



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
UNIDAD DE POSGRADOS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS

Proyecto de investigación y desarrollo
previo a la obtención del Grado
de Magíster en Ciencias y
Tecnologías Cosméticas

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE VARIOS
EXTRACTOS DE PROPÒLEOS DE LA ZONA
SUR DEL ECUADOR**

Autores:

María Augusta Verdugo Torres

Bruno Esteban Tola Álvarez

Dirigido por:

Lic. Ingrid Márquez Hernández PhD.

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE VARIOS
EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE LA ZONA
SUR DEL ECUADOR**

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE VARIOS EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE LA ZONA SUR DEL ECUADOR

MARÍA AUGUSTA VERDUGO TORRES

Ingeniero Químico
Licenciada en Ciencias de la Educación

BRUNO ESTEBAN TOLA ÁLVAREZ

Doctor en Bioquímica Farmacia

Dirigido por:

INGRID MÁRQUEZ HERNÁNDEZ

Licenciada en Ciencias Farmacéuticas
Master en Química Farmacéutica
Doctor en Ciencias Farmacéuticas



	Datos de catalogación bibliográfica
VERDUGO TORRES MARIA AUGUSTA TOLA ÁLVAREZ BRUNO ESTEBAN	
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE VARIOS EXTRACTOS DE PROPOLEOS DE LA ZONA SUR DEL ECUADOR	
Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca-Ecuador. 2017 MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA COSMÉTICA Formato 170 x 240 mm	
Página 93	

VERDUGO TORRES MARIA AUGUSTA
TOJA ALVAREZ BRUNO ESTEBAN

Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca-Ecuador. 2017
 MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA COSMÉTICA
 Formato 170 x 240 mm Páginas 93

Breve reseña de los autores e información de contacto:

María Augusta Verdugo Torres

verdugotorres@hotmail.com

Bruno Esteban Tola Álvarez.

bruno.tolalv@hotmail.com

Lic. Ingrid Márquez Hernández PhD

Licenciada en Ciencias Farmacéuticas

Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Todos los derechos reservados

DERECHOS RESERVADOS

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE VARIOS EXTRACTOS
DE PROPÓLEOS DE LA ZONA SUR DEL ECUADOR.
IMPRESO EN ECUADOR - PRINTED IN ECUADOR

INDICE GENERAL

CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Presentación y planteamiento del problema	1
1.2. Antecedentes teóricos relacionados con el problema	1
1.3. Justificación	2
1.4. Objetivo general	3
1.5. Objetivos específicos	3
1.6. Hipótesis	4
CAPÍTULO 2	5
MARCO-TEÓRICO	5
2.1. Estado del arte	5
2.2. Enfoque teórico	6
2.2.1. El propóleos	6
2.2.2. Composición química del propóleos	8
2.2.2.1. Flavonoides	9
2.2.2.2. Ácidos fenólicos	10
2.2.2.3. Antraquinonas	11
2.3. Radicales libres	12
2.4. Actividad antioxidante	13
2.5. Plantas apícolas	15
CAPÍTULO 3	17
METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1. Recolección de muestras	17
3.2. Preparación del extracto	18
3.2.1. Resultados y discusión del rendimiento de los extractos de propóleos ...	18
3.3. Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)	19
3.3.1. Resultados y discusión	20

3.4.	Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de masas.....	23
3.4.1.	Resultados y discusión Cromatografía Gaseosa Espectrometría de masas 24	
3.5.	Cuantificación de compuestos fenólicos mediante Folin-Ciocalteu.....	40
3.6.	Actividad secuestradora del radical libre DPPH	44
CAPÍTULO 4.....		53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		53
4.1.	Conclusiones.....	53
4.2	Recomendaciones	54
ANEXOS.....		55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácidos fenólicos más frecuentes	11
Figura 2. Análisis cromatográfico por CCD de los extractos de las muestras de propóleos. Fuente: autores.....	20
Figura 3. Cromatograma gaseoso obtenido para la muestra PE14.....	25
Figura 4. Zona ampliada del cromatograma obtenido a partir de los 35 min de la corrida cromatográfica	32
Figura 5. Fragmentaciones a partir de las cuales se dedujeron, ejemplificadas para el lupeol.....	33
Figura 6. Fragmentaciones.....	34
Figura 7. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	41
Figura 8. Gráfico de cajas que relaciona la muestra con el porcentaje de fenoles totales	42
Figura 9. Actividad secuestradora de radicales libres de los tres extractos (PE-14, PE-17; PE-19) a diferentes concentraciones. Fuente: Autores.....	45
Figura 10. Comparación entre las muestras con la capacidad mínima inhibitoria	46
Figura 11. Relación entre el contenido de polifenoles totales y la EC ₅₀ de las tres muestras de propóleos (PE-14, 17 y 19). Fuente: Autores.....	47
Figura 12. Relación entre la EC ₅₀ y el porcentaje de polioles en las muestras.	50
Figura 13. Relación EC ₅₀ y porcentaje de éteres, glicerina y antraquinonas	50
Figura 14. Relación entre EC ₅₀ y el porcentaje de triterpénicos	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos Antioxidantes	14
Tabla 2. <i>Especies apícolas más frecuentes.</i>	15
Tabla 3: <i>Datos de las muestras de propóleos colectadas.</i>	17
Tabla 4. <i>Rendimiento de extractos de propóleos.</i>	18
Tabla 5: <i>Relación entre el color observado y la posible estructura de los compuestos químicos. (Wagner & Bladt, 1996)</i>	21
Tabla 6: <i>Compuestos identificados a partir del análisis por CG-EM</i>	25
Tabla 7: <i>Estructura de los ácidos carboxílicos identificados e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos.</i>	27
Tabla 8: <i>Interpretación del espectro correspondiente a los éteres de glicerilo identificados.</i>	29
Tabla 9: <i>Interpretación del espectro correspondiente a la 1,6,8-trihidroxi-3-metilantraquinona.</i>	30
Tabla 10. <i>Compuestos identificados para las muestras 17 y 19, a partir del análisis por CG-EM</i>	35
Tabla 11: <i>Estructura de otros compuestos identificados en las muestras 17 y 19 e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos.</i>	39
Tabla 12. <i>Cuantificación de compuestos fenólicos totales en muestra de propóleos de diferentes localizaciones geográficas.</i>	42

INDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Espectro de masas del ácido palmítico.....</i>	<i>55</i>
Anexo 2. <i>Espectro de masas del ácido eicosanoico</i>	<i>55</i>
Anexo 3. <i>Espectro de masas del ácido tetracosanoico.....</i>	<i>56</i>
Anexo 4. <i>Espectro de masas del ácido caféico.....</i>	<i>56</i>
Anexo 5. <i>Espectro de masas del ácido oleico.....</i>	<i>57</i>
Anexo 6. <i>Espectro de masas del 1-octadecil glicerol.....</i>	<i>57</i>
Anexo 7. <i>Espectro de masas del eicosylglicerol.....</i>	<i>58</i>
Anexo 8. <i>Espectro de masas de 1, 6, 8-trihidroxí-3-metilantraquinona</i>	<i>58</i>
Anexo 9. <i>Espectro de masas de la lupenona</i>	<i>59</i>
Anexo 10. <i>Espectro de masas del lupeol</i>	<i>59</i>
Anexo 11. <i>Espectro de masas del cicloartenol.....</i>	<i>60</i>
Anexo 12. <i>Espectro de masas de la señal rotulada con el número 26</i>	<i>60</i>
Anexo 13. <i>Espectro de masas de la señal rotulada con el número 28</i>	<i>61</i>
Anexo 14. <i>Espectro de masas de la señal rotulada con el número 32</i>	<i>61</i>
Anexo 15. <i>Espectro de masas de la señal rotulada con el número 16 para la muestra 17</i>	<i>62</i>
Anexo 16. <i>Espectro de masas de la señal rotulada con el número 34 para las muestras 17 y 19.....</i>	<i>62</i>
Anexo 17. <i>Espectro de masas de la señal rotulada con el número 43 para la muestras 17 y 40 para la muestra 19</i>	<i>63</i>
Anexo 18. <i>Cromatograma gaseoso obtenido para la muestra 17</i>	<i>63</i>
Anexo 19. <i>Cromatograma gaseoso obtenido para la muestra 19</i>	<i>64</i>
Anexo 20. <i>mgEAG/g PE-14 de las diferentes muestras Folin-Ciocalteu.</i>	<i>65</i>
Anexo 21. <i>% DPPH remanente a diferentes concentraciones.</i>	<i>66</i>

DEDICATORIA

A mis hijos

Bruno

Este trabajo lo dedico a mi familia y a mis padres

Ma. Augusta

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a nuestra tutora Lic. Ingrid Márquez PhD y todo su equipo de trabajo al igual que al Ing. Pablo Arévalo PhD, por el apoyo permanente en el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa colectada por las abejas de diferentes árboles y plantas. El objetivo de la investigación fue establecer la relación existente entre la capacidad antioxidante y la composición química de varios extractos de propóleos para su aplicación en la industria cosmética, colectados en diferentes lugares de la provincia del Azuay, Ecuador. En cuanto al contenido total de fenoles PE-19 mostró los valores más elevados de polifenoles (mgEAG) por cada gramo de muestra analizada, con un valor de 70,07, seguido de la PE-14 con 68,93 y con el menor valor, 63,00 el extracto PE-17.

Los extractos de propóleos (EP) mostraron variable actividad antioxidante determinada con el radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·). Los resultados obtenidos mostraron que todos los extractos lograron reducir el 50% de la concentración de DPPH a concentraciones inferiores a los 0,2 mg/mL. La muestra PE-14 con un valor de 0,070, logra la mayor eficiencia como antioxidante, dado que presenta el menor valor de dicho parámetro. Le continúa la PE-17 con 0,097 y con la menor eficiencia se presenta la muestra PE-19 con un EC50 de 0,131. La presencia de compuestos fenólicos, sin embargo, apreciando los resultados del estudio de CG-EM, son pocos los metabolitos de tal naturaleza y, además, están en bajas concentraciones. En términos generales, las muestras en estudio se destacan por presentar una composición química muy diversa, en tal sentido no se pudo encontrar una relación entre la actividad antioxidante y la composición química de las muestras de propóleos.

Palabras claves: propóleos, polifenoles, actividad antioxidante, composición química.

