetina respectivamente. La longitud de onda óptima para las lecturas de absorbancia se realizó de acuerdo a lo indicado en el Anexo 3.

La relación entre las concentraciones y las absorbancias de las soluciones estándar permitió determinar el contenido de fenoles y flavonoides en las muestras preparadas a una concentración de 0.05 mg/mL, utilizando la ecuación de regresión correspondiente a cada prueba, como se muestra en el Anexo 4.

8.4.1 Fenoles

Se preparó una curva de calibración a partir de una disolución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, haciendo diluciones dobles con agua destilada hasta llegar a una concentración de 0.00625 mg/mL, de acuerdo al procedimiento indicado en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.

	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6
Estándar ácido gálico (μL)	31.5	62.5	125	250	500	1000
Agua destilada (μL)	968.5	937.5	875	750	500	--
Concentración(mg /mL)	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
Dilución	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2	--

Al tener los sistemas anteriores preparados se procedió de la siguiente manera:

1. Se tomó 1 mL y se transfirió a un tubo de ensaye con 6 mL de agua destilada.
2. Se adicionaron 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar 5 minutos. Se observará un cambio de color a verde.
3. Se adicionaron 1.5 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) de concentración 200 mg/mL y 2 mL más de agua destilada hasta un volumen de 10 mL. Se observará un cambio de color a azul.
4. Se dejó reposar 2 horas a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la reacción y se determinó la absorbancia a 760 nm.

Se realizó la prueba por triplicado y consideró el promedio de las tres mediciones. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico o en porcentaje. Con estos datos se construyó la curva de calibración para fenoles.

Para realizar la determinación en las muestras, se tomó al inicio 1 mL de la tintura o extracto etanólico de propóleo de concentración 0.05 mg/mL para determinar el porcentaje de fenoles en cada una de ellas, y se siguió el mismo procedimiento a partir del punto 2.

7.4.2 Flavonoides

Se preparó una curva de calibración a partir de una disolución estándar de Quercetina de 1 mg/mL. Las concentraciones seriadas se prepararon como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales.

Concentración (ppm)	Stock de Quercetina (µL)	MeOH (µL)
1	3	2997
2	6	2994
3	9	2991
4	12	2988
5	15	2985
6	18	2982
7	21	2979
8	24	2976
9	27	2973
10	30	2970
20	60	2940
30	90	2910
40	120	2880
50	150	2850
60	180	2820
70	210	2790
80	240	2760
90	270	2730

Una vez preparados los sistemas se procedió de la siguiente manera:

1. Se adicionó a cada tubo 3 mL de AlCl_3 al 2%.
2. Se dejó reposar 10 minutos para que se llevara a cabo la reacción y se determinó su absorbancia a 415 nm.

Se realizó la prueba por triplicado para cada muestra y se consideró el promedio de las tres mediciones. El contenido total de flavonoides se expresa como mg de equivalentes de quercetina por gramo de EPP o en porcentaje.

Para realizar la determinación en las muestras, se siguió el mismo procedimiento tomando 3 mL de la tintura o extracto etanólico de propóleo de concentración 0.05 mg/mL para determinar el porcentaje de flavonoides en cada una de ellas.

7.5 Demostración del efecto antimicrobiano

Para la demostración de la relación entre la concentración de fenoles y flavonoides con el efecto antimicrobiano del propóleo, se realizó una prueba cualitativa de inhibición del crecimiento mediante el método de difusión en placa.

Los microorganismos utilizados fueron las cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229) y *Candida albicans* (ATCC 14053).

Dado que las cepas se mantienen en congelación, antes de realizar las pruebas de sensibilidad conviene hacer por lo menos dos pases en un medio de cultivo no selectivo y sin antibióticos. Se utilizó agar BHI para el crecimiento de las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, y agar SDA para *C. albicans*. Transcurridas las primeras 24 horas de crecimiento, se corrieron pruebas bioquímicas de identificación para las tres cepas.

7.5.1 Método de difusión en placa

Preparación de las diluciones de propóleo

Se pesaron 160 mg de EPP y se agregaron 10 mL de etanol al 70%. Se realizaron diluciones dobles tomando 5 mL de la disolución anterior y agregando 5 mL más de etanol, hasta haber alcanzado una concentración de 2 mg/mL.

Preparación de los discos

Se emplearon discos estériles de papel Whatman No. 5, de 5 mm de diámetro. Se impregnaron con 10 µL de extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones (16, 8, 4 y 2 mg/mL) y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó tomando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento, que se resuspendieron en un tubo de solución salina estéril (NaCl 0.85%). Se agitaron bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda 530 nm), se ajustó a una densidad óptica 0.5 McFarland. Esta disolución tiene una concentración aproximada de $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL.

Inoculación de las placas

Se sumergió un hisopo estéril de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland. Se retiró el exceso de líquido rozando el hisopo con las paredes del tubo y se sembró la placa uniformemente (técnica masiva). Se dejó secar de 3 a 5 minutos dejando la placa entreabierta y finalmente se aplicaron 4 discos por caja a una distancia de 2 cm entre sí.

Controles

Se utilizaron multidiscos combinados (para bacterias Gram positivas y Gram negativas) de la marca BIORAD® como control positivo de la inhibición del crecimiento para las cepas *S. aureus* y *E. coli*. Para la cepa de *C. albicans* se utilizaron discos de Clotrimazol, Miconazol y Variconazol.

Como control negativo, se sembraron masivamente los 3 diferentes microorganismos y se colocó en el centro de la caja un disco impregnado de etanol al 70%.

Lectura

Se dejaron incubar las cajas durante **24 horas**, se observó y midió el diámetro del halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento. En caso de que no haya suficiente crecimiento a las 24 horas, se puede realizar una segunda lectura a las **48 horas**. La presencia de micro colonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo debe ser ignorada.

8. RESULTADOS

A continuación se muestra la apariencia de las cuatro muestras de propóleo en greña provenientes del Estado de México utilizadas, así como las tonalidades de las tinturas y extractos obtenidos.

Propóleo	Greña	Tintura	Extracto
FESC			
LAGO DE GUADALUPE			
EL ORO			
VILLA DEL CARBÓN			

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

Las fechas de recolección y los resultados de la determinación del rendimiento de cada muestra de tintura de propóleo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Rendimiento o Porcentaje de sólidos solubles en etanol de las tinturas de propóleo.

Propóleo	Fecha de recolección	Rendimiento (%)
FESC	Marzo 2015	13.12 %
Lago de Guadalupe	Mayo 2015	22.27 %
El Oro	Septiembre 2013	8.01 %
Villa del Carbón	Septiembre 2013	4.98 %

8.1 Detección de fenoles

Para demostrar la presencia de fenoles se adicionó una gota de una disolución de cloruro férrico a las muestras. Se observó desarrollo de color, que dependiendo de la composición química puede ser azul, violeta, púrpura, verde, o rojo-marrón.

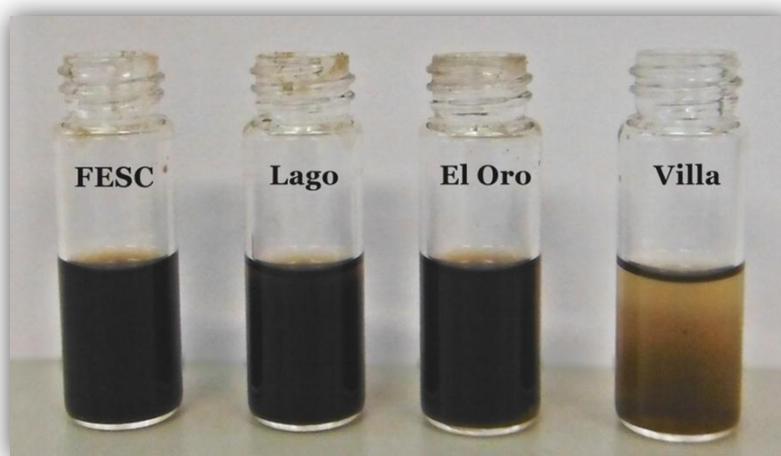


Figura 12. Prueba cualitativa de presencia de fenoles en propóleo en greña. Se observan tonalidades de marrón a negro.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

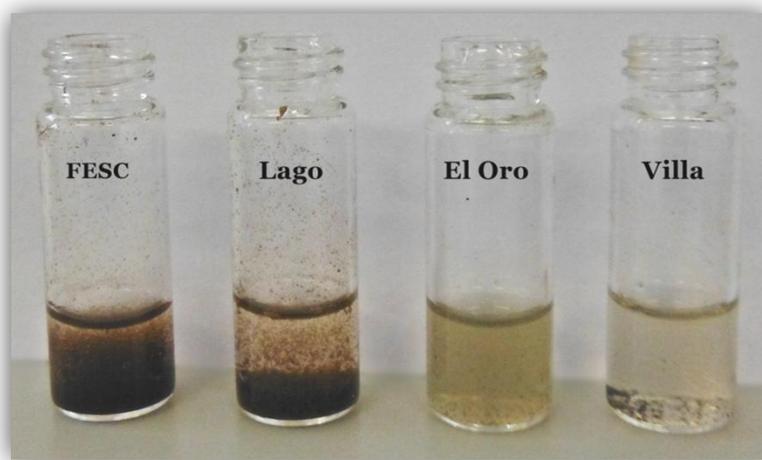


Figura 13. Prueba cualitativa de presencia de fenoles en tintura de propóleo. Se observan tonalidades marrón claro y formación de precipitados coloridos como consecuencia de la insolubilidad de algunos componentes en agua.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016



Figura 14. Prueba cualitativa de presencia de fenoles en extracto blando de propóleo. Se observan tonalidades de marrón a negro.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

8.2 Detección de flavonoides

Las muestras de propóleo al contacto con acetato de plomo forman un precipitado amarillo con diferentes intensidades de color de acuerdo a la cantidad de flavonoides que contienen. Se utilizó este método para determinar la presencia de flavonoides en propóleo en greña, tintura y extracto etanólico, observándose los siguientes resultados.