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance collected by bees from different trees and plants. The objective of this research was to establish the relationship between the antioxidant capacity and the chemical composition of several extracts of propolis for its application in the cosmetic industry, collected in different places of the province of Azuay, Ecuador. In respect to the total content of PE-19 phenols, the highest values of polyphenols (mgEAG) were recorded for each gram of sample analyzed, with a value of 70.07, followed by PE-14 with 68.93 and with the lowest value, 63.00 the PE-17 extract.

The results showed that all the extracts were able to reduce 50% of the concentration of DPPH at concentrations lower than 50%. The results obtained showed that all the extracts were able to reduce 50% of the concentration of DPPH in concentrations inferior to 0.2 mg / mL. The sample PE-14 with a value of 0.070 achieves the highest efficiency as an antioxidant, since it has the lowest value of this parameter. It is followed by PE-17 with 0.097 and with the lowest efficiency the PE-19 sample is presented with an EC 50 of 0.131. The presence of phenolic compounds, however, considering the results of the CG-EM study, there are few metabolites of this nature and, in addition, are in low concentrations. In general terms, the samples under study are characterized by a very diverse chemical composition. In this sense, it was not possible to find a relation between the antioxidant activity and the chemical composition of propolis samples.

Key words: propolis, polyphenols, antioxidant activity, chemical composition

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Presentación y planteamiento del problema

En el Ecuador existe una gran cantidad de apicultores que no aprovechan los beneficios que ofrece el propóleo como un producto antioxidante, porque, no existen estudios sobre la composición de ellos en el país. La composición química del propóleo es cualitativa y cuantitativamente variable dependiendo de la diversidad fitogeográfica del área donde se produce y que podrían tener una influencia en sus propiedades biológicas.

1.2. Antecedentes teóricos relacionados con el problema

Ecuador tuvo su apogeo apícola en la década de los noventa, pero, decayó en los años posteriores, luego de esta etapa hay una cierta proliferación bajo condiciones muy precarias donde los apicultores han logrado capturar los enjambres y ponerlos en cajones rústicos.

La realidad de la Apicultura ecuatoriana es restringida, a pesar de la "exuberante vegetación de las regiones del país." Tradicionalmente, los apicultores del Ecuador han producido solamente miel, esencialmente por la falta de tecnología y asistencia técnica, lo que ha impedido aprovechar la producción de los derivados de diferente tipo (Burgos, 2012), sin embargo, se han desarrollado productos con mayor valor agregado como: cremas, shampoo y pomadas; que contienen elementos derivados de la colmena (polen, propóleos, cera, jalea real).

Desde el 2015, la producción promedio de miel es de 10,2 kilogramos por colmena al año, no obstante, con la estrategia que desarrolla el MAGAP, (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca) se busca que el país aumente su promedio nacional a 15,2 kilogramos por colmena en el año. De la misma manera, en un estudio del Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola (FIDA), elaborado en el 2015, se indica que Ecuador consume 601 toneladas por año, pero, apenas produce 200 toneladas. Debido a esto, según datos del Banco Central del Ecuador (BCE), entre el año 2000 y 2011 se

importaron 1.615 toneladas métricas de miel, con precios que oscilaron entre \$ 4.500 y \$ 5.030 por tonelada.

A nivel mundial existen grandes investigaciones sobre las múltiples propiedades de los activos procedentes de la colmena. La apicosmética aprovecha cada fase de la producción de la miel para fabricar productos de belleza para: la hidratación, rejuvenecimiento de la piel facial y la belleza de nuestro cuerpo. Así mismo emplea naturalmente elementos generados por las abejas, es decir, para productos de belleza natural, que son generosos en principios activos con el aroma natural de la miel, la cera y los propóleos que por sus propiedades antifúngica, antimicótica, antibacteriana, antiinflamatoria, analgésica y cicatrizante que se utiliza en el tratamiento de algunos hongos y alivio de la psoriasis. Cabe recalcar, que por su poder antioxidante se utiliza como ingrediente cosmético así como purificante.

Es necesario recalcar que, Ecuador es un país considerado en vías de desarrollo, por lo que no cuenta investigaciones claras referentes a la expansión de la apicultura, mucho menos estudios referentes a los productos que se derivan de ella. Sin embargo, los estudios que existen son más bien en relación a la medicina naturista sin profundizar en la parte química misma de cada uno de ellos.

1.3. Justificación

El mercado mundial de los preservantes y antioxidantes cosméticos ha experimentado un importante vuelco hacia los productos naturales. De esta manera, en los últimos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de antioxidantes naturales, generalmente constituidos por mezclas de compuestos con elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica y en esta incesante búsqueda, el propóleo se ha constituido en una fuente inagotable de exploración, siendo uno de los recursos potenciales de dichos compuestos. Además, se ha demostrado que los extractos tienen grandes propiedades tales como antivirales, antiinflamatorias y antiparasitarias. Pues, de acuerdo con las recientes investigaciones de Daraban y Olah (2015), se encuentra que son fuentes de sustancias con estructuras novedosas y diferentes actividades biológicas. El análisis químico del propóleo muestra la presencia de: resinas, ceras, aceite esencial, aminoácidos, vitaminas, sales minerales, polen e impurezas sólidas.

De acuerdo a Veloz (2015), el propóleo producido en América representa una importante fuente de diversos compuestos bioactivos, benzofenonas, terpenos, flavonoides, lignanos, entre otros. Así mismo, Alday (2016) considera que los metabolitos secundarios se biosintetizan por diferentes plantas presentes en diversas regiones ecológicas en todo el continente. Pues, poseen particularidades en su

composición, de acuerdo a las zonas templadas y tropicales, lo que resulta en una gran diversidad de propóleos.

Cabe recalcar que, nuestro país tiene una gran biodiversidad; con flora variada de acuerdo con la región y el clima, por lo tanto, la composición química del propóleos es variable y compleja, dependiendo del lugar de asentamiento de la colmena. Así, sus características morfológicas varían atendiendo a las condiciones que la rodean. Por ello, su color puede variar fácilmente desde el verde, verde-castaño, marrón, amarillento hasta el negro.

Por lo anterior, es necesario mencionar que la investigación sobre estos productos es escasa en nuestro país y no es actual, entonces, el presente trabajo está orientado a dar alternativas para el desarrollo de nuevos productos naturales con alto contenido de antioxidantes que pueden generar ingresos para nuestra zona, y por ende repercutirá en la industria cosmética como en la calidad de vida de los apicultores que son los principales productores. Los trabajos realizados en otros países han demostrado que el propóleos tiene un factor antioxidante muy por encima de los conocidos.

Es, por lo tanto, necesario realizar el análisis y valoración de la composición química y actividad antioxidante del propóleos de la zona sur del país, con el fin de valorar sus propiedades con miras a utilizarlo en la industria cosmética.

1.4. Objetivo general

Establecer la relación existente entre la capacidad antioxidante y la composición química de varios extractos de propóleos para su aplicación en la industria cosmética.

1.5. Objetivos específicos

- Determinar los rendimientos de los extractos de propóleos que son extraídos a través de percolación estableciendo que la procedencia influye en su rendimiento.
- Realizar estudios químicos basados en cromatografía de los extractos de propóleos objeto de este estudio determinando los componentes presentes.
- Comparar la capacidad antioxidante de los extractos de propóleos recolectados, a través de la técnica de DPPH. (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl)

- Correlacionar la composición química de las muestras de propóleos con su capacidad antioxidante ensayada a través de una regresión buscando la relación entre los componentes activos presentes.

1.6. Hipótesis

Establecer la relación existente entre la capacidad antioxidante y la composición química de varios extractos de propóleos para su aplicación en la industria cosmética.

CAPÍTULO 2

MARCO-TEÓRICO

2.1. Estado del arte

La presente investigación surge como una respuesta a la necesidad de evaluar la capacidad antioxidante de propóleos ecuatorianos y la relación con su composición química. De tal manera que, estos propóleos puedan ser utilizados como un ingrediente natural en la industria cosmética, tomando en cuenta sus ventajas químicas y biológicas así como su origen natural. Además, se pretende impulsar la microempresa apícola y el cambio de la matriz productiva, empleando éstos propóleos caracterizados y no productos importados de origen sintético. Es necesario recalcar que, existen muchos estudios sobre las diferentes propiedades del propóleos llevadas a cabo en diferentes países como: Cuba, Brasil, Colombia, Argentina, Rusia, Rumania, Chile, Perú, etc., países que han logrado caracterizar químicamente sus propóleos y darles diferentes usos sobre todo en la industria farmacéutica y cosmética como ingredientes antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, entre otros, siendo este hecho un motivo adicional para emprender la presente investigación. Igualmente, se ha considerado a Penning, A. (2013) ya que, menciona la contribución importante de un ingrediente natural “verde” en la elaboración de cosméticos, pues, en la actualidad esta característica significa un plus para la industria y consumidores con consciencia ambiental, así lo demuestra el creciente mercado de productos cosméticos con ingredientes naturales.

Es importante mencionar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente un 80% de los habitantes a nivel mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud. De igual manera, a Castillo Espinoza, J. C. (2014) quien da a conocer su punto de vista en cuanto al efecto vasodilatador de planta y propóleos en referencia a lo anterior.

De esta manera, se espera un incremento en la demanda de \$7600 millones pertenecientes al año 2012 a 13.200 millones que podrían resultar en el 2018. Pues, con base en investigaciones de mercado cosmético se conoce que los tres segmentos principales de este son los productos para el cuidado de: la piel y el cabello; así como, los productos de higiene bucal. Entonces, el propóleos con su potencial actividad antioxidante y antiséptica sería un gran aporte como un ingrediente importante en estos segmentos de productos del mercado cosmético nacional.

Actualmente, es posible encontrar desde alimentos como dulces hasta productos de limpieza como jabones que contienen propóleos. Sin embargo, también se ha identificado, otra clase de productos que se desarrollan a base del propóleos, como son los protectores solares tópicos, de acuerdo a investigaciones; las cuales han demostrado la acción fotoprotectora de los metabolitos secundarios de las plantas; sobre todo los flavonoides. Muchos estudiosos han considerado que la clave para la protección es la concentración de electrones deslocalizados en los anillos bencénicos de las estructuras químicas de esas sustancias, lo que facilita el traslado de energía; citando a Valadao, A. F. Reis, De Lima, y Moreira. (2009).