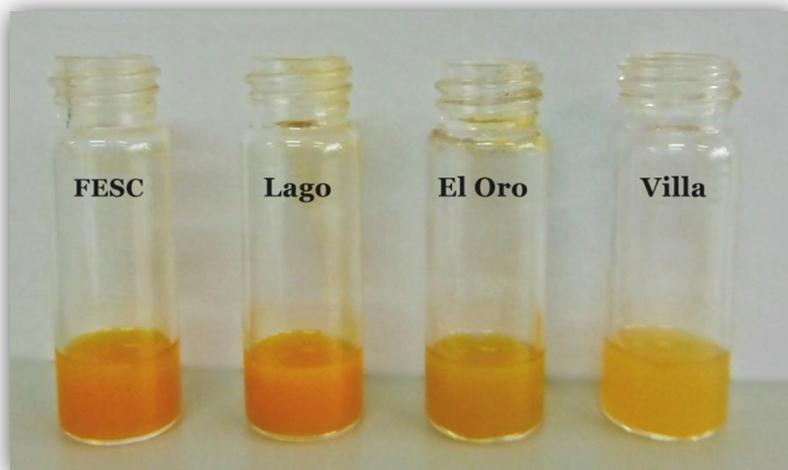


Figura 15. Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en propóleo en greña. Se observan tonalidades amarillas a naranjas.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

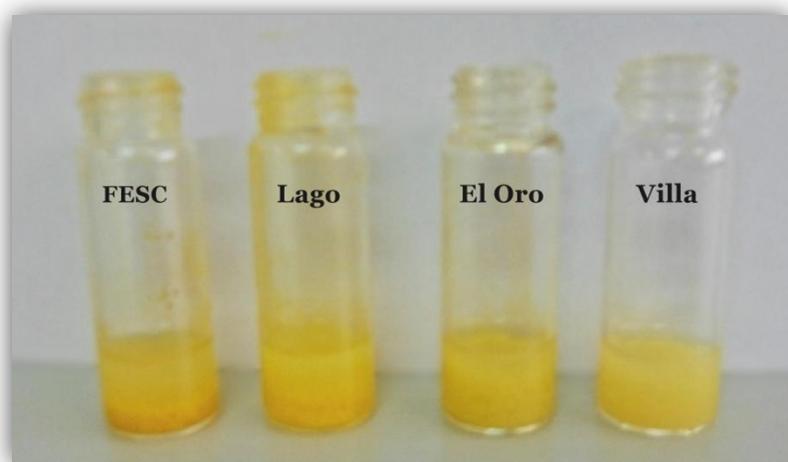


Figura 16. Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en tintura de propóleo. Se observan tonalidades amarillas y presencia de precipitados de color naranja en las muestras de FESC y Lago de Guadalupe.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

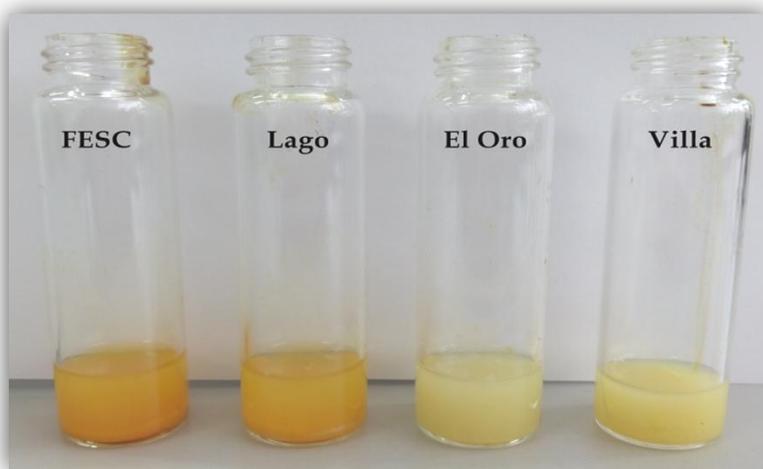


Figura 17. Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en extracto blando de propóleo. Se observan tonalidades amarilla, de color más intenso en las muestras de FESC y Lago de Guadalupe.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

8.3 Determinación del índice de oxidación

La determinación del índice de oxidación se realizó tanto en propóleo en greña, tintura y extracto etanólico. Se tomó como lectura el tiempo en que tardó en decolorarse por completo la muestra en agitación constante.

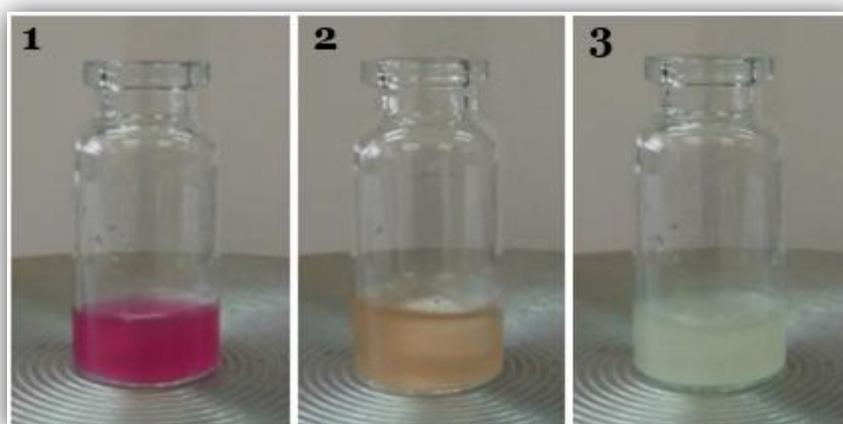


Figura 18. Prueba de determinación de índice de oxidación. 1) Color de las muestras al agregar permanganato de potasio. 2) Decoloración parcial. 3) Decoloración total, momento en que se realiza la lectura.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

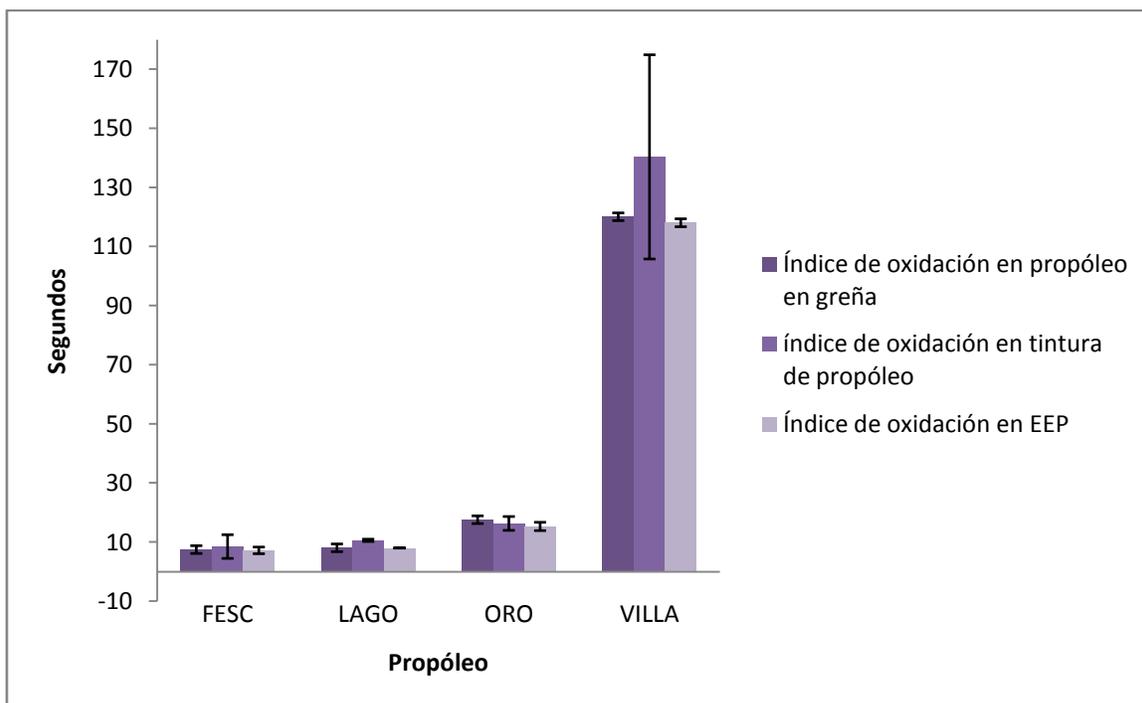
Cabe mencionar que se trata de un método visual, por lo que los resultados pueden variar de persona a persona. Los propóleos con menor tiempo de decoloración total de la muestra, presentan mejor propiedad antioxidante. Para dicha prueba se obtuvieron los siguientes resultados en segundos.

Tabla 4. Resultados de la determinación del Índice de oxidación.

Propóleo	Tiempo decoloración propóleo en greña (segundos)	Tiempo decoloración tintura (segundos)	Tiempo decoloración EEP (segundos)
FESC	7.50 ± 2.89	8.51 ± 4.01	7.22 ± 1.13
Lago de Guadalupe	8.09 ± 1.27	10.62 ± 0.39	8.02 ± 0.03
El Oro	17.60 ± 0.98	16.34 ± 2.34	15.32 ± 1.41
Villa del Carbón	120.10 ± 0.09	140.35 ± 34.54	118.06 ± 0.34

Los valores representan la media de tres repeticiones ± Desviación estándar.

Gráfica 1. Resultados de la determinación del índice de oxidación en propóleo.



8.4 Pruebas cuantitativas: fenoles y flavonoides.

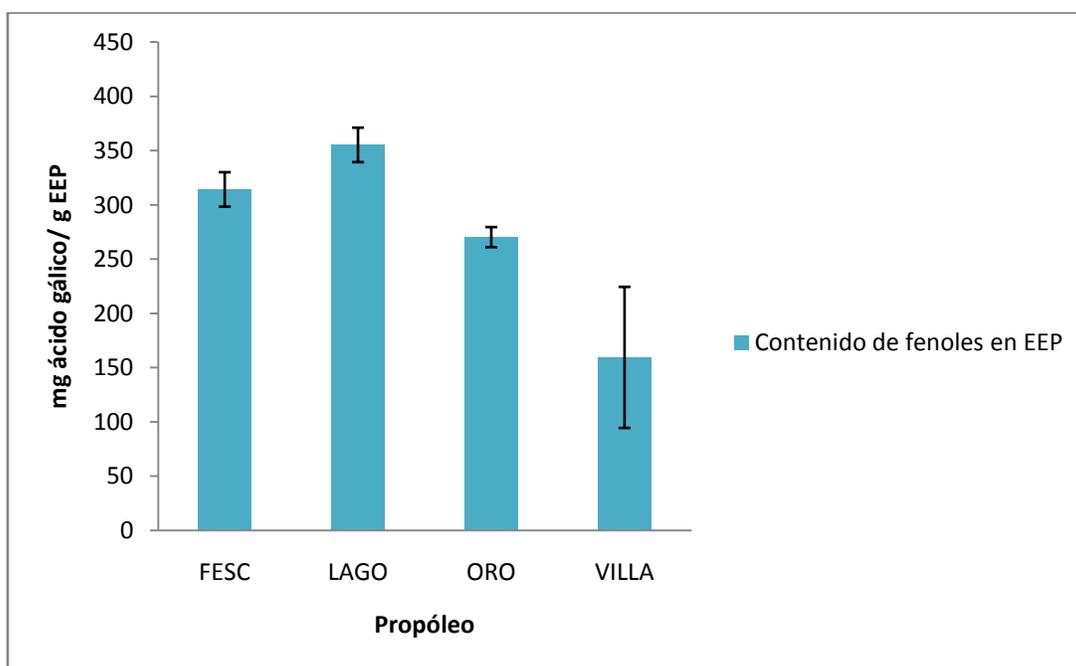
El contenido total de fenoles para los extractos etanólicos de los cuatro propóleos estudiados se determinó por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y se expresa como miligramos de ácido gálico por gramo de extracto seco.

Tabla 5. Resultados de la determinación cuantitativa de fenoles en extracto etanólico.

Propóleo	Contenido de fenoles en extracto etanólico (mg ácido gálico/ g EEP)
FESC	314.12 ± 15.90
Lago de Guadalupe	355.19 ± 15.91
El Oro	270.22 ± 9.26
Villa del Carbón	159.40 ± 65.01

Los valores representan la media de tres repeticiones ± Desviación estándar.

Gráfica 2. Resultados de la determinación cuantitativa de fenoles en extracto etanólico.



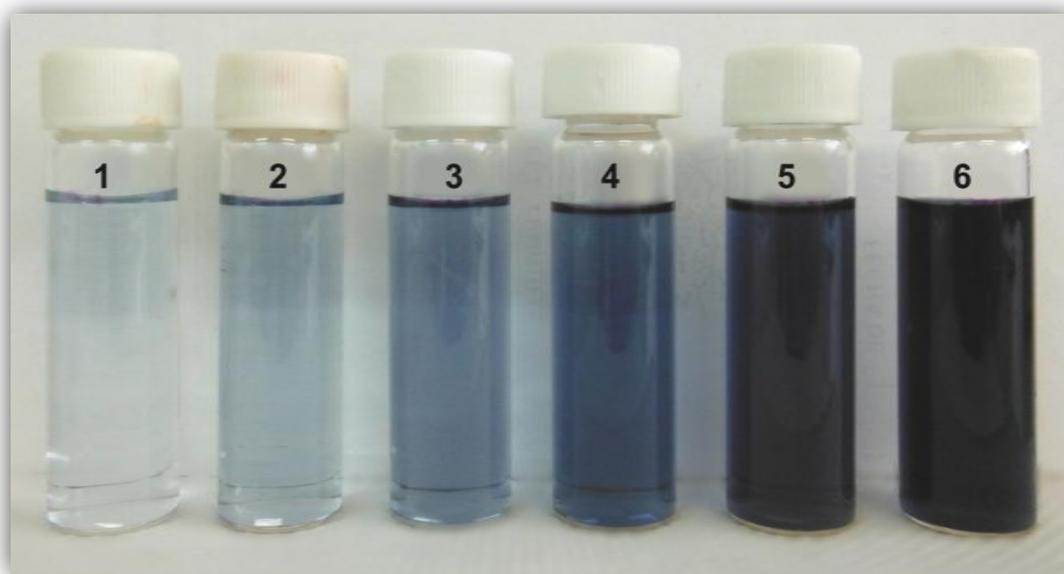


Figura 19. Tonalidades de las soluciones de la curva de calibración para fenoles preparadas a partir del estándar de ácido gálico. Las concentraciones corresponden a las establecidas en la Tabla 2, y van desde 0.00625 mg/mL (izquierda) hasta 0.2 mg/mL (derecha).

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

El contenido de flavonoides se determinó también por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 415 nm, expresándose como μg de quercetina por gramo de extracto seco, o bien, en ppm. Los resultados son los siguientes.

Tabla 6. Resultados de la determinación cuantitativa de flavonoides en extracto etanólico.

Propóleo	Contenido de flavonoides en extracto etanólico (μg quercetina /g EEP)
FESC	8.89 ± 0.90
Lago de Guadalupe	11.56 ± 0.97
El Oro	7.71 ± 1.06
Villa del Carbón	3.77 ± 1.16

Los valores representan la media de tres repeticiones \pm Desviación estándar.

Gráfica 3. Resultados de la determinación cuantitativa de flavonoides en extracto etanólico.

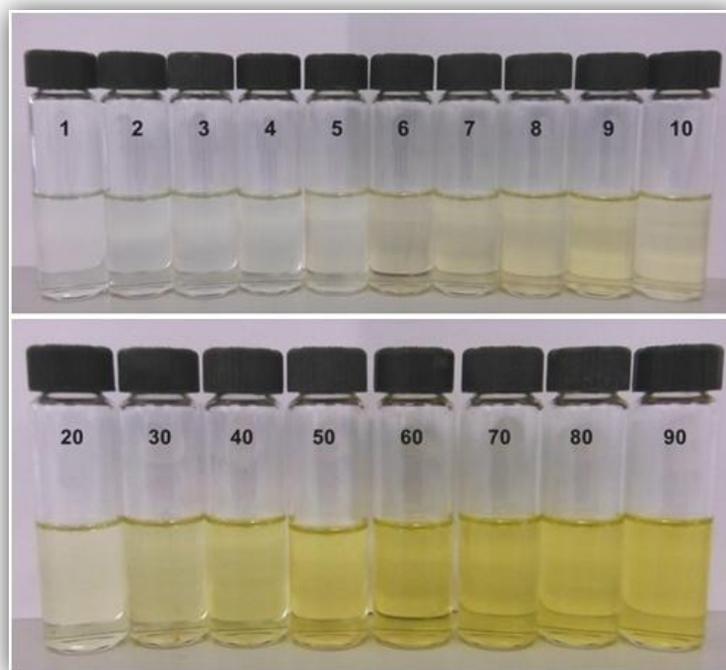
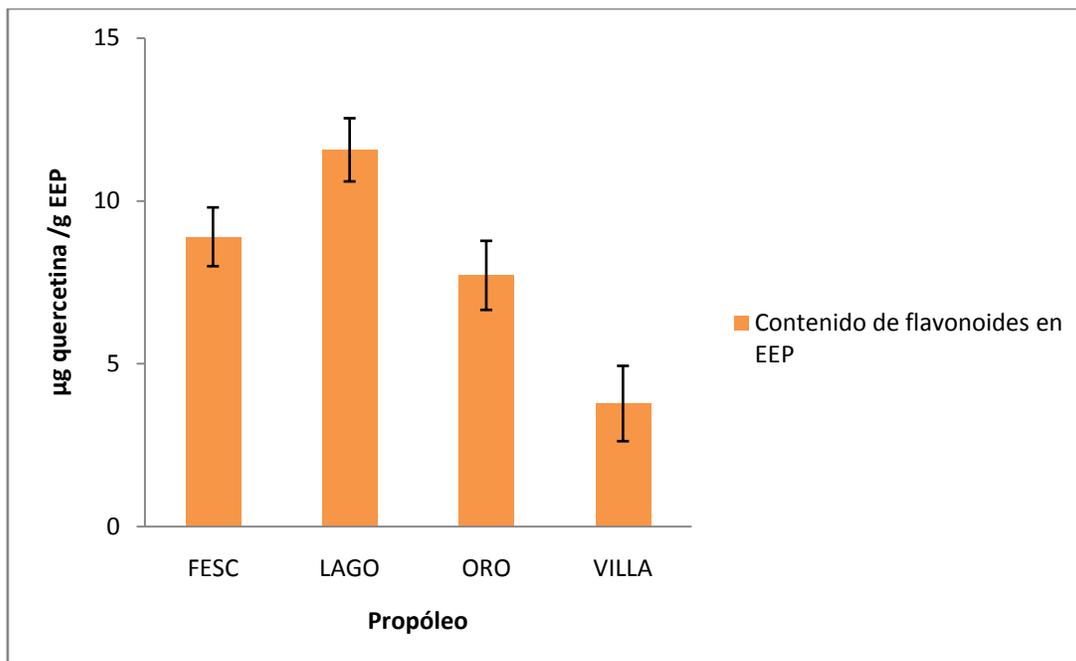


Figura 20. Tonalidades de las soluciones de la curva de calibración para flavonoides preparadas a partir del estándar de quercetina. Las concentraciones van desde 1 hasta 90 ppm.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

8.5 Elaboración de escala de colores.

Del conjunto de determinaciones cualitativas y cuantitativas se seleccionaron aquellas cuya metodología fuera más sencilla de reproducir, y en las cuales el color del producto final de la reacción fuera fácilmente reconocible.

Se propusieron dos escalas de colores con las tonalidades correspondientes a las obtenidas en las determinaciones de fenoles y flavonoides respectivamente. Se organizaron en tres intervalos (bajo, medio y alto) que representaran la concentración del producto final de la reacción. De esta manera, se podrá comparar el color obtenido al realizar la prueba de campo con la escala colorimétrica para dar un resultado aproximado del contenido de fenoles o flavonoides en propóleo.

Fenoles

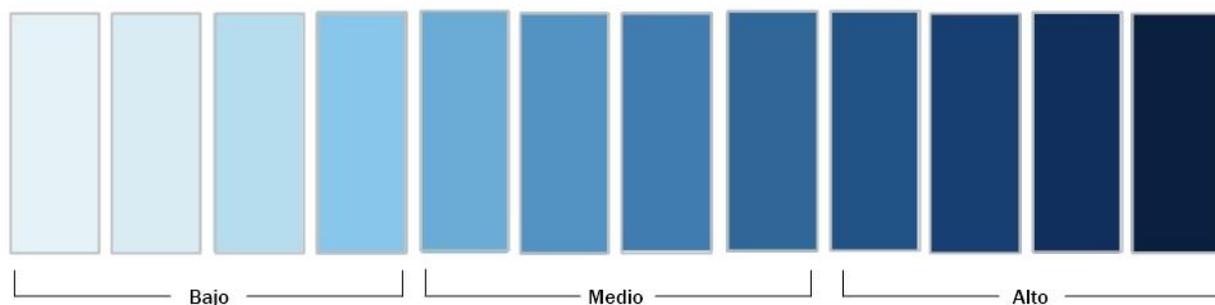


Figura 21. Escala de colores para la determinación cualitativa del contenido de fenoles en propóleo.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

Flavonoides

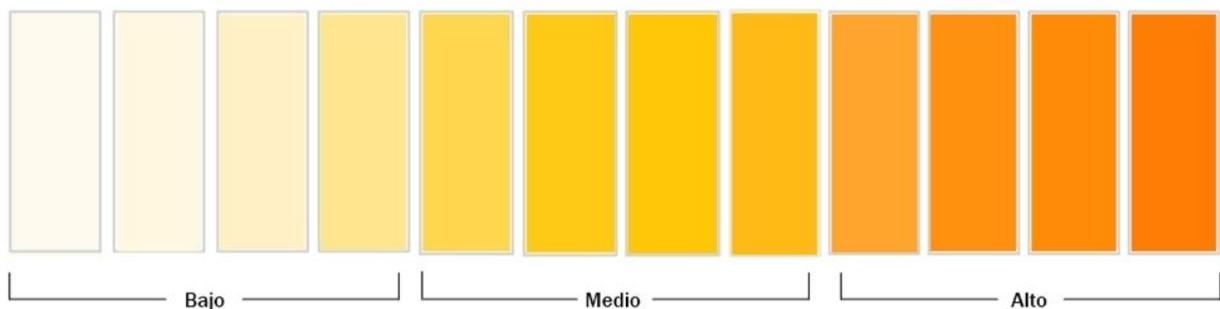


Figura 22. Escala de colores para la determinación cualitativa del contenido de flavonoides en propóleo.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

Índice de oxidación

Para la determinación de índice de oxidación sólo se utilizaron tres colores para indicar la coloración inicial al agregar permanganato de potasio a la muestra, la decoloración parcial y la decoloración total (final de la reacción), como se muestra a continuación.

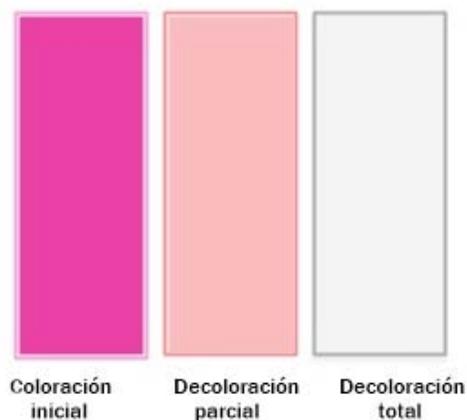


Figura 23. Escala de colores para la determinación cualitativa del índice de oxidación en propóleo.

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

Se propusieron los siguientes intervalos de tiempo para asignar un calificativo al índice de oxidación de las muestras.

Tabla 7. Intervalos de tiempo para determinar la calidad del índice de oxidación en propóleo.

Tiempo	Resultado
De 0 a 30 segundos	Alto
De 31 a 90 segundos	Medio
Más de 90 segundos	Bajo

Utilizando como referencia las escalas de colores, se determinó la calidad de cada una de las muestras de propóleo de la siguiente manera.

Tabla 8. Resultados de la determinación cualitativa de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en propóleo utilizando como referencia las escalas de colores correspondientes.