2.2. Enfoque teórico

2.2.1. El propóleos

Considerando el aporte investigativo de Ramos y Miranda (2007); se conoce que propóleos etimológicamente proviene del griego pro que significa defensa (delante) y polis que significa ciudad, por lo tanto el propóleos protege a la colmena de las condiciones físicas externas y de los microorganismos e insectos invasores. Peña, (2008) ha contribuido con lo siguiente, en cuanto al propóleos con número CAS (Chemical Abstracts Service registry number) 9000-62-5, dando a conocer que es una resina de composición compleja, elaborada por las abejas melíferas, *Apis mellifera* y con diversas características físicas y organolépticas.

Cabe resaltar el aporte de López (2015), quien encontró en su estudio referente a la actividad antimicrobiana y antioxidante del propóleos; que además de ser un material pegajoso, gomoso, resinoso, de color variable marrón verdoso, marrón oscuro, verde oscuro, amarillo verdoso, castaño, rojizo e incluso negro dependiendo de su origen. De igual forma, tiene un aroma placentero, a yemas de especies arbóreas, miel, ceras y vainilla, no obstante también, puede tener sabor amargo. Este solo se obtiene de la recolección de las exudaciones o secreciones de origen vegetal (yemas, corteza, ramas, frutos jóvenes, etc.) realizada por la abeja (*Apis mellifera*). Y de acuerdo con el mismo autor, estas exudaciones se mezclan con otros agentes como polen y enzimas dando lugar a una modificación física y química; posteriormente el producto es transportado al interior de la colmena.

Ahondando en el mismo aspecto del propóleos, se toma de referente a Sohaimy y Masry (2014); quienes reconocen que las abejas lo obtienen de exudados y brotes de las plantas del alrededor de la colmena y lo mezclan con sus secreciones y cera. Dándose todo este proceso, generalmente a temperatura ambiente; resultando pegajoso, duro y quebradizo a bajas temperaturas, así mismo su color puede variar de pardo oscuro a

pardo claro, o bien pueden ser rojos, amarillos y verdes, de consistencia friable y dura, también gomosa y elástica.

Para la presente investigación es necesario hacer referencia a un estudio de relevante importancia, como lo es el de los propóleos rojos cubanos de Fernández, Rubio y Pérez (2012), quienes explican que “Las abejas aplican el propóleo en capas finas en las paredes internas de la colmena o en otra cavidad interna. Este es usado para bloquear agujeros y grietas, para reparar y fortalecer los bordes del panal y para proteger la entrada de la colmena”. Es importante también mencionar que ha sido usado como sustancia embalsamadora, para cubrir a los invasores de la colmena que las abejas han matado y que no pueden transportar fuera de la misma. Y finalmente explican que “las abejas utilizan las propiedades químicas y biológicas del propóleo, evitando la putrefacción de los habitantes extraños a la colmena y también de esta manera evita la incidencia de bacterias y hongos”.

Como es de gran importancia para esta investigación se ha recurrido nuevamente a Daraban, Olah y Campean (2015) y estudiosos que hacen referencia a la característica de antibiótico que tiene el propóleo, pues, es además, muy poderoso, debido a la presencia de polifenoles. Sin olvidar que el aceite esencial le imparte propiedades como antimicrobiano, antifúngico, antitumoral, antiinflamatorio, hepatoprotector, antidiabético, cardioprotector, antiangiogénico y propiedades inmunomoduladoras.

Además, los estudiosos han logrado comprobar que el propóleo contiene compuestos que regeneran los tejidos dañados, mejoran la función del hígado y páncreas, gracias a la presencia de propiedades epitelizantes, anti-edematoso, efectos radioprotectores y antiasmáticos. El propóleo brasileño es apreciado en todo el mundo, desde 2010 a 2012 el precio de un kilogramo de propóleo brasileño crudo Aumentó más del 50% en el mercado internacional; según Schmidt, Stock, Chada, Finger, y Torres, (2014).

En cuanto a las propiedades mencionadas; la revista de química de la Universidad Pablo de Olavide de España (2012) da a conocer que el ser humano ya conocía las propiedades de esta maravillosa sustancia desde tiempos remotos. Pues, se ha reconocido de acuerdo a las respectivas investigaciones que en el Antiguo Egipto los sacerdotes lo utilizaban como parte integrante de los ungüentos y cremas de embalsamar; más tarde lo utilizaron los griegos, a quienes debemos el nombre de “propólís”, que como ya se mencionó, esta palabra que hace referencia a la protección de la ciudad (“pro”: delante de; y “propólís”: ciudad). Igualmente, Aristóteles hace referencia a esta sustancia llamándola “remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones”. Esto, incluso aparece citado en el Corán y se tiene constancia de que los incas lo utilizaban para tratar enfermedades febriles.

2.2.2. Composición química del propóleo

En cuanto a la composición química del propóleo, se ha podido verificar, gracias a la colaboración de Jain, Marchioro, Batista y Araujo (2014), que depende de las diferentes regiones geográficas o de estaciones del año debido al cambio en la vegetación. Las propiedades medicinales y biológicas de un tipo particular de propóleo dependen de su composición química, que a su vez depende del componente químico de la resina recogida por las abejas. Por lo que cabe mencionar el siguiente análisis:

Un análisis primario de cualquier muestra de propóleo permitirá determinar, en líneas generales, la presencia de cera, íntimamente mezclada en proporciones de entre 20-30 %. Ciertas muestras obtenidas por raspado de cuadros presentan cantidades de cera algo superiores, entre 25-35%, la presencia de resinas y bálsamos aromáticos constituye del 40 al 55%, la presencia de aceites esenciales es entre el 5 y el 10%, el polen representa entre el 4 y 5% del peso de una muestra y por último las sustancias orgánicas y minerales constituyen un 5 % (Del Cueto, 1994); (Campos, 1987; Asís, 1989 (citado por Chaillou, 2005)). También se identificaron aminoácidos, ácidos alifáticos y sus ésteres, ácidos aromáticos y sus ésteres, alcoholes, aldehídos, flavonoides, agliconas, hidrocarburos, cetonas, terpenos y vitaminas. Lopez, (2015).

Citando a Bankova, Christov, Kujumgiev, Marcucci, y Popov (1995); pues, se ha considerado de alta importancia su aporte al dar a conocer que: “De las más de 300 sustancias en el propóleo, tres grupos químicos merecen la prominencia debido a las actividades biológicas que ejercen: los flavonoides, derivados de ácido cinámico y terpenos. Los flavonoides han sido considerados los principales compuestos biológicos activos del propóleo”. Completando lo anterior con Salamanca, Carvajal, y Principal (2007), quienes resaltan que los polifenoles de origen botánico que han sido usados como los marcadores de la calidad del propóleo. De la misma forma, Valadao, Reis, Lima, y Moreira (2009), consideran que estos son producidos en las plantas y poseen la función de atracción para los polinizadores, pues varían de colores como del amarillo al rojo de pétalos de flores.

Daraban (2015) en su estudio recalca que el propóleo europeo, chino y argentino se caracteriza por la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides, siendo el más abundante Crisina (2-4%). Contribuyendo, de la misma forma, Schmidt, Stock, Chada, Finger, y Torres (2014) habla de que los flavonoides y los ácidos fenólicos o sus ésteres suelen formar hasta el 50% de todos los constituyentes de propóleo. Sin olvidar que, los principales componentes bioactivos de los propóleos son los compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos Ramnath, Venkataramgowda, y Singh (2015).

2.2.2.1. Flavonoides

Los flavonoides, junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres, genéricamente denominados “compuestos fenólicos”, son actualmente considerados los principales componentes bioactivos del propóleo. Cabe mencionar que, ambos absorben radiación en la región UV del espectro electromagnético protegiendo de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles. Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo, como el ácido cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico, comunes en los vegetales y en el propóleo.

Los flavonoides son productos de gran importancia para este proyecto por lo que es necesario citar a Angulo Vaca quien hace referencia a estos como:

“Productos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Esta pudiera ser una de las razones que justifica su abundancia en propóleos fundamentalmente de zonas templadas, aunque no son exclusivos de esta localización. Los flavonoides, pertenecientes al grupo de los polifenoles, son fitonutrientes presentes en diversas plantas que constituyen una parte integrante de la alimentación humana. Poseen características antioxidantes, propiedades quelantes y están asociados a la prevención de patologías crónicas y enfermedades relacionadas con la edad. La actividad más conocida de los flavonoides es su protección contra el estrés oxidativo. Los flavonoides pueden eliminar los radicales peroxilo, ser eficaces inhibidores de la peroxidación lipídica y ser quelantes de los metales redox-activos, evitando la ruptura catalítica del peróxido de hidrógeno. Angulo Vaca, J. B. (2014).

Los flavonoides, de acuerdo con Robbers (1996) presentan un esqueleto carbonado C6-C3-C6, donde los grupos C6 se corresponden con agrupamientos bencénicos y la porción C3 se presenta formando parte de un heterociclo generalmente. Y nuevamente haciendo referencia al estudio de los propóleos rojos de Fernández, Rubio y Pérez (2012) se considera que las diferentes categorías estructurales se observan en la figura 1, siendo más abundantes las correspondientes a flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas e isoflavonas. Y de acuerdo Robbers, (1996) en algunos casos el anillo heterocíclico de seis miembros no se presenta y en su lugar se aprecia una cadena abierta (chalconas).

Cabe recalcar que, estos compuestos tienen importantes propiedades antioxidantes, ya que, minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, según el estudio de Bedascarrasbure, Maldonado, Álvarez, Rodríguez (2004).

De la misma forma, Edreva y Kostoff (2005) mencionan que la concentración de los flavonoides en las plantas varía de acuerdo con la estación en que fue producido, así como con la vegetación, clima y relieve en los cuales están los colmenares y de qué partes de las plantas las abejas (*Apis mellifera*) recolectaron el propóleo.

2.2.2.2. Ácidos fenólicos

En cuanto a los ácidos fenólicos, Jorge Ringuelet (2013) señala que las funciones biológicas de los compuestos fenólicos vegetales son muchas y muy variadas, entendiendo desde sustancias odoríferas y pigmentos que atraen a los agentes polinizadores, venenos y disuasorios alimentarios (algunos son tóxicos para mamíferos e insectos), compuestos alelopáticos, componentes estructurales y agentes antifúngicos y antimicrobianos. Así, varios fenólicos cumplen funciones específicas para la planta, como inhibidores de la germinación, protectores contra la radiación ultravioleta (UV), moléculas de señalización, entre otros roles.