Propóleo	Contenido de fenoles	Contenido de flavonoides	Índice de oxidación
FESC	Alto	Alto	Alto
Lago de Guadalupe	Alto	Alto	Alto
El Oro	Medio	Medio	Alto
Villa del Carbón	Bajo	Bajo	Bajo

8.6 Demostración de efecto antimicrobiano

Existe una gran variación en la actividad biológica de las diferentes muestras de propóleo. Para la cepa *S.aureus*, los EEP con la mejor inhibición de crecimiento fueron FESC y Lago de Guadalupe, El Oro arrojó resultados intermedios, mientras que Villa del Carbón no presentó efecto inhibitorio.

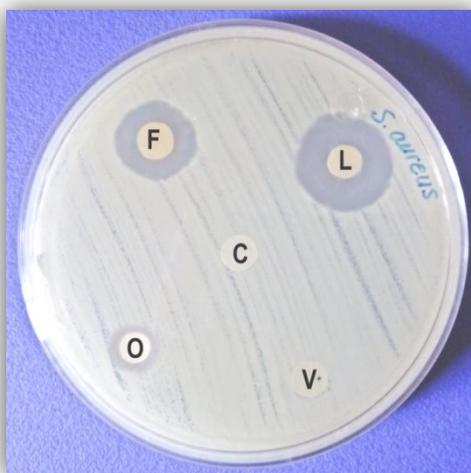


Figura 24. Efecto inhibitorio de los EEP sobre *S. aureus* a una concentración de 4 mg/mL. (F= FESC, L=Lago de Guadalupe, O= El Oro, V= Villa del Carbón, C= control negativo con etanol).

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

Para las cepas *E. coli* y *C. albicans*, ninguno de los propóleos mostró inhibición a las concentraciones empleadas. Los resultados se resumen en la Tabla 9.



Figura 25. Prueba de difusión en agar para *C. albicans* a una concentración de 4 mg/mL. (F= FESC, L=Lago de Guadalupe, O= El Oro, V= Villa del Carbón, C= control negativo con etanol).

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

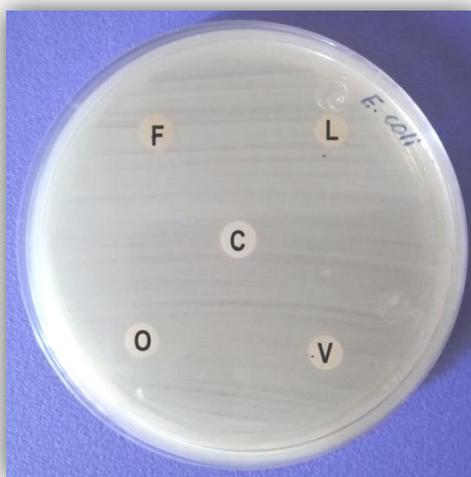


Figura 26. Prueba de difusión en agar para *E. coli* a una concentración de 4 mg/mL. (F= FESC, L=Lago de Guadalupe, O= El Oro, V= Villa del Carbón, C= control negativo con etanol).

Foto: Sofía G. Vilchis Fonseca, 2016

Tabla 9. Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento para las cepas *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* por el método de difusión en agar.

		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
FESC	2 mg/mL	R	R	R
	4 mg/mL	S	R	R
	8 mg/mL	S	R	R
	16 mg/mL	S	R	R
Lago de Guadalupe	2 mg/mL	R	R	R
	4 mg/mL	S	R	R
	8 mg/mL	S	R	R
	16 mg/mL	S	R	R
El Oro	2 mg/mL	R	R	R
	4 mg/mL	I	R	R
	8 mg/mL	I	R	R
	16 mg/mL	S	R	R
Villa del Carbón	2 mg/mL	R	R	R
	4 mg/mL	R	R	R
	8 mg/mL	R	R	R
	16 mg/mL	R	R	R

(R= Resistente, S = Sensible, I = Intermedio)

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propóleo es un producto natural ampliamente utilizado por sus propiedades biológicas, que dada la demanda que ha adquirido en los últimos años, requiere del establecimiento de parámetros de control de calidad para posicionarse como un producto seguro y eficiente en el mercado nacional e internacional.

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una prueba de campo de determinaciones químicas en propóleos mexicanos a través de pruebas coloridas de fácil interpretación, que puedan utilizar los apicultores mexicanos como una prueba de rutina para verificar la calidad de su producto.

Para ello se analizaron cuatro muestras diferentes provenientes del Estado de México, identificadas por su lugar de origen como FESC (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli), Lago de Guadalupe (Cuautitlán Izcalli), El Oro y Villa del Carbón.

El propóleo se procesó para obtener sus respectivas tinturas y extractos etanólicos, encontrándose que las muestras con el mayor **rendimiento**, es decir, con mayor porcentaje de sólidos solubles en etanol, fueron **Lago de Guadalupe** (22.27%) y **FESC** (13.12%).

Dentro de la gran cantidad de componentes que presenta el propóleo, se ha identificado por métodos cromatográficos que la mayor proporción la ocupan los fenoles y flavonoides, por lo que se propuso que la concentración de estos dos grupos de compuestos sería un parámetro conveniente a analizar para determinar la calidad de las cosechas de propóleo.

Se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar la concentración de fenoles y flavonoides en las muestras, con la finalidad de elegir la metodología más sencilla de replicarse e interpretarse en una prueba de campo. Cada prueba fue realizada con propóleo en greña, tintura y extracto etanólico, suponiendo diferentes puntos de control en la elaboración de productos a base de propóleo.

Para revelar la presencia de **fenoles** se utilizó una disolución de **cloruro férrico**. Los fenoles dan diferentes coloraciones debido a la formación de ciertos complejos de coordinación con el hierro.

Existen otros compuestos que también dan coloración con este reactivo como los ácidos hidroxámicos y los enoles. Ocasionalmente el color dado por un fenol con el cloruro férrico puede servir de ayuda para la determinación de la estructura. La pirocatequina y otros *o*-hidroxi derivados del benceno dan coloraciones verdes. El ácido salicílico da un

color rojo intenso; muchos *o*-hidroxibenzaldehídos y cetonas dan colores que van del rojo al púrpura, más intensos que los fenoles sencillos. (Geissman, 1974)

Las muestras de propóleo se observaron de color marrón a negro debido a que presentan una mezcla de fenoles y por lo tanto no se distingue un color en particular, sino la suma de todos ellos. La intensidad de color obtenido es proporcional al contenido de fenoles en la muestra. Los propóleos de **FESC**, **Lago** y **El Oro**, obtuvieron las tonalidades más intensas tanto en propóleo en greña como en EEP. Dado que se trata de un método visual, no se distingue claramente una diferencia entre estas tres muestras, sin embargo el contenido de fenoles en el propóleo de Villa es claramente inferior a los demás.

En el caso de la tintura de propóleo, se utiliza agua destilada para no diluir la muestra en etanol, por lo que los complejos coloridos que se obtienen se precipitan. Este ensayo permitió distinguir mejor los propóleos de **FESC** y **Lago de Guadalupe** como los de mayor contenido de fenoles, por presentar precipitados abundantes y de color negro, seguidos por el propóleo de El Oro en el que se observó un precipitado de color marrón claro, y finalmente el propóleo de Villa, en el que casi no se formó precipitado y el color de la disolución era apenas visible.

Los resultados sugeridos por la prueba cualitativa se verificaron realizando la determinación cuantitativa de **fenoles** por el método de **Folin-Ciocalteu**. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdofosfato) a pH básico, dando lugar a un complejo de coloración azul susceptible de una determinación espectrofotométrica a 760 nm.

Se construyó una curva de calibración con una disolución estándar de ácido gálico (Tabla 12, Gráfica 6). Las absorbancias obtenidas se sustituyeron y se calculó el contenido de equivalentes de ácido gálico en un gramo de EEP. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5 y Gráfica 2, donde se observa que el propóleo de **Lago** (355.19 mg/g EEP) tiene la concentración más alta de fenoles, seguido de **FESC** (314.12 mg/g EEP). El propóleo de Villa obtuvo los valores más bajos.

Respecto al contenido de **flavonoides**, se utilizó como prueba cualitativa el ensayo con **acetato de plomo**. La reacción con el acetato de plomo se fundamenta en la formación de un complejo coloreado entre el plomo y los di y polihidroxifenoles como las flavonas, flavonoles, flavanonas dihidroxiladas, flavanoles y antocianidinas di y trihidroxiladas del propóleo.

Nuevamente se observó que las muestras de **FESC** y **Lago** obtuvieron las tonalidades más intensas en propóleo en greña y EEP, observándose un color amarillo-anaranjado, seguidos por el propóleo de El Oro en el que se observó un color amarillo claro, y por último el propóleo de Villa, que se observó de color amarillo claro traslúcido.

Al realizar la misma prueba en tintura de propóleo, todas las muestras dan tonalidades similares en la parte acuosa, pero los propóleos de **FESC** y **Lago** presentan la mayor cantidad de precipitado naranja.

La determinación cuantitativa de flavonoides se realizó utilizando una disolución de **tricloruro de aluminio**. El principio de este método se basa en la reacción del AlCl_3 con los flavonoides en medio alcalino formando un complejo color amarillo. El aluminio forma quelatos con flavonoides *o*-dihidroxiados, 3- hidroxilados y 5-hidroxilados, medibles espectrofotométricamente a 415 nm.

Para construir la curva de calibración se empleó una disolución estándar de quercetina de 1 mg/mL que se diluyó hasta 1 ppm (Tabla 13, Gráfica 7). Las absorbancias obtenidas se sustituyeron y se calculó el contenido de equivalentes de quercetina en un gramo de EEP. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 y Gráfica 3. De nuevo el propóleo de **Lago** (11.56 $\mu\text{g/g}$ EEP) tiene la concentración más alta de flavonoides, seguido de **FESC** (8.89 $\mu\text{g/g}$ EEP).

Por lo tanto, los resultados de las pruebas cualitativas describen acertadamente el contenido de fenoles y flavonoides en las muestras. Pues en todos los casos se pudo identificar el propóleo con mayor y menor cantidad de estos compuestos.

De las dos metodologías propuestas para la determinación de fenoles, se decidió que el método de **Folin-Ciocalteu** es el más adecuado para incluirse en el kit de la prueba de campo porque las tonalidades de color son más perceptibles a simple vista que las dadas por el método con cloruro férrico. A pesar de que no es una reacción específica, ha sido aceptada como la prueba de rutina para detección de fenoles en diversas muestras, entre ellas el propóleo, e incluida dentro de los parámetros de calidad de éste.

De las dos metodologías propuestas para la determinación de flavonoides, se decidió que el método con **acetato de plomo** es el más adecuado para incluir en la prueba de campo porque las tonalidades de amarillo son más intensas y perceptibles que las dadas por el método con tricloruro de aluminio.

Con las tonalidades obtenidas en ambas pruebas se construyó una escala de colores (azul para fenoles y amarilla para flavonoides) como se muestra en las Figuras 17 y 18. Para construir los intervalos "**alto**", "**medio**" y "**bajo**", se tomó como referencia las tonalidades de las cuatro muestras de propóleo, siendo FESC y Lago las muestras representativas del contenido **alto** de fenoles y flavonoides, El Oro la muestra representativa del contenido **medio** de fenoles y flavonoides, y Villa la muestra representativa del contenido **bajo** de fenoles y flavonoides.

Si bien el título del presente trabajo no lo especifica, se consideró incluir como tercera prueba la determinación el **índice de oxidación** del propóleo por ser una de las propiedades más demandadas en este producto.

De acuerdo con la propuesta de Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana “Propóleos. Especificaciones y Métodos de Prueba”, el índice de oxidación se puede determinar mediante el método visual con permanganato de potasio, o mediante el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). El método más adecuado para determinar el índice de oxidación en propóleo es el método de reducción del radical DPPH por tratarse de un método cuantitativo. Sin embargo, la técnica podría ser un tanto complicada de interpretar por miembros del sector apícola, por lo que se decidió utilizar el método visual con **permanganato de potasio** para realizar esta prueba.

El índice de oxidación por el método visual determina la capacidad antioxidante de un compuesto al reducir el catión Mn^{+7} del permanganato de potasio ($KMnO_4$), que actúa como agente oxidante a Mn^{+2} .

Se mide en función del tiempo en que tarda en desaparecer el color característico del permanganato de potasio, es decir, el tiempo en que el antioxidante (propóleo) tarda en reducir al agente oxidante (permanganato). Por lo tanto, cuanto mayor sea el tiempo que tarda en decolorarse el medio, menor capacidad antioxidante presenta la muestra.

Esta determinación se llevó a cabo igualmente en propóleo en greña, tintura y EEP, encontrándose que las muestras con mejor índice de oxidación fueron de nueva cuenta **FESC** (7.50 seg) y **Lago** (8.09 seg). Así mismo se demostró que no existe una diferencia significativa entre las diferentes preparaciones de propóleo, por lo que se puede utilizar cualquiera de ellas para determinar el índice de oxidación.

Para incluir el índice de oxidación en la prueba de campo, se construyó una guía de colores observados durante la reacción, donde al inicio el permanganato de potasio le otorga un color magenta al medio, que se empieza a decolorar y se observa como rosa claro, hasta regresar al color original de la muestra (Figura 20).

De igual manera, de acuerdo al tiempo de decoloración obtenido a partir de las muestras, se construyeron tres intervalos de tiempo para determinar la calidad del índice de oxidación en propóleo, a los que se les denominó “alto”, “medio” y “bajo”, como lo especifica la Tabla 7.

De manera general, se observó que los propóleos de **FESC** y **Lago** obtuvieron el mejor calificativo en función de sus propiedades químicas, seguidos de El Oro que representa el nivel medio de calidad, y por último la muestra de Villa del Carbón que representa los propóleos con un bajo nivel de calidad.

El propóleo de **Lago** presentó el contenido más alto de fenoles y flavonoides en las determinaciones cuantitativas, mientras que **FESC** presentó el mejor tiempo de decoloración en la prueba visual de índice de oxidación.

Anteriormente el propóleo de FESC había encabezado los resultados de otros estudios, sin embargo en 2015 las colmenas sufrieron varios percances (inundaciones y disminución de población) que impactaron notablemente la producción y con ello el contenido de fenoles y flavonoides en el propóleo.

Por otro lado, el dueño del apiario de Lago de Guadalupe refiere que lleva a cabo un tipo de apicultura denominada “migratoria”, en la cual las colonias se mudan periódicamente dependiendo de la variabilidad climática regional, hacia zonas más cálidas donde puedan recolectar mayor cantidad de miel, polen, jalea real, o en este caso, resinas para propóleo.

Ahora bien, los resultados obtenidos de las determinaciones químicas se comprobaron en términos de la actividad biológica de los EEP sobre tres cepas ATCC de microorganismos de importancia clínica: una bacteria Gram positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), una bacteria Gram negativa, *Escherichia coli* (ATCC 11229) y una levadura, *Candida albicans* (ATCC 14053).

Se determinó la efectividad del propóleo como inhibidor del crecimiento por el método de difusión en agar, utilizando concentraciones de 2, 4, 8 y 16 mg/mL. Este método está basado en el estudio la sensibilidad de los microorganismos a un antimicrobiano o antifúngico en función del halo de inhibición producido por la difusión del antimicrobiano o antifúngico en un medio de cultivo sólido. (Cantón, 2007)

El agar M.H. es el medio recomendado para las pruebas de sensibilidad de patógenos aeróbicos o facultativos de crecimiento rápido. La reproducibilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad utilizando diferentes lotes de este medio es buena; tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina y permite el crecimiento de la mayoría de los gérmenes patógenos. Además se han acumulado un gran número de resultados y experiencias utilizando este medio para las pruebas de sensibilidad.

Los resultados se muestran en la Tabla 9, donde puede observarse que las cepas *E. coli* y *C. albicans* fueron resistentes en todos los casos a las concentraciones probadas.

Con anterioridad se ha demostrado la actividad biológica del extracto de propóleos sobre *C. albicans*, tanto en cepas de referencia (ATCC 14053) como en aislamientos clínicos de origen humano. Éste puede ser fungistático o fungicida en función de las características de la muestra, la concentración del propóleo y el tiempo en que la cepa permanece en contacto con el propóleo. (Quintero-Mora, 2008)

En un estudio se reportó la actividad del EEP contra 23 cepas de levaduras aisladas de diferentes partes del cuerpo humano, encontrando que fue fungistático a una concentración de 0.55 mg/mL. (Rojas, 1990). Otros autores reportaron que la mínima concentración fungicida del EEP contra 15 cepas probadas fue de 3 a 7 mg/mL siendo, *C. albicans* más susceptible que otras especies como *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*. (Martins, 2002)

En ambas cepas, *E. coli* y *C. albicans*, no se produjo inhibición del crecimiento incluso a la concentración más alta (16 mg/mL). Los resultados se atribuyen a que el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de las muestras, pudo verse afectado por las condiciones climáticas del año en que se llevaron a cabo las cosechas, el tipo de vegetación u otra condición.

Por otro lado, la cepa *S.aureus* mostró los resultados sugeridos por las determinaciones químicas, pues a una concentración de 4 mg/mL los EEP de **FESC** y **Lago** formaron grandes halos de inhibición que se interpretaron como un resultado **SENSIBLE**, el EEP de El Oro obtuvo un resultado INTERMEDIO y el EEP de Villa, al no formar halo de inhibición, obtuvo un resultado RESISTENTE (Figura 21).

El Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana “Propóleos. Especificaciones y Métodos de Prueba” señala como requisitos indispensables:

1. Caracterización organoléptica (realizada por el apicultor), que incluya color, aroma, sabor y consistencia del propóleo.
2. Caracterización físico-química, que evalúe la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, índice de oxidación y actividad antioxidante del propóleo.
3. Requisitos antimicrobianos, la inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*.

De acuerdo a los resultados, los propóleos de FESC y Lago estarían cumpliendo con los requisitos físicos, químicos y antimicrobianos mínimos propuestos en la Norma en cuanto a la inhibición de *Staphylococcus aureus*. Es importante recordar que las pruebas *in vitro* no reflejan las condiciones reales encontradas en infecciones clínicas. Para *Candida albicans* y *Escherichia coli* se sugiere realizar las pruebas con concentraciones mayores.

La prueba de campo descrita en el presente trabajo cubre entonces el segundo punto de los requisitos para la evaluación de la calidad del propóleo, puesto que permite caracterizar física y químicamente una muestra sin importar si ésta se encuentra en greña, tintura o extracto etanólico. Dado que diversos estudios han demostrado una correlación entre la composición química y el efecto antimicrobiano del propóleo, los resultados de

las determinaciones de la prueba de campo estarían sugiriendo también la calidad de la actividad antimicrobiana de la muestra.

El kit de determinaciones para evaluar la calidad de propóleo mediante una prueba de campo incluirá los reactivos y contenedores necesarios para realizar la determinación cualitativa de fenoles, flavonoides e índice de oxidación en propóleo, así como un breve manual de recomendaciones para el manejo adecuado del propóleo. A continuación se enlistan los materiales y reactivos que se incluirán en cada caja.

- 1 manual de instrucciones para la realización de cada una de las determinaciones mencionadas y la escala de colores correspondiente.
- 1 manual de recomendaciones para el manejo adecuado del propóleo.
- 1 frasco con 10 mL de etanol al 70% para las determinaciones en propóleo en greña o EEP.
- 1 frasco con 10 mL de agua destilada para las determinaciones en tintura de propóleo.
- 1 frasco gotero con 1 mL de reactivo revelador de fenoles (A).
- 1 frasco gotero con 5 mL de reactivo revelador de fenoles (B).
- 1 frasco gotero con 1 mL de reactivo revelador de flavonoides.
- 1 frasco gotero con 10 mL de reactivo para índice de oxidación (A).
- 1 frasco gotero con 1 mL reactivo para índice de oxidación (B).
- Viales con tapa para realizar 6 determinaciones por duplicado.
- Viales de repuesto.
- Manual de instrucciones para disposición de residuos.

El diseño del logo y la presentación del kit se encuentra en proceso. Se adecuaron colores y figuras que hacen referencia al origen del producto. El idioma de toda la información del producto es en español, y en algunos casos se incluyen modismos y regionalismos utilizados en México, lo cual genera una sensación de afinidad en el consumidor.

El empaque cumplirá con las especificaciones descritas en la normatividad de ingreso de mercancías en el mercado, que recomienda presentaciones mínimas de 250 gramos a máximas de un kilogramo para su venta al menudeo.

Dentro de las recomendaciones mencionadas para el manejo de propóleo se incluyen consideraciones importantes para mejorar la calidad del mismo como las siguientes:

- La producción del propóleo se debe realizar por medio de rejillas o mallas específicas para su cosecha, las cuales consisten en una lámina plástica con ranuras. Las rejillas se colocan debajo de la tapa externa para que las abejas

rellenen las ranuras con propóleo, lo que permitirá su fácil recolección libre de impurezas.

- La recolección debe realizarse con materiales libres de residuos de alguna sustancia que pueda contaminarlo; el propóleo en bruto se debe introducir a un congelador entre -10°C y -20°C por lo menos una hora para que la resina se torne rígida y sea fácil de separarla de la malla.
- Durante la cosecha, no debe exponerse a los rayos del sol, evitar su almacenamiento cerca de fuentes de calor y no debe mezclarse con la cera que se encuentra en tapas o sobre los bastidores.
- El propóleo no debe ser comprimido formando bolas, deberá mantenerse tal cual se recolectó de la colmena.
- Deberá limpiarse manualmente con las manos limpias, con el fin de retirar las impurezas presentes en el mismo, como lo son, partes de abejas, astillas de madera, ceras, entre otras.

Utilizando este kit de determinaciones químicas en propóleo en diferentes etapas del proceso de producción, se pueden identificar puntos críticos en los cuales se ven afectadas las propiedades del propóleo hasta la elaboración del producto final.

Disposición de residuos

Una de las preocupaciones que se presentaron fue la **disposición de residuos** que se generarán al utilizar el kit, principalmente las soluciones de plomo. De acuerdo con la Asociación Mexicana para el Control de Residuos, el límite de plomo que puede disponerse en rellenos sanitarios es de 2 mg/L (Ascencio, 2008). Dicha cantidad que no se ve rebasada por el uso del reactivo de acetato de plomo, pues se utiliza sólo una gota para cada determinación, lo que equivale a aproximadamente a 10 µL.

De cualquier manera se sugiere que los residuos sean colectados en el mismo frasco en que se llevan a cabo las determinaciones y que de ser posible se entreguen periódicamente a una empresa especializada en el tratamiento de residuos.

Como **servicio adicional**, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ofrecerá un servicio para realizar **pruebas complementarias** a las muestras de propóleo que se solicite, como el **perfil antimicrobiano y análisis cromatográfico**.

10. CONCLUSIONES

El propóleo es un producto apícola que ha demostrado tener gran cantidad de aplicaciones y funciones biológicas benéficas para el organismo.