Así mismo, Bedascarrasbure, Maldonado, Álvarez, y Rodríguez, (2004) indican que: “Los ácidos fenólicos como el cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico, son comunes en los vegetales y en el propóleos. Dicha composición les proporciona propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales”. Y en cuanto, a los ácidos fenólicos, CAPE, cafeico, p-cumárico y ferúlico se encuentran en todas las muestras analizadas de propóleos chilenos, los ácidos clorogénico y gálico dependen del año de recolección de la muestra según Veloz, Saavedra, Lillo, Alvear, Barrientos, Salazar (2015).

Así, los compuestos fenólicos naturales son:

- Ácido cafeico.
- Ácido cinámico.
- Ácido p-cumárico.
- Ácido ferúlico.
- Éster fenetílico del ácido cafeico. (CAPE)

Ácidos fenólicos

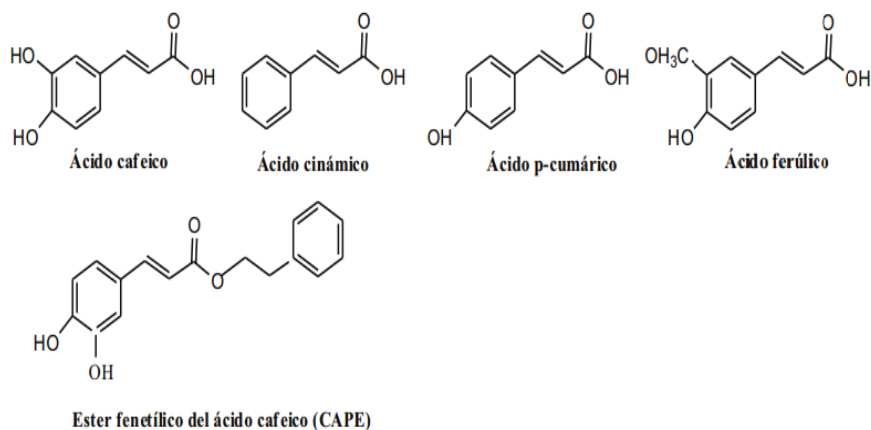
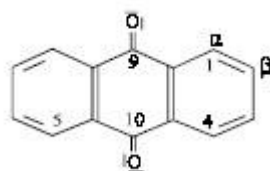


Figura 1. Ácidos fenólicos más frecuentes

Fuente. Vargas-Sánchez, Torrescano-Urrutia, Mendoza-Wilson, Vallejo-Galland, Acedo, Sánchez y Sánchez-Escalante (2014). Mecanismos Involucrados en la Actividad Antioxidante y Antibacteriana del Propóleo. (Págs. 32-37).

2.2.2.3. Antraquinonas



Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de las quinonas naturales, son compuestos aromáticos polihidroxilados metilados y suelen tener sustituyentes en C2 y C3 formando grupos más complejos, pudiendo ser esta estructura, la responsable de la acción antioxidante, observada en las muestras estudiadas.

2.3. Radicales libres

En referencia a los radicales libres, se habla de las reacciones oxido-reductoras, pues, constituyen una parte esencial del metabolismo aeróbico en los organismos vivos y ocurren principalmente entre moléculas orgánicas. Así, se cita a Vargas, Torrescano, Mendoza, Vallejo, Acedo, Sánchez, (2014) quienes mencionan que:

“Durante el desarrollo de este tipo de reacciones en sistemas biológicos normales, como la producción de energía, fagocitosis, regulación del crecimiento celular, señalización intercelular y síntesis de compuestos biológicos importantes como el ATP (Adenosin Trifosfato), es común que se formen sustancias reactivas al oxígeno (ROS) a manera de intermediarios: oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, el organismo puede sufrir ciertos desequilibrios que conducen a la formación de ROS con actividad de radicales libres por la transferencia de electrones desapareados, atacando los lípidos de las membranas celulares, modificando proteínas estructurales, así como carbohidratos y ADN”.

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos.

En cuanto a los radicales libres, Avello y Suwalsky (2006) en su estudio de la última década, consideran que se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático. Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para la salud, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Para, una correcta descripción de este tema se cita a Martínez, y otros estudiosos quienes explican que:

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera, bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina- butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de

los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro. Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir in vitro la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares. Martínez, González, Culebras, y Tuñón (2002)

Cabe recalcar que cuando el aumento del contenido intracelular de ERO (Especies reactivas de oxígeno) sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Es decir, que el estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Gutteridge y Halliwell, 1999).

Como es de conocimiento, sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación. Martínez, González, Culebras, y Tuñón, (2002). Así mismo, La alta actividad antioxidante del propóleo hace que sea un buen antioxidante natural que se puede utilizar como conservante natural y / o aditivos de alimentos para ayudar a protegerlos contra el deterioro de acuerdo con los estudios que han realizado Stoia, Cotinghiu, Budin, y Oancea, (2015).

2.4. Actividad antioxidante

Como ya se ha comentado con anterioridad, la composición química del propóleo es muy compleja y depende de la flora en el área donde es recolectado (Salamanca et al., 2000), esta composición también depende de fenómenos locales, vinculados con la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, insolación y la evapotranspiración. En ese sentido, es necesario considerar la similitud en algunos componentes básicos de algunos vegetales, cuyas características particulares vendrán dadas por las diversas combinaciones de los elementos que las constituyen. (Osorio y Salamanca, 2002).

De esta manera, los flavonoides y ácidos fenólicos son considerados los principales compuestos bio-activos del propóleo. Los más comunes en las plantas y en el propóleo son: apigenina, kaaempferol, pinocembrina, galangina, quercetina y hesperidina. Dichos compuestos poseen importantes propiedades antioxidantes, que reducen el riesgo de afecciones cardiovasculares (Hertog et al., 1993) y el envejecimiento en humanos. También se ha encontrado un significativo número de diferentes azúcares,

hidrocarburos y monoésteres (Bankova et al., 1998, Negri et al., 1998). Los compuestos fenólicos constituyen más del 50 % del peso total del propóleo. La literatura existente señala que la actividad principal es debida a los flavonoides, cerca de 4000 sustancias diferentes han sido registradas (Menezes, 2005), por eso la relación flavonoides-efecto biológico de los propóleos revela el interés de cuantificar estos constituyentes (Bruschi et al., 2003).

Así, de acuerdo con varios investigadores se considera que el propóleo por sus propiedades físico-químicas es un antioxidante que arrastra radicales libres (Banskota et al., 2000; Banskota et al., 2001; Merino et al., 1996; Paulino et al., 2001; Peña, 2008). Kumazawa et al., (2004) determinaron que los propóleos procedentes de Argentina, Australia, Brasil, Bulgaria, Chile, China (Hebei, Hubei, and Zhejiang), Hungría, Nueva Zelanda, Sud África, Tailandia, Ucrania, Uruguay, Estados Unidos y Uzbekistán se caracterizaban por presentar una alta actividad antioxidante. Se menciona también que el radical DPPH ha sido ampliamente utilizado para evaluar la captura de radicales libres.

Tabla 1. Mecanismos Antioxidantes

Compuesto	Actividad antioxidante	Referencias
Apigenina y Naringenina Kaempferol y Quercetina	Hidroxilación en los grupos 5, 7 y 4', presentan propiedades antiradi-cales, hidroxilación en carbono 3, presenta mayor actividad que en los sustituyentes 5,7 y 4' hidroxilación.	Das y Poereira, 1990
ácidos cafeico y ferúlico	La presencia de grupos -CH=CH-COOH en ambos compuestos, pueden ser responsables de la actividad antioxidante. La presencia de grupos donadores de electrones en el anillo de benceno (3-metoxi y en mayor importancia 4-hidroxil), inhibe la formación de radicales libres; el grupo carboxilo con una insaturación adyacente (C-C), provee un sitio para ataque de radicales y posee cierta protección contra la per-oxidación lipídica.	Kumar-Maurya D, y Asir-Devasagayam TP, 2010; Ergun et al., 2011; Kanaski et al., 2002

Fuente: Vargas, Torrescano, Mendoza, Vallejo, Acedo, Sánchez Escalante, (2014). Mecanismos Involucrados en la Actividad Antioxidante y Antibacteriana del Propóleo. (Págs. 32-37).

2.5. Plantas apícolas

Estas, son plantas visitadas por abejas para obtener polen, resinas o néctar, con lo que producen miel o propóleos. Torre recalca que esta categoría se ha separado de “alimento de invertebrados” por la importancia que tiene la apicultura en países en desarrollo, como el Ecuador. Pues, la actividad apícola comercial se inició en 1870, con las primeras colmenas de la abeja mielera europea (*Apis mellifera* var. *Lingüística*) traídas por religiosos desde Francia hacia Cuenca, y desde este lugar se distribuyó a otras ciudades del país. Torre, (2008).

En cuanto a datos porcentuales se considera que; a nivel mundial, las principales familias nectaríferas y poliníferas son: Fabaceae, Lamiaceae, Brassicaceae, Poaceae y Asteraceae. De acuerdo con Carpio y Barragán quienes indican que las plantas de estas familias tienen plena aceptación por parte de las abejas por la notable cantidad de néctar y su elevada concentración de azúcares, que está por encima del 50% (Philippe 1990). Las Poaceae proveen gran cantidad de polen. En nuestro país existen muy pocos trabajos sobre plantas melíferas. En la zona de la Argelia de la provincia de Loja se reportan 59 especies (Camacho 2000) y en la microcuenca del río Uchima en la misma provincia se identificaron 27 especies de árboles y arbustos con potencialidad apícola. Carpio y Barragán (2008).

De esta manera es imprescindible destacar las siguientes especies; ya que, cuentan con mayor número de registros con uso apícola.

Tabla 2. Especies apícolas más frecuentes.

Familia	Especie	Número de registros
Fabaceae	<i>Acacia macracantha</i>	5
Solanaceae	<i>Acnistus arborescens</i>	5
Asteraceae	<i>Baccharis latifolia</i>	5
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	4
Polemoniaceae	<i>Cantua quercifolia</i>	4
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	4
Lythraceae	<i>Cuphea ciliata</i>	4
Asteraceae	<i>Liabum eggersii</i>	4
Anacardiaceae	<i>Mauria heterophylla</i>	4
Asteraceae	<i>Verbesina</i> sp.	4
Asteraceae	<i>Vernonanthura patens</i>	4

Fuente: Carpio y Barragán (2008), *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito- Ecuador.