En el presente trabajo se desarrolló una prueba de campo para la detección de fenoles, flavonoides e índice de oxidación de propóleos mexicanos, que respalda la normatividad descrita en el Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana “Propóleos. Especificaciones y Métodos de Prueba”, publicado en el Diario Oficial de la Federación en 2015.

Se determinó cualitativamente y cuantitativamente el contenido de fenoles y flavonoides e índice de oxidación de cuatro muestras provenientes del Estado de México en propóleo en greña, tintura y extracto etanólico.

El propóleo proveniente de la región de Lago de Guadalupe, Cuautitlán Izcalli, tuvo el mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.

El propóleo proveniente del apiario de FESC presenta mejor propiedad antioxidante que las demás, en base al método visual.

La concentración de fenoles y flavonoides se relaciona con la actividad biológica del propóleo sobre cepas de importancia clínica.

Los propóleos de FESC y Lago de Guadalupe presentan actividad antimicrobiana contra la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) a una concentración de 4 mg/mL.

Se eligieron las técnicas más adecuadas para incluirse en el kit de determinaciones químicas de propóleo, por su reproducibilidad y fácil interpretación.

Se elaboraron escalas de colores semicuantitativas para interpretar el resultado de dichas determinaciones en términos de los calificativos “alto”, “medio” y “bajo”, que indican la calidad de una muestra de propóleo para una prueba determinada.

La prueba de campo descrita en el presente trabajo ha sido presentada en cursos y talleres que se llevan a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Se ha podido comprobar su eficacia con propóleos de otras regiones de la República como Campeche, Puebla, Guanajuato, Michoacán y Morelos, por lo que se le considera una propuesta prometedora que permitirá caracterizar químicamente una muestra cualquiera de propóleo, cubriendo así uno de los requisitos para la evaluación de la calidad de este producto.

El logo y la caja de presentación del kit, así como sus componentes: inserto, manual de recomendaciones, frascos reactivos y viales están en proceso de elaboración.

Entre las ventajas que presenta este kit de determinaciones se pueden mencionar las siguientes:

- Portátil, puede usarse en condiciones de campo
- Económico, no necesita de instrumental costoso
- De fácil interpretación, no requiere de preparación académica especializada

11. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

El interés de la población por los productos naturales sigue creciendo, lo que representa una oportunidad para comercializar ampliamente nuevos productos como el propóleo.

Dado que el principal objetivo de este trabajo es beneficiar al sector apícola mexicano, se pretende dar a conocer y difundir el uso de la prueba de campo en cursos, congresos, grupos de trabajo, redes sociales, entre otros, para que los apicultores vayan familiarizándose con las técnicas y reconozcan este kit como una herramienta útil para la evaluación de la calidad de su producto.

Por lo tanto, es fundamental iniciar concientizando a los productores apícolas de los beneficios de sujetarse a las normas y llevar un control de calidad de los productos de la colmena, para que puedan ofrecerse a un precio más competitivo y en una mayor cantidad de mercados.

Es importante validar el conjunto de técnicas utilizadas en esta prueba de campo con un mayor número de muestras de diferentes regiones, así como descartar posibles interferencias con otros analitos.

Los propóleos que presentan una escasa cantidad de fenoles y flavonoides, y un bajo índice de oxidación no deben descartarse, sino buscar alguna otra aplicación biológica o de tipo industrial.

12. REFERENCIAS

- Albokhadaim, I. (2015). Influence of dietary supplementation of propolis on hematology, biochemistry and lipid profile of rats fed high cholesterol diet. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* , 2 (1).
- Asawa, K. et. al. (2015). The antiplaque efficacy of propolis-based herbal toothpaste: A crossover clinical study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* , 6 (2).
- Ascencio, T. (2008). *Residuos Químicos Peligrosos en Instituciones de Educación Superior. Tesis de licenciatura*. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Asís, M. (1989). *Propóleo: el oro púrpura de las abejas*. Habana: Centro de Información y documentación Agropecuaria.
- Bankova, V. et. al. (2014). *Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review*. *Chemistry Central Journal* , 8 (28).
- Bonkanka, C. (2006). *Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. Tesis de doctorado*. Madrid, España: Universidad de la Laguna.
- Cantón, E. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Castaldo, S. C. (2002). Propolis, and old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* , 73 (1).
- Devlin, T. (2006). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas* (4a ed.). España: Reverté.
- DIBICO. (s.f.). *Agar de Mueller Hinton*. Recuperado el 8 de Septiembre de 2015, de <http://www.dibico.com/fichast/1021.pdf>
- DIBICO. (s.f.). *AGAR DE SOYA Y TRIPTICASEINA CON LECITINA Y POLISORBATO 80*. Recuperado el 8 de Septiembre de 2015, de <http://www.dibico.com/fichast/1263.pdf>
- DIBICO. (s.f.). *Agar Dextrosa Sabouraud*. Recuperado el 8 de Septiembre de 2015, de <http://www.dibico.com/buscar.php?t=med>
- Domínguez, M. (2008). *Efecto del éster fenético del ácido cafeico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares in vitro*. *Tesis de maestría*. México: Instituto Politécnico Nacional.

- Geissman, T. (1974). *Principios de Química Orgánica*. España: Reveté.
- Ghisalberti, E. (1979). Propolis: A review. *Annual Report of the International Bee Research Association* , 60 (2).
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm* , 23 (6).
- González, M. (2013). *Evaluación antiviral del propóleo mexicano en cultivo celular infectado con el virus de Aujeszky*. Tesis de Maestría. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Gutiérrez, E. (2011). *Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de Pasteurella multocida aislada de conejos*. Tesis de maestría. México: Facultad de Estudios Superiores Cauautitlán, UNAM.
- Heinze, W. et. al. (1998). Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance. *Tierarztl Umsch* , 53 (6).
- Imhof, M. et. al. (2005). Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *Int. J. Gynaecol. Obstet* , 89 (2).
- INEGI. (2009). *Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007*. Recuperado el 14 de Agosto de 2015, de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>
- Jean-Prost, P., & Le Conte, Y. (2007). *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*. (4 ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping*. Rome: FAO Agricultural Services Bulletin.
- Leonhardt, S. (2010). Stingless bees use terpenes as olfactory cues to find resin sources. *Chem Senses* , 35 (7).
- Lotfy, M. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac.J. Cancer Prev.* , 7 (1).
- Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Medellín, Colombia: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
- Martins, R. et. al. (2002). Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vivo* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci* , 44 (1).
- McMurry, J. (2012). *Química Orgánica* (8 ed.). México: Cengage Learning.
- Mendizabal, F. (2004). *Abejas*. Buenos Aires: Albatros.

Mirzoeva, O., *et. al.* (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research*, 152 (3).

Moritani, Y. *et. al.* (2000). Synthesis of β -Alkyl Cyclopentanones in High Enantiomeric Excess via Copper-Catalyzed Asymmetric Conjugate Reduction. *Journal of the American Chemical Society*, 122 (28).

OMS. (2013). *Fichas Internacionales de Seguridad Química*. Recuperado el 9 de Septiembre de 2015, de http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/@ed_protect/@protrav/@safework/documents/publication/wcms_212840.pdf

Palazón, J. *et. al.* (s.f.). Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. *Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona*.

Quintero-Mora, *et. al.* (2008). Efecto de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Mic.*, 25.

Rodríguez, B. (2015). *Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en Medicina Veterinaria. Tesis de Maestría*. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Rojas, N. *et. al.* (1990). Actividad antimicrobiana de una estructura química aislada de una muestra de propóleo cubano. *Rev. Biol.*, IV.

Safety, I. P. (2004). *Fichas Internacionales de Seguridad Química*. Recuperado el 9 de Septiembre de 2015, de <http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.a82abc159115c8090128ca10060961ca/?vgnnextoid=4458908b51593110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD>

SAGARPA. (2010). *El propóleo y las técnicas para su colecta*. Recuperado el 15 de Agosto de 2015, de Notiabeja: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/noti1006.pdf>

SAGARPA. (2010). Situación actual y perspectiva de la Apicultura en México. *claridades Agropecuarias* (199).

Sawaya, A. *et. al.* (2002). Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35 (3).

Vargas-Sánchez, R. *et. al.* (2014). Antioxidant and Antimicrobial Activity of. *Journal of Food Science*, 79 (8), C1499- C1504.

Williams, C. *et. al.* (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, 21 (4).

Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (3a ed.). California: Universitat Jaume.

Zhang, R. (2011). Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A mice. *Nutrition & Metabolism*, 85 (8).

13. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos

- Acetato de plomo, $Pb(C_2H_3O_2)_2$ (10%). Disolver 10 g de acetato de plomo en agua destilada y aforar a 100 mL.
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 (20%). Colocar aproximadamente 20 mL de agua destilada en un vaso de precipitado. Agregar lentamente y con agitación 20 mL de ácido sulfúrico. Aforar a 100 mL con agua destilada.
- Carbonato de sodio, Na_2CO_3 (200 g/L). Disolver 200 g de carbonato de sodio anhidro en 700 mL de agua caliente. Dejar enfriar y aforar a 1000 mL con agua destilada.
- Cloruro férrico, $FeCl_3$ al 1%. Disolver 1 g de cloruro férrico en agua destilada y aforar a 100 mL.
- Permanganato de potasio, $KMnO_4$ 0.1 N. Pesar 158 mg de permanganato de potasio y disolver en 10 mL de agua destilada.
- Disolución stock de ácido gálico (0.2 mg/mL). Disolver 20 mg de ácido gálico en agua destilada y aforar a 100 mL. Mantener en refrigeración protegido de la luz.
- Disolución stock de quercetina (1 mg/mL). Disolver 100 mg de quercetina dihidratada en 100 mL de metanol. Mantener en refrigeración protegido de la luz.
- Tricloruro de aluminio, $AlCl_3$ al 2%. Disolver 2 g de tricloruro de aluminio en agua destilada y aforar a 100 mL, con mucho cuidado ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico.
- Tricloruro de hierro, $FeCl_3$ al 1%. Disolver 1 g de tricloruro de hierro en agua destilada y aforar a 100 mL.

Anexo 2. Fichas de Seguridad Química

Las fichas internacionales de seguridad química (ICSC, International Chemical Safety Cards) son hojas informativas que recopilan de forma clara y concisa la información esencial en materia de seguridad y salud en la utilización de productos químicos. (OMS, 2013)

Las siguientes fichas de seguridad química corresponden a extractos de las fichas originales elaboradas por el Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Internacional del Trabajo (OIT).

Contienen de manera resumida la información más sobresaliente de los reactivos utilizados para llevar a cabo la metodología del presente trabajo así como los reactivos que se incluyen en el kit de determinaciones químicas de propóleo.

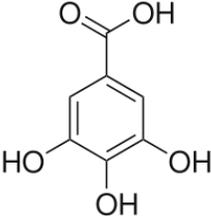
Se añadió a cada una el pictograma establecido por la Asociación Nacional de Protección contra el Fuego utilizado para comunicar los riesgos de los materiales peligrosos. Se trata de un rombo con cuatro divisiones que tienen colores asociados con un significado. El azul hace referencia a los peligros para la salud, el rojo indica la amenaza de inflamabilidad y el amarillo el peligro por reactividad: es decir, la inestabilidad del producto. A estas tres divisiones se les asigna un número de 0 (sin peligro) a 4 (peligro máximo). Por su parte, en la sección blanca puede haber indicaciones especiales para algunos materiales.



Figura 27. Modelo de rombo establecido por la ANPF para comunicar los riesgos de materiales peligrosos.

ACETATO DE PLOMO			
Sinonimia	Acetato dibásico de plomo		
Fórmula Masa molecular CAS	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ 325.3 301-04-2		
Propiedades físicas			
Aspecto Punto de fusión Densidad Solubilidad en agua	Cristales incoloros o polvo blanco. 280° C 3.3 g/cm ³ 54 g/100 mL a 20°C		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Tos, dolor de garganta.	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Enrojecimiento, dolor.	Guantes en combinación con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante.
Ojos	Enrojecimiento, dolor, visión borrosa.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante.
Ingestión	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, shock o colapso.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Provocar el vómito. (UNICAMENTE EN PERSONAS CONSCIENTES)

Datos ambientales
Esta sustancia puede ser peligrosa para el medio ambiente. Se puede producir la bioacumulación de esta sustancia en las plantas y los animales. Se aconseja firmemente impedir que el producto químico se incorpore al ambiente porque es persistente.

ÁCIDO GÁLICO			
Sinonimia	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico		
Fórmula	$C_7H_6O_5$, $C_6H_2(OH)_3COOH$		
Masa molecular	170.1		
CAS	149-91-7		
Propiedades físicas			
Aspecto	Cristales higroscópicos blancos.		
Punto de fusión	210° C		
Densidad	1.7 g/cm ³		
Solubilidad en agua	1.1 g/100 ml a 20°C		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	---	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel	---	Guantes de protección.	Lavar con agua y jabón.
Ojos	---	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante.
Ingestión	---	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Beber agua abundante. Provocar el vómito.

ÁCIDO SULFÚRICO			
Sinonimia	Aceite de vitrolío		
Fórmula Masa molecular CAS	H ₂ SO ₄ 98,1 7664-93-9		
Propiedades físicas			
Aspecto Punto de ebullición Punto de fusión Densidad Solubilidad en agua	Líquido higroscópico incoloro, aceitoso e inodoro. 340 ° C 10 °C 1.8 g/cm ³ Miscible		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Corrosivo. Sensación de quemazón. Tos, dolor de garganta. Dificultad respiratoria. Jadeo.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Posición de semiincorporado. Respiración artificial si estuviera indicada.
Piel	Corrosivo. Enrojecimiento, dolor. Ampollas. Quemaduras cutáneas graves.	Guantes de protección. Traje de protección	Quitar las ropas contaminadas. Enjuagar la piel con agua abundante o ducharse.
Ojos	Corrosivo. Enrojecimiento, dolor. Quemaduras profundas graves.	Pantalla facial o protección ocular combinada con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos. Quitarse lentes de contacto si es que puede hacerse con facilidad.

Ingestión	Corrosivo. Dolor abdominal. Sensación de quemazón. Shock o colapso.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito.
Datos ambientales			
La sustancia es nociva para los organismos acuáticos.			

CARBONATO DE SODIO			
Sinonimia	Sal disódica de ácido carbónico		
Fórmula Masa molecular CAS	Na ₂ CO ₃ 106,0 497-19-8		
Propiedades físicas			
Aspecto Punto de fusión Densidad Solubilidad en agua	Polvo higroscópico blanco. 851° C 2.5 g/cm ³ 30 g/100 ml a 20°C		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Tos, dolor de garganta.	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel	Enrojecimiento.	Guantes de protección.	Enjuagar con agua abundante.
Ojos	Enrojecimiento, dolor.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante.

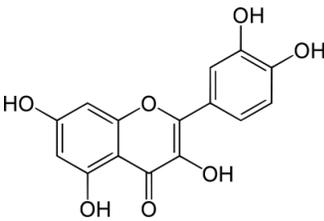
Ingestión	Dolor abdominal, sensación de quemazón.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Beber agua abundante.
-----------	---	--	---------------------------------

CLORURO FÉRRICO			
Sinonimia	Cloruro de hierro Tricloruro de hierro Cloruro de hierro (III)		
Fórmula Masa molecular CAS	FeCl ₃ 162,2 7705-08-0		
Propiedades físicas			
Aspecto Punto de fusión Densidad Solubilidad en agua	Cristales higroscópicos negros a marrones. 37° C 2.9 g/cm ³ 92 g/100 mL a 20°C		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Tos, dolor de garganta.	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Enrojecimiento, dolor.	Guantes de protección.	Enjuagar con agua abundante.
Ojos	Enrojecimiento, dolor, visión borrosa.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante.
Ingestión	Dolor abdominal, vómitos, diarrea, shock o colapso.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Beber agua abundante. NO provocar el vómito.

ETANOL			
Sinonimia	Etanol absoluto Alcohol Alcohol etílico		
Fórmula	C ₂ H ₆ O, CH ₃ CH ₂ OH		
Masa molecular	46,1		
CAS	64-17-5		
Propiedades físicas			
Aspecto	Líquido incoloro, volátil.		
Punto de ebullición	78,3° C		
Densidad	0.78 g/cm ³		
Solubilidad en agua	Miscible con agua en todas proporciones, éter, metanol, cloroformo y acetona		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Tos, dolor de garganta. Fatiga. Somnolencia.	Ventilación. Protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel	Piel seca.	Guantes de protección.	Lavar con agua y jabón.
Ojos	Enrojecimiento, dolor, quemazón.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante.
Ingestión	Sensación de quemazón. Dolor de cabeza. Confusión, vértigo. Pérdida del conocimiento.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica.

METANOL			
Sinonimia	Alcohol metílico Carbinol Alcohol de madera		
Fórmula	CH ₄ O, CH ₃ OH		
Masa molecular	32.0		
CAS	67-56-1		
Propiedades físicas			
Aspecto	Líquido incoloro de olor característico.		
Punto de ebullición	65° C		
Densidad	0.79 g/cm ³		
Solubilidad en agua	Miscible		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Tos. Vértigo. Dolor de cabeza. Náuseas. Debilidad. Alteraciones de la vista.	Ventilación. Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Piel seca. Enrojecimiento. PUEDE ABSORBERSE.	Guantes de protección.	Enjuagar con agua. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento, dolor.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante.
Ingestión	Dolor abdominal, jadeo, vómitos, convulsiones, pérdida del conocimiento.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Provocar el vómito. Proporcionar asistencia médica.

PERMANGANATO DE POTASIO			
Sinonimia	No aplica		
Fórmula	KMnO ₄		
Masa molecular	158		
CAS	7722-64-7		
Propiedades físicas			
Aspecto	Cristales púrpura oscuros.		
Punto de fusión	Se descompone por debajo del punto de fusión a 240 °C		
Densidad	2.7 g/cm ³		
Solubilidad en agua	6.4 g/100 mL a 20°C		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Sensación de quemazón. Tos, dolor de garganta. Jadeo.	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Respiración artificial si estuviera indicada
Piel	Enrojecimiento. Quemaduras cutáneas. Dolor.	Guantes de protección.	Enjuagar con agua. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento, dolor. Quemaduras profundas.	Pantalla artificial o protección ocular combinada.	Enjuagar con agua abundante. Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal, sensación de quemazón.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Beber agua abundante. NO provocar el vómito

QUERCETINA			
Sinonimia	Quercetina anhidra		
Fórmula	$C_{15}H_{10}O_7$		
Masa molecular	302,24		
CAS	117-39-5		
Propiedades físicas			
Aspecto	Polvo o cristales amarillos.		
Punto de fusión	43 °C		
Solubilidad en agua	Insoluble		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	--- ---	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Respiración artificial si estuviera indicada
Piel	--- ---	Guantes de protección.	Lavar con agua y jabón. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	--- ---	Pantalla artificial o protección ocular combinada.	Enjuagar con agua abundante. Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	--- ---	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Proporcionar asistencia médica.

REACTIVO DEL FENOL FOLIN-CIOCALTEU			
Disolución acuosa con componentes inorgánicos.			
Componentes peligrosos	CAS	Tipo de peligro	
Litio sulfato	10377-48-7	Nocivo	
Sodio wolframato	13472-45-2	Nocivo	
Ácido fosfórico	7664-38-2	Corrosivo	
Ácido clorhídrico	7647-01-0	Corrosivo e Irritante	
Propiedades físicas			
Aspecto	Líquido amarillo.		
Densidad	1.24 g/cm ³		
Solubilidad en agua	Soluble		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	---	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel	---	Guantes de protección.	Enjuagar con agua abundante. Eliminar ropa contaminada.
Ojos	---	Pantalla artificial o protección ocular combinada.	Enjuagar con agua abundante.
Ingestión	---	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Beber agua (máximo 2 vasos).

TRICLORURO DE ALUMINIO			
Sinonimia	Cloruro de Aluminio (III)		
Fórmula Masa molecular CAS	AlCl ₃ 133.3 7446-70-0		
Propiedades físicas			
Aspecto Punto de fusión Densidad Solubilidad en agua	Polvo incoloro a blanco. 192,4 °C 2.44 g/cm ³ Reacciona		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Sensación de quemazón. Tos, Dificultad para respirar. Garganta irritada.	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Posición semiincorporada. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Quemaduras cutáneas.	Guantes de protección.	Enjuagar con agua abundante. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Quemaduras profundas.	Pantalla artificial o protección ocular combinada con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante. Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal, sensación de quemazón.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. NO provocar el vómito.

TRICLORURO DE HIERRO			
Sinonimia	Cloruro férrico Cloruro de hierro Cloruro de hierro (III)		
Fórmula	FeCl ₃		
Masa molecular	162.2		
CAS	7705-08-0		
Propiedades físicas			
Aspecto	Cristales higroscópicos negros a marrones.		
Punto de fusión	37 °C		
Densidad	2.9 g/cm ³		
Solubilidad en agua	92 g/100 mL a 20°C. Reacciona		
Exposición			
	Síntomas	Prevención	Primeros auxilios
Inhalación	Tos, dolor de garganta.	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Enrojecimiento. Dolor.	Guantes de protección.	Enjuagar con agua abundante. Quitar las ropas contaminadas
Ojos	Enrojecimiento, dolor. Visión borrosa.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante. Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal, vómitos, diarrea. Shock o colapso.	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar. Beber agua abundante. NO provocar el vómito.

Anexo 3. Determinación del espectro de absorción para las pruebas cuantitativas.

Tabla 10. Longitudes de onda ensayadas para la cuantificación de fenoles.

Longitud de onda	Absorbancia	Longitud de onda	Absorbancia
400	0,307	740	0,532
500	0,349	750	0,539
600	0,452	760	0,542
700	0,509	770	0,533
710	0,514	780	0,528
720	0,519	790	0,518
730	0,525	800	0,507

Gráfica 4. Espectro de absorción para cuantificación de fenoles.