Como se observó, además, se reconoce que en el catálogo de Carpio y Barragán se reportan 197 especies de plantas con uso apícola, la mayoría de ellas nativas, lo que representa un gran potencial que podría contribuir a que el uso tradicional de pocas especies muy bien conocidas por los apicultores por su gran valor melífero, y en su

mayoría introducidas, como el eucalipto (*Eucalyptus* sp.), la alfalfa (*Medicago sativa*), el trébol (*Trifolium* sp.) y los cítricos (*Citrus reticulata*, *C. máxima*), se amplíe a una mayor diversidad de especies que incluya sobre todo plantas autóctonas.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Recolección de muestras

De acuerdo, a los resultados obtenidos en el estudio de López, Martí, Subovsky, y Castillo. (2016), se encontró que son relevantes tres métodos de recolección de propóleos versus su rendimiento se concluye que el método de recolección de los propóleos no influye en el rendimiento. De esta manera, es necesario que las muestras que se recolectaron por el método más sencillo y tradicional, el cual consiste en el raspado de los marcos de madera de la colmena con la ayuda de una espátula metálica, sirvan de base para otros métodos que se relacionan con la recolección utilizando mallas mosquiteras y utilizando cuñas separadoras.

Las muestras de propóleos objeto de estudio se identificaron como PE-14; PE-17 y PE-19. Los datos de cada una de ellas se resumen en la tabla 3. Los propóleos estudiados fueron producidos por abejas de la especie *Apis mellifera*.

Tabla 3: Datos de las muestras de propóleos colectadas.

Muestra	Apicultor	Fecha de recolección	Localización
PE 14	Diana Palomino	octubre/16	Sayausí
PE 17	Naúm Zumba	noviembre/16	Gualaceo
PE 19	Naúm Zumba	noviembre/16	Chiquintad

Fuente: Autores

3.2. Preparación del extracto

Las muestras PE-14 (27,6129 g), PE-17 (48,1568 g) y PE-19 (45,8105 g), se sometieron a un proceso de maceración en un erlenmeyer, utilizando como disolvente metanol absoluto (Sigma Aldrich,) cantidad suficiente para sumergir completamente las muestras. El proceso se realizó durante siete días con recambio de disolvente al tercer y quinto día. Los extractos metanólicos se filtraron con algodón desengrasado, se reunieron y se concentraron a sequedad en un rotaevaporador Büchi a 40°C a presión reducida. Los extractos secos de propóleos se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar conservándose a 6 – 8°C hasta sus análisis.

3.2.1. Resultados y discusión del rendimiento de los extractos de propóleos

Los rendimientos obtenidos en el proceso de extracción de las muestras de propóleos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. *Rendimiento de extractos de propóleos.*

MUESTRAS	PESO DEL PROPÓLEOS CRUDO (g)	PESO DEL EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO %
PE-14	27,6129	10,7904	39.08
PE-17	48,1568	20,5562	42,69
PE-19	45,8105	17,4006	37.98

Fuente: autores

Como se constata los rendimientos oscilaron entre 37 y 42 %. Esta variabilidad obedece a la propia naturaleza de los propóleos, los cuales resultan de una mezcla mecánica que realiza la abeja. También está condicionado por la disponibilidad de las resinas vegetales a las que tenga acceso el insecto, la cantidad de ceras que le incorpore al propóleos y el tipo de disolvente utilizado. Los resultados por tanto son lógicos. Otros autores también han informado variabilidades similares argumentando las razones anteriormente expuestas. Por ejemplo en propóleos colombianos se obtuvieron rendimientos entre 2,72 a 9,17%; en propóleos marrones brasileños entre 2,6 y 27,6%, en propóleos chilenos alrededor de 18,6%; en los casos de Nueva Zelanda y Bélgica 13,2 y 21,1% respectivamente. En propóleos cubanos Cuesta y col. (2001) compararon los rendimientos de 21 muestras de propóleos y pudieron constatar también la diferencia de rendimiento, inclusive en muestras de propóleos provenientes de una misma provincia y con igual componente mayoritario.

Con vistas a agotar la muestra y minimizar los efectos de la selectividad del disolvente con respecto a la polaridad de los compuestos, el proceso de extracción se

desarrolló recambiando tres veces el disolvente durante los siete días. Este factor también puede influir en la variabilidad de los rendimientos que se obtienen para propóleos.

3.3. Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)

La CCD se desarrolló utilizando placas de Sílica gel GF254 (0,20 mm) con dimensiones de 5 x 10 cm. Estas se encontraban sobre soporte de aluminio. Las muestras se aplicaron con el uso de capilares de vidrio, dejando secar al ambiente las aplicaciones.

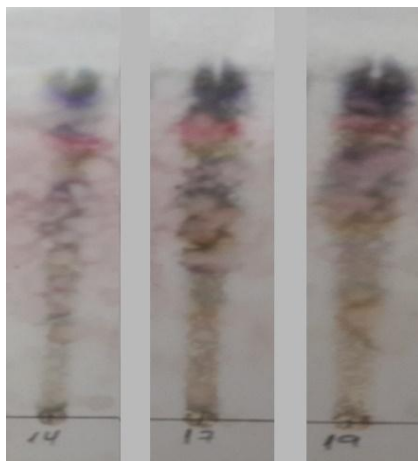
Se utilizó una cámara cromatográfica de vidrio de 21,5 cm de altura y de 23 cm x 6 cm el área de la base. La corrida cromatográfica se realizó bajo una cámara extractora de gases en el laboratorio y se trabajó a temperatura ambiente (25-29°C). El tiempo de saturación de la cámara fue de 15 minutos.

La fase móvil utilizada en las corridas cromatográficas fue una mezcla de cloroformo: metanol en proporciones 9:1. Todos los disolventes fueron químicamente puros. Después de la corrida, el secado de la placa se efectuó a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana.

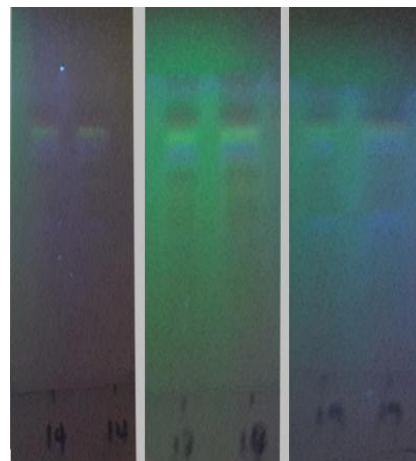
Se realizaron dos tipos de revelado, físico y químico. El revelado físico se desarrolló al someter la placa bajo la luz ultravioleta, a longitudes de onda de 254nm y 365nm. El revelado químico se llevó a cabo con vainillina, ácido sulfúrico y calor; y disolución al 0, 2% en metanol del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Para el primer revelador, después de rociar la placa con la ayuda de un nebulizador se calentó la misma en una a una plancha de calentamiento a una temperatura entre 105 y 110°C de 3 a 5 minutos, hasta que se modificó la apariencia de la misma. En el caso del DPPH, una vez rociada la placa, se observó la modificación del color de la misma, en tiempo cero y a los treinta minutos posteriores a la nebulización con el reactivo.

3.3.1. Resultados y discusión

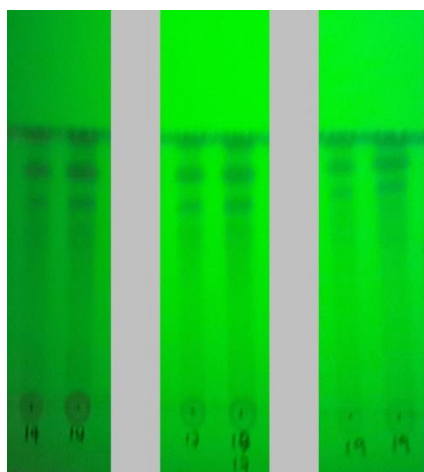
Análisis por cromatografía en capa delgada



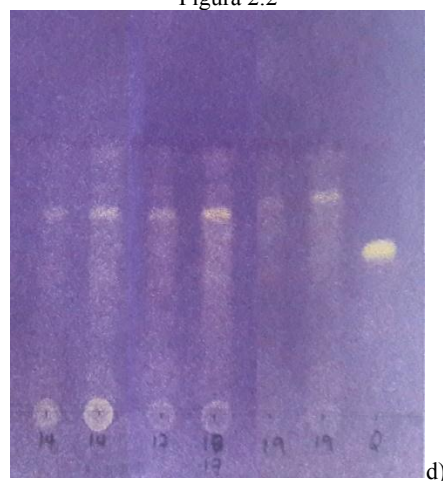
a) FM: cloroformo: metanol (9:1)
Revelado con vainillina al 1% en medio ácido
De izquierda a derecha: muestra 14, 17 y 19
Figura 2.1



b) FM: cloroformo: metanol (9:1)
Revelado con luz UV a 365 nm
De izquierda a derecha: muestra 14, 17 y 19
Figura 2.2



c) FM: cloroformo: metanol. 9:1
Revelado con luz UV a 254 nm
De izquierda a derecha: muestra 14, 17 y 19
Figura 2.3



FM: cloroformo: metanol. 9:1
Revelado con disolución de DPPH (30 minutos después de la exposición)
De izquierda a derecha: muestra 14, 17 y 19; Q: quercetina
Figura 2.4

Figura 2. Análisis cromatográfico por CCD de los extractos de las muestras de propóleos. Fuente: autores.

Las tres muestras de propóleos objeto de estudio fueron analizadas por CCD con el objetivo de establecer una comparación preliminar entre ellas. La combinación de diferentes reveladores permite inferir información general sobre los compuestos químicos presentes en dichas muestras.

Los cromatogramas obtenidos para las muestras, utilizando como fase móvil cloroformo: metanol (9:1) y diferentes reveladores, se muestran en la figura 2.

Como se observa, las tres muestras objeto de estudio, presentaron un comportamiento similar en cuanto a la existencia de componentes de polaridad diversa cuando se revela con vainillina al 1% en medio ácido (Figura 2a). Esta aseveración se sustenta en la existencia de manchas desde el punto de aplicación hasta el frente del disolvente. También se evidencia similitud entre ellas al analizar las coloraciones tomadas frente a este revelador, que sugiere la presencia de compuestos de naturaleza fenólica (coloraciones rojizas) y de naturaleza triterpénica (coloraciones violáceas oscuras que alcanzan el frente del disolvente) en las tres. Los resultados en cuanto a la definición de las manchas no fueron buenos, ya que no se aprecia resolución entre ellas. Este comportamiento se puede justificar teniendo en cuenta que el revelador empleado es de carácter general y el hecho que los propóleos generalmente están constituidos por mezclas complejas y variadas de compuestos químicos.