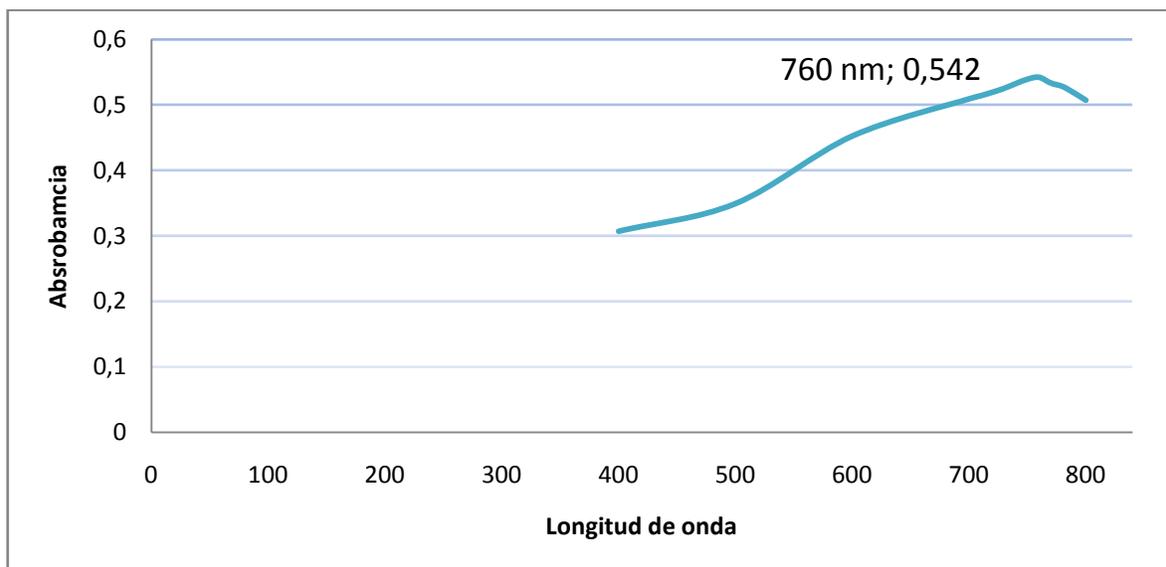
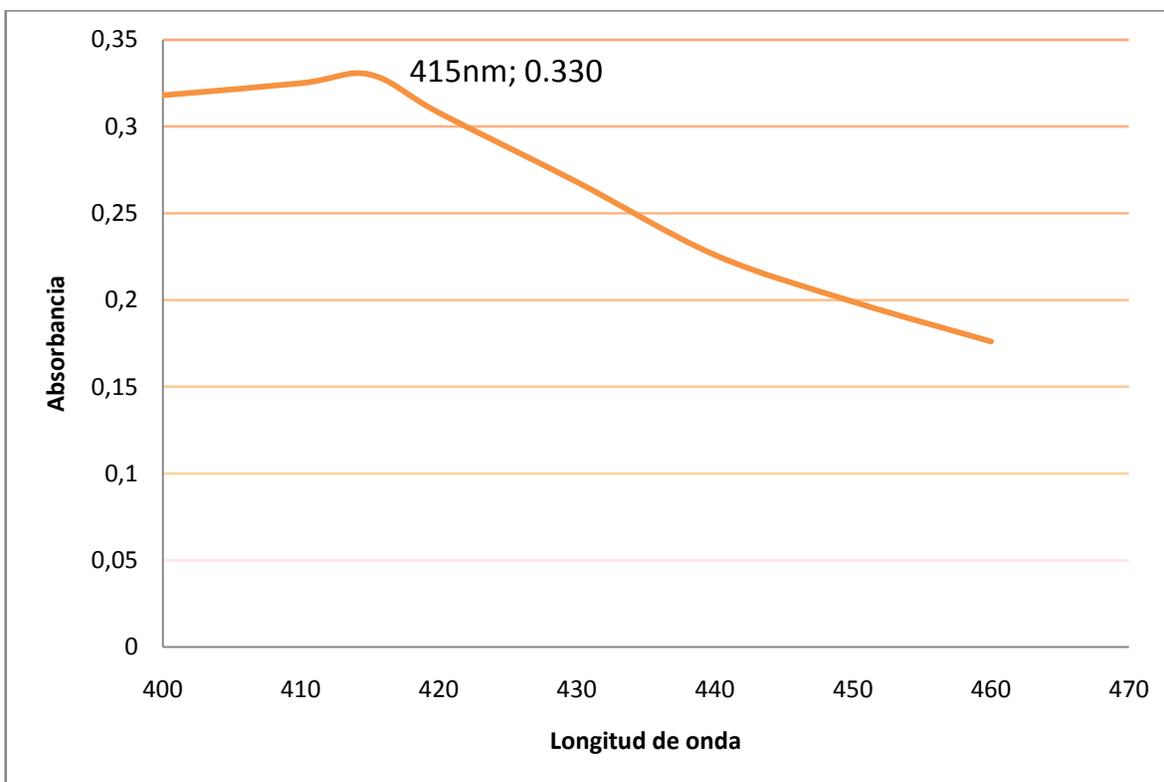


Tabla 11. Longitudes de onda ensayadas para cuantificación de flavonoides.

Longitud de onda	Absorbancia
400	0,318
410	0,325
415	0,330
420	0,308
430	0,268
440	0,226
450	0,199
460	0,176

Gráfica 5. Espectro de absorción para cuantificación de flavonoides.



Anexo 4. Curvas de calibración para las pruebas cuantitativas.

Tabla 12. Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración para fenoles totales.

Concentración	Absorbancia
0,00625	0,0516
0,0125	0,1214
0,025	0,2589
0,05	0,5017
0,1	0,9720
0,2	1,8841

Gráfica 6. Representación gráfica de la curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.

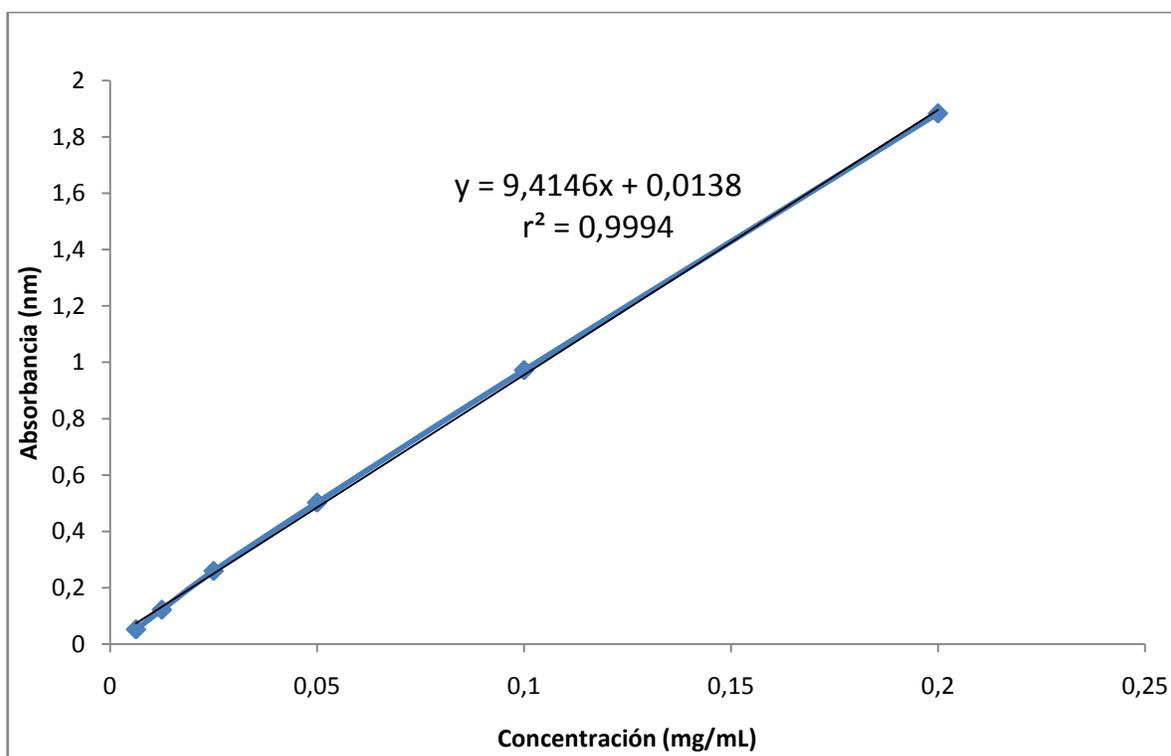
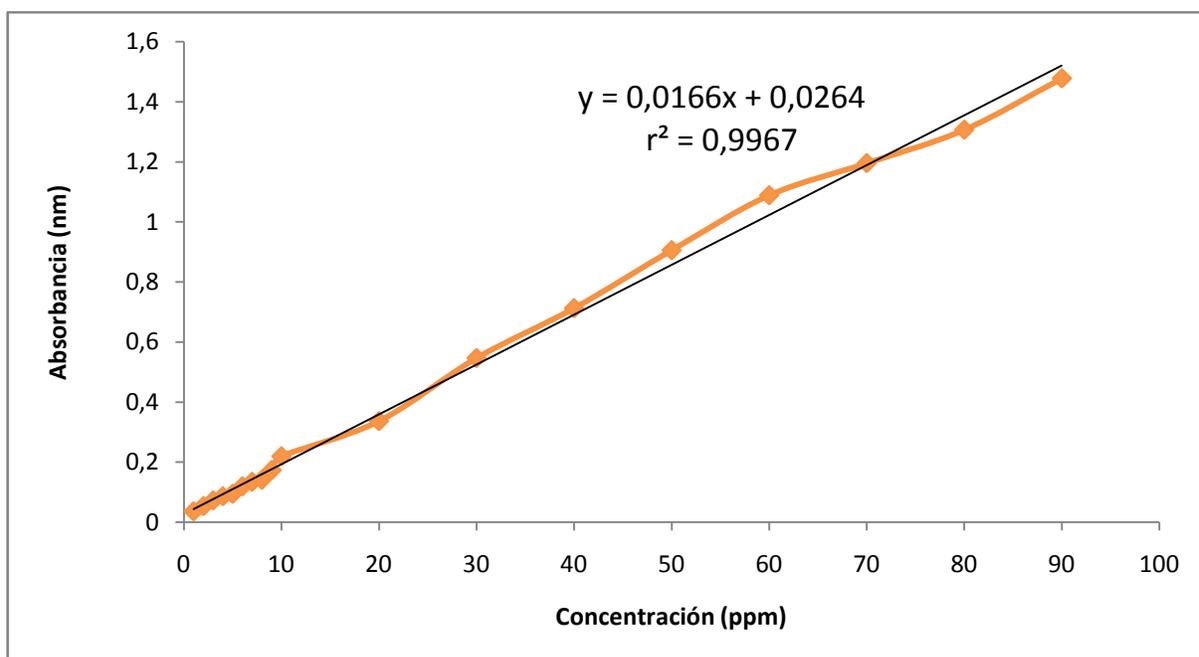


Tabla 13. Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración para flavonoides totales.

Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia
1	0,036	10	0,219
2	0,053	20	0,336
3	0,072	30	0,546
4	0,086	40	0,712
5	0,094	50	0,905
6	0,119	60	1,088
7	0,134	70	1,195
8	0,141	80	1,306
9	0,173	90	1,477

Gráfica 7. Representación gráfica de la curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales.



Anexo 5. Preparación de medios de cultivo

Agar Mueller-Hinton (MH).

Rehidratar 38 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45 °C. Vaciar en cajas de Petri estériles. (DIBICO, Agar de Mueller Hinton)

Agar Mueller-Hinton + dextrosa 2% (MH + dext).

Rehidratar 38 g del medio en un litro de agua destilada. Agregar 20 g de dextrosa (o glucosa o sacarosa) y disolver. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45 °C. Vaciar en cajas de Petri estériles.

Agar Sabouraud Dextrosa (SDA).

Rehidratar 65 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Cuando se requiera el medio en tubo de ensayo, distribuir el volumen requerido antes de esterilizar y posteriormente enfriar en posición inclinada. Conservar en refrigeración de 2 a 8 °C. (DIBICO, Agar Dextrosa Sabouraud)

Agar de Soya y Trypticaseína (AST).

Rehidratar 45.7 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8 °C. (DIBICO, AGAR DE SOYA Y TRIPTICASEINA CON LECITINA Y POLISORBATO 80)