Tabla 5: *Relación entre el color observado y la posible estructura de los compuestos químicos. (Wagner & Bladt, 1996)*

Color	Metabolito sugerido
Amarillo fluorescente intenso	Antronas y antranoles
Naranja, verde y azul	Glicósidos de flavonoides
Azul intenso, azul verdoso	Cumarinas
Azul	Ácidos fenólicos (ejemplo caféico)
Amarillo anaranjado, amarillo verdoso	Flavonoles
Naranja, amarillo verdoso	Flavonas

Fuente: (Wagner & Bladt, 1996)

Los cromatogramas obtenidos revelando bajo luz UV (365 nm y 254 nm), demostraron la existencia de compuestos químicos con valores de R_f de medios a altos, que deben poseer en su estructura cromóforos conjugados (Figura 2.b). El comportamiento de estas muestras bajo luz UV 365 nm resultó muy interesante sobre todo por la presencia de manchas de color café, amarillo y azul. (Figura 2.c) La literatura (Wagner & Bladt, 1996) sugiere posibles relaciones entre el color observado y la estructura de los compuestos analizados (Tabla 5)

La presencia de muchas de las familias de compuestos orgánicos resumidas en la Tabla 5, ha sido ampliamente sustentada a nivel internacional para los propóleos. Los ácidos fenólicos y flavonoides son constituyentes frecuentes en muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos. En propóleos de zonas templadas, en particular del continente europeo, se ha reportado la presencia de ácidos orgánicos y sus ésteres entre los que se incluyen: ácido cafeico y su fenetil éster (Marcucci, 1995; de Groot, 2013; Elnager et al., 2017). Asimismo, los propóleos verdes de Brasil son ricos en artepillicina C, un derivado prenilado del ácido cafeico (Veiga et al., 2017; Nishikawa et al., 2016). Un gran número de flavonoides, fundamentalmente flavanonas, flavonas y flavonoles, se han identificado como constituyentes de propóleos de diversos orígenes geográficos (de Groot, 2013; Alaribe et al., 2016; Segueni et al., 2016). Además, la presencia de antraquinonas también ha sido establecida en algunas muestras de propóleos (Wali et al., 2017; Soltani et al., 2017). Tomando esta información como punto de partida, se podría sugerir la presencia de estos metabolitos en las tres muestras objeto de estudio.

Los resultados obtenidos al revelar con disolución de DPPH, (Figura 2.4) evidencian la existencia de componentes con capacidad secuestradora de radicales libres en las muestras objeto de estudio. En este caso se constata que los mismos corresponden tanto con manchas de bajos como de altos valores de R_f, incluyendo compuestos que se mantuvieron en el punto de aplicación. La similitud del comportamiento cromatográfico observado con los reveladores anteriores se repite en estas condiciones para las tres muestras. A través de este ensayo, además, se podría aseverar que la quercetina no se encuentra presente en ninguna de las muestras que se estudian ya que no se aprecia coincidencia entre el R_f de este compuesto y alguna mancha correspondiente a las muestras estudiadas.

La actividad de muestras de propóleos frente al radical estable DPPH ha sido ampliamente estudiada a nivel mundial, reportándose una gran variabilidad en cuanto al poder secuestrante ante dicho radical. Las muestras de propóleos ricas en compuestos fenólicos como flavonoides y derivados de fenil propanoides parecen ser particularmente activas frente al DPPH (Oliveira et al., 2016; Talla et al., 2017; Zhang et al., 2017; Sanpa et al., 2017; Calegari et al., 2017; Ferreira et al. 2017).

El análisis combinado de los resultados obtenidos a partir de esta técnica cromatográfica permitió sugerir una composición química semejante para las tres muestras objeto de estudio. Además, indicó la posible presencia de compuestos con cromóforos conjugados como antraquinonas, cumarinas, flavonoides y ácidos fenólicos. Sin embargo, para confirmar estas suposiciones se requerirá de la implementación de técnicas que permitan identificar de forma precisa la estructura de los compuestos químicos.

Las similitudes apreciadas en los perfiles cromatográficos demuestran, a pesar de que las muestras no fueron colectadas en los mismos lugares, que su composición química parece ser similar. Esto podría ser explicado por la posibilidad que tuvo el

insecto de visitar especies botánicas iguales o similares. Al tener en cuenta que las muestras proceden de regiones cercanas, es lógico suponer el planteamiento anterior. Se conoce que la composición química del propóleo depende esencialmente de su origen botánico (de Groot, 2013; Roberto et al., 2016; Duke et al., 2017; Veiga et al., 2017). Se ha demostrado que existen similitudes entre muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos, incluyendo diferentes países. Las especies de plantas del género *Populus* son frecuentes en países de zonas templadas y en aquellos casos donde la abeja visita dichas especies, se ha confirmado la similitud incluso entre países de diferentes continentes (Greenaway et al., 1988, Greenaway et al., 1990; Popova 2017 et al., Bankova et al., 2000; Popova et al., 2017).

Todas las sugerencias realizadas deben ser confirmadas con estudios posteriores, solo deben ser consideradas como evidencias preliminares. La CCD es un método sencillo, económico y rápido que permite orientar el trabajo posterior.

Aunque no se propuso como objetivo para este trabajo de investigación, se considera importante la realización de una investigación dirigida a la identificación de la flora que rodea las colmenas productoras de los propóleos usados en este trabajo. De esta forma se podría identificar la o las especies vegetales responsables de esta composición química.

Todo lo expuesto anteriormente, despertó el interés por identificar los componentes químicos presentes en los extracto y evaluar la capacidad secuestradora de radicales libres de los mismos. Ambas determinaciones se presentan en acápites posteriores.

3.4. Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de masas

10 mg del extracto de propóleos se disolvieron en 1 ml de etanol al 90%. Se tomaron 100µL de la disolución y se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se derivatizó con 50µL de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) a 100°C por 30 minutos.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent modelo GC 6890 acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar HP 5973N. La inyección de la muestra se realizó por el modo “split” con una relación de 1:10, siendo la temperatura del inyector 280 °C. Se trabajó con una temperatura inicial de 80 °C y el cromatógrafo se programó a 60°C por 2 min, incrementándose hasta 310°C con una relación de 3°C min⁻¹, seguido de un proceso isotérmico de 20min. El volumen final de inyección fue de 1 µL. Los componentes de la muestra se fraccionaron en la columna HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 µm). El tiempo total de corrida fue de 100 min, operando por ionización electrónica

a 70 eV con un rango de masas de 35 - 700 uma. Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,8 mL/min.

Las estructuras identificadas fueron propuestas a partir de la comparación con la base de datos del equipo (NIST 98) y sobre la base del proceso de fragmentación general.

La cuantificación relativa de los compuestos se realizó por normalización interna del área bajo la curva de cada pico cromatográfico.

3.4.1. Resultados y discusión Cromatografía Gaseosa Espectrometría de masas

A partir de las sugerencias obtenidas de los estudios de CCD y la detección de posibles compuestos fenólicos, se decidió realizar un estudio de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría masas (CG-EM).

La CG-EM ha jugado un papel importante en los estudios de clasificación de propóleos. La información estructural que brinda esta técnica es superior a la obtenida por CLAR, pues con la ayuda de bases de datos se puede determinar cualitativamente la composición química de un extracto total. La separación previa que se logra a través del paso de la muestra por la columna también da la posibilidad de cuantificar los metabolitos de interés.

Este estudio se desarrolló para las tres muestras. La descripción y discusión de los resultados obtenidos se realizará primeramente para la muestra 14. Seguidamente se analizarán comparativamente con la muestra 14, las dos restantes (17 y 19). Los extractos se trataron con MSTFA para formar los trimetilsilil derivados volátiles, por lo que los compuestos con grupos hidroxilos presentaron un M^+ con 72 unidades de masa por encima de su masa molecular, por cada agrupamiento de este tipo; lo mismo sucedió con las masas de los fragmentos que los poseían.

El cromatograma de gases de la muestra 14 (Figura 3), mostró un total de 34 picos fundamentales y se realizó a cada uno de ellos, el espectro de masas por impacto electrónico.

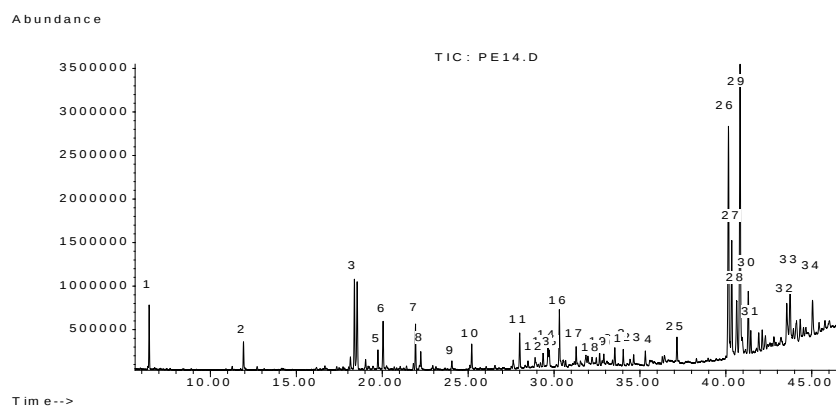


Figura 3. Cromatograma gaseoso obtenido para la muestra PE14.

Fuente: Autores

El análisis de los espectros de masas de los compuestos relacionados con los principales picos cromatográficos y las propuestas dadas a partir de la comparación con la base de datos (NIST 98), permitió proponer estructuras químicas o realizar algunas sugerencias estructurales para 20 de ellos. Estos datos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Compuestos identificados a partir del análisis por CG-EM

No.	Tr (min)	Compuestos Químicos	%
1	6,434	Glicerina	2,426
2	11,925	2,3,4-trihidroxi butanal	1,278
3	18,381	D-fructosa	4,364
4	18,539	Isómero de la D-fructosa	5,290
5	19,750	5-desoximioinositol	1,027
6	20,050	D-galactosa	2,570
7	21,935	Glucosa	2,206
8	22,244	Ácido hexadecanoico	0,932
9	24,052	Ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico)	0,563
10	25,207	Ácido oleico (ácido 9- octadecenoico)	1,234
11	28,002	Desconocido	2,001
12	28,892	Ácido eicosanoico	0,887
13	29,362	Desconocido	0,833

No.	Tr (min)	Compuestos Químicos	%
14	29,649	Desconocido	1,194
15	29,720	Desconocido	0,924
16	30,311	Desconocido	3,341
17	31,286	Desconocido	0,914
18	32,210	Desconocido	0,472
19	32,653	1-octadecilglicerol	0,694
20	32,893	Desconocido	0,571
21	33,538	1,3,8-trihidroxi-6-metilanthraquinona	0,984
22	34,027	Desconocido	0,843
23	34,637	Ácido tetracosanoico (24 C)	0,566
24	35,314	eicosilglicerol	0,809
25	37,152	Desconocido	1,262
26	40,152	Isómero de lupenona	14,674
27	40,342	Desconocido	6,661
28	40,627	Isómero del lupeol	4,030
29	40,828	Lup-20(29)-en-3-ona (lupenona)	20,635
30	41,305	Lupeol	3,828
31	41,452	Cicloartenol	1,574
32	43,547	Desconocido	3,423
33	43,739	Desconocido	4,291
34	45,046	Desconocido	2,699

Fuente: Autores

Como se observa en la Figura 3. y la Tabla 6. hasta los 21,9 minutos se detectan azúcares y polioles en general. Estos compuestos forman parte de la composición química de los propóleos recolectados en cualquier zona geográfica (Bankova et al., 2000; de Groot, 2013). La presencia de polioles en general y de azúcares en particular, es una característica inherente a los propóleos de cualquier origen geográfico. Aunque los azúcares no son constituyentes fundamentales de la mayoría de los exudados vegetales que recolectan las abejas para producir propóleos, sí se encuentran de forma mayoritaria en el néctar que el insecto recolecta para producir miel. Por esta razón, las muestras de propóleos siempre presentan azúcares. Es importante destacar que la manipulación que desarrolla el hombre al recolectar los productos de la colmena (miel y propóleos), también puede influir en este resultado. El porcentaje relativo que mostraron estos componentes con respecto al total de los compuestos detectado fue de 19,16 %.

A partir de los 22,2 min y hasta alrededor de los 37 min, se detectaron compuestos con características ácidas, éteres derivados de la glicerina, una antraquinona y otros compuestos que no pudieron ser identificados partir de la comparación con la base de datos (picos cromatográficos desde el 8 hasta 25).

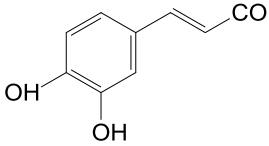
Entre los compuestos ácidos, se identificaron ácidos carboxílicos de cadena larga como el ácido palmítico (hexadecanoico), el ácido eicosanoico, el ácido tetracosanoico y el ácido oleico (ácido alifático insaturado), los cuales correspondieron con las señales 8, 12, 23 y 10, respectivamente. Se detectó además al ácido caféico (derivado del ácido cinámico) al que le correspondió la señal 9. Los espectros de masas de todos estos ácidos se pueden consultar en los anexos 1, 2, 3, 4 y 5. La presencia de ácidos grasos saturados, insaturados, aromáticos y derivados de fenilpropanoides ha sido ampliamente demostrada en muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos (Markham et al., 1996; Mirzoeva et al., 1996; Park et al., 2002; Rebiai et al., 2017).

Las señales que caracterizaron los espectros de masas de estos ácidos estuvieron en total correspondencia con lo reportado en la literatura (Charalampos et al., 2013). Se observó un patrón de fragmentación semejante para los ácidos palmítico, oleico, eicosanoico y tetracosanoico que responden a los iones M^+ , $[M-15]^+$ y a los iones fragmento m/z 145, 132, 117 y 73, respectivamente

La Tabla 7 muestra las estructuras identificadas y los iones fragmentos que caracterizan sus rupturas fundamentales.

Tabla 7: Estructura de los ácidos carboxílicos identificados e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos.

Númer o de señal	Estructura del compuesto	Iones fragmento m/z	Interpretación
8	<chem>CH3-(CH2)14-COOH</chem>	328	M^+
		313	$[M-15]^+$
		145	$[CH_2-CH_2-COOSi(CH_3)_3]^+$
		132	Reordenamiento de McLafferty
		117	$[-COOSi(CH_3)_3]^+$
		73	TMS
		396	M^+
		381	$[M-15]^+$

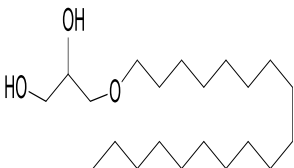
Número de señal	Estructura del compuesto	Iones fragmento m/z	Interpretación
9		219	$[M - 177]^+$ (característico de ácido cinámicos y derivados)
		73	TMS
		364	M^+
		145	$[CH_2-CH_2-COOSi(CH_3)_3]^+$
10	$COOH-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3$	132	Reordenamiento de McLafferty
		117	$[-COOSi(CH_3)_3]^+$
		73	TMS
		384	M^+
		369	$[M - 15]^+$
12	$CH_3-(CH_2)_{18}-COOH$	145	$[CH_2-CH_2-COOSi(CH_3)_3]^+$
		132	Reordenamiento de McLafferty
		117	$[-COOSi(CH_3)_3]^+$
		73	TMS
		440	M^+
23	$CH_3-(CH_2)_{22}-COOH$	425	$[M - 15]^+$
		145	$[CH_2-CH_2-COOSi(CH_3)_3]^+$
		132	Reordenamiento de McLafferty
		117	$[-COOSi(CH_3)_3]^+$
		73	TMS

Fuente: Autores

Como se mencionó con anterioridad también se sugirió, a partir de la comparación con la base de datos, la estructura de dos éteres de glicerilo. Estos correspondieron con

las señales números 19 y 24; sus espectros de masas se encuentran en los anexos 6 y 7. Se identificaron como el éter octadecilglicerol y su homólogo superior de 20 átomos de carbono, respectivamente. La fragmentación por impacto electrónico que sufren los 1-O-alkil-2,3-di-OTMS gliceroles, está muy bien detallada en la literatura (Mangold y Paltauf, 1983). Implica la casi inexistencia del ion M^+ y la presencia de iones provocados por pérdidas de 15, 90, 103, 147 uma (para los derivados con 16 – 18 átomos de carbono, fundamentalmente), entre otras. El pico base del espectro de estos compuestos es m/z 205 y se constatan iones que derivan de ese fragmento. La identificación que se desarrolló para ambos compuestos se resume en la Tabla 8.

Tabla 8: Interpretación del espectro correspondiente a los éteres de glicerilo identificados.

Número de señal	Estructura del compuesto	Iones fragmento m/z	Interpretación
19		488	M^+
		473	$[M-15]^+$
		398	$M^+ - 90$ (-OH, -TMS)
		385	$[M-103]^+$ (-CH ₂ -OTMS)
		341	$[M-147]^+$ (TMSO-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂)
		205	$[TMSO-CH_2-CH-OTMS]^+$
		147	$[TMSO-CH_2-CH(OH)-CH_2]^+$
		133	
		130	
		117	
		516	M^+
		501	$[M-15]^+$ (-CH ₃)
		426	$M^+ - 90$ (-OH, -TMS)

24		369	$[M-147]^+ (TMSO-CH_2-CH(OH)-CH_2)$
		205	$[TMSO-CH_2-CH-OTMS]^+$
		147	$[TMSO-CH_2-CH(OH)-CH_2]^+$
		133	
		130	
		117	

Fuente: Autores

La presencia de éteres de glicerilo ha sido referida en muestras de propóleos. Dos ejemplos recientes lo constituyen los reportes realizados en muestras de propóleos de Camerún y Argelia, donde se encontraron monogliceril éteres al igual que en este estudio (Talla et al., 2017; Soltani et al. 2017)

El pico 21 se propuso que fuese la 1,6,8-trihidroxi-3-metilantraquinona. Su espectro de masas se encuentra en el anexo 8. Este se caracterizó por poseer básicamente un fragmento con m/z 471, que resulta el pico base del espectro. Estas características apoyan la sugerencia de la base de datos, dado que las antraquinonas fragmentan únicamente a partir de la pérdida de los sustituyentes de los anillos, manteniéndose el núcleo prácticamente íntegro. Las pérdidas más comunes resultan: pérdida de metilos, de hidroxilos, de H_2CO y de carbonilo y metilo al unísono, dependiendo de sus sustituyentes (Bick y Rhee, 1966). El fragmento m/z 471 corresponde entonces con el $[M-15]^+$. Tomando esto como premisa, la interpretación dada a ese espectro es la siguiente (Tabla 9):

Tabla 9: Interpretación del espectro correspondiente a la 1,6,8-trihidroxi-3-metilantraquinona.

Estructura del compuesto	m/z	Interpretación
	486	M^+
	471	$[M-15]^+ (-CH_3)$
	443	$[M-15-28]^+ (-CH_3, -CO)$
	399	$[M-15-72]^+ (-CH_3, -TMS)$
	73	TMS

Fuente: Autores

La presencia de quinonas en propóleos, en comparación con otros componentes como los flavonoides y los derivados del ácido cinámico, fue reportada recientemente y son más escasas las muestras donde se han identificado estos componentes. La antraquinona detectada en nuestro estudio fue identificada inicialmente en propóleos de Egipto, Dubai, Grecia y Chipre (Said et al., 2006; Kalogeropoulos et al., 2009).

En el tiempo de elución enmarcado, hubo 9 señales que no pudieron ser identificadas a partir de la comparación con la base de datos. Esto conlleva necesariamente a realizar estudios posteriores que permitan, probablemente a partir de un proceso de separación previo, elucidar las estructuras combinando varios métodos espectroscópicos. La imposibilidad de la base de datos para identificar este elevado número de compuestos, permite suponer la existencia de compuestos que no están de manera habitual en muestras vegetales o en los propios propóleos. No obstante, el análisis de los espectros de masas de estos compuestos, permitió detectar algunas características que se resumen a continuación:

- Los compuestos detectados como los picos cromatográficos 11, 13 y 14 presentaron como fragmentos comunes m/z 177, 109, 69 y 43. Esto sugiere la posibilidad de que se encuentren relacionados estructuralmente. Incluso los picos 13 y 14 muestran aparentemente el mismo ion molecular por lo que debe tratarse de isómeros. Todo esto es apoyado por la similitud de los tiempos de retención de los mismos.
- Para los picos 17 y 18 se observó algo semejante, por lo que también se sugiere que ambos compuestos se encuentren relacionados estructuralmente. En estos casos los fragmentos comunes que presentaron fueron: m/z 192, 73 y 44.

El porcentaje relativo que mostraron los componentes de esta segunda etapa del cromatograma, con respecto al total de los detectados a partir de este método, fue de 19,02 %.

En los últimos minutos del cromatograma, a partir de los 40 min, eluyeron los compuestos mayoritarios de la muestra, los cuales constituyeron aproximadamente el 61,81 % del total. El cromatograma ampliado correspondiente a esa zona, se presenta en la Figura 4.

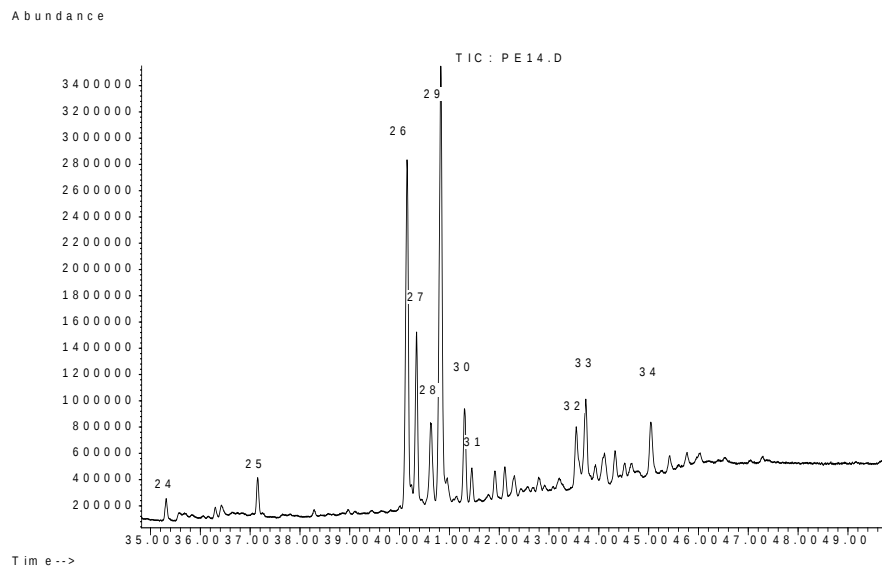


Figura 4. Zona ampliada del cromatograma obtenido a partir de los 35 min de la corrida cromatográfica

Esta zona se caracterizó por presentar 9 señales cromatográficas designadas desde la 26 hasta la 34. Todas pertenecen a señales de compuestos triterpénicos. La comparación con la base de datos favoreció la identificación de dos compuestos. El análisis de las fragmentaciones de los espectros de masas permitió comprobar lo anterior, sugerir la estructura de otro y establecer características estructurales de otros tres.

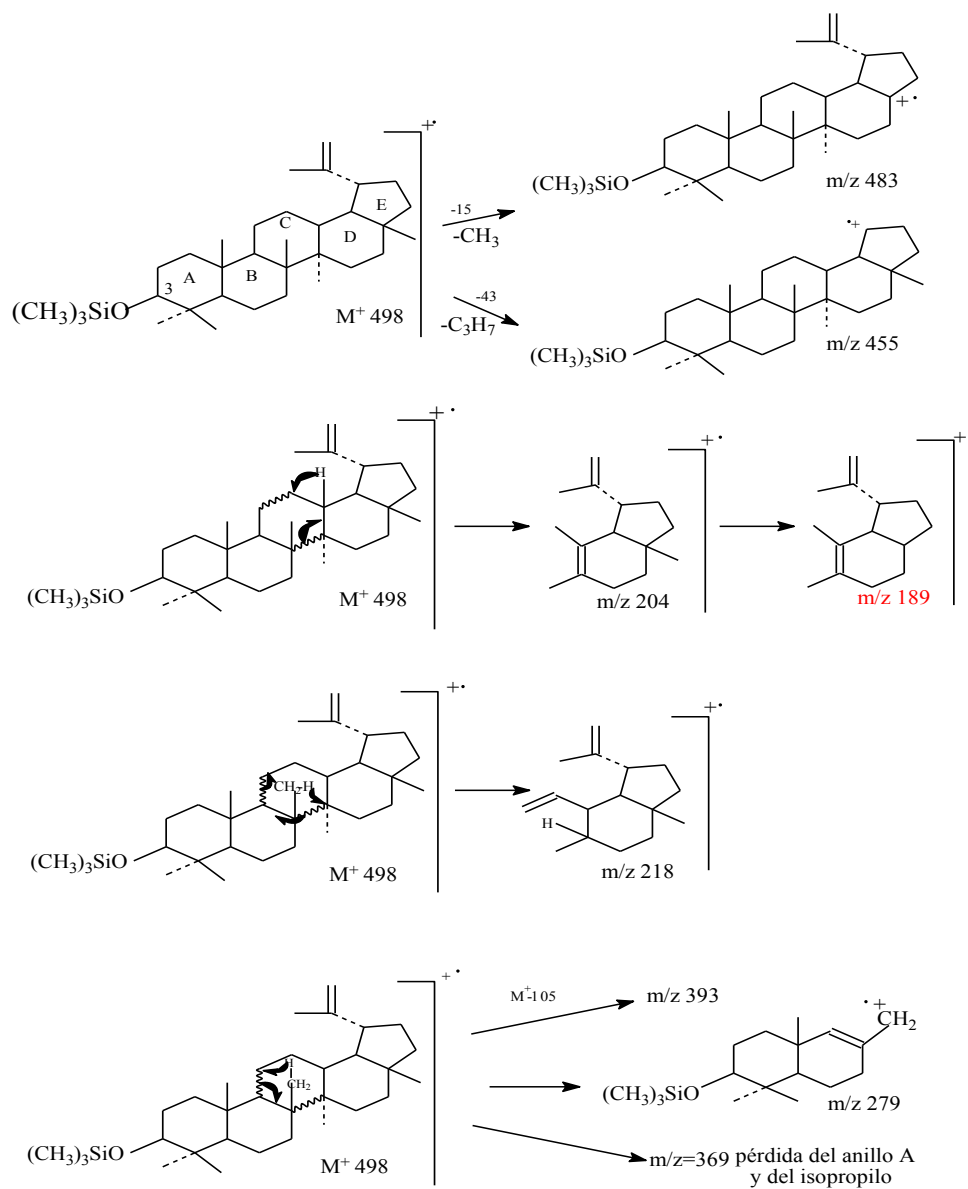


Figura 5. Fragmentaciones a partir de las cuales se dedujeron, ejemplificadas para el lupeol.

Los compuestos identificados fueron la lupenona, el lupeol y el cicloartenol, correspondientes a las señales 29, 30 y 31 del cromatograma.

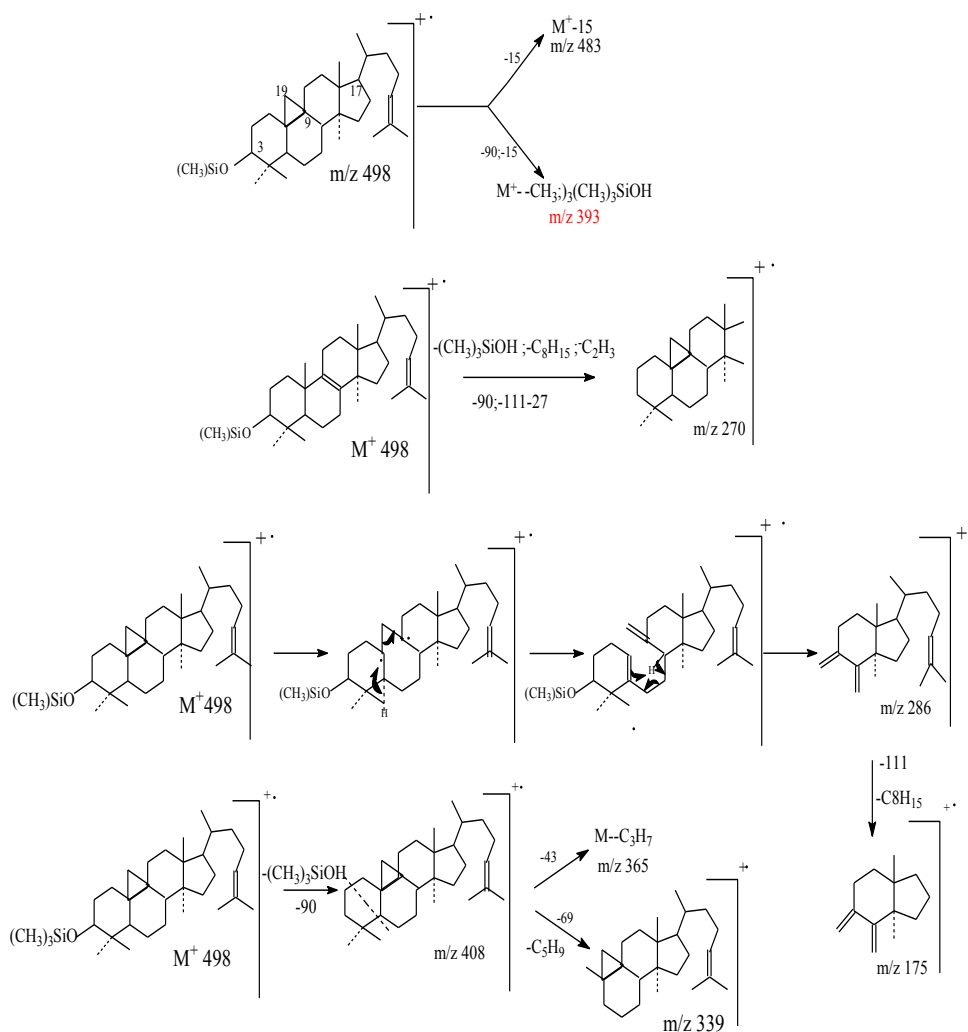


Figura 6. Fragmentaciones

El lupeol y la lupenona son triterpenos pentacíclicos derivados del lupano (Anexos 9 y 10). El espectro de masas de esta serie se caracteriza por presentar como fragmentos más abundantes aquellos productos de la ruptura del anillo C. Se observaron, además, los fragmentos correspondientes a las pérdidas de metilo e isopropilo, esta última característica de este tipo de núcleo (Budzikiewics y col., 1963; Heinzen y col., 1996).

El cicloartenol (Anexo 11), por su parte, es un lanostano y sus fragmentaciones estuvieron relacionadas con la pérdida de la cadena lateral de la posición 17, la pérdida del sustituyente sobre la posición 3 y fragmentaciones que involucraron pérdidas de CH_3 y C_3H_7 . Se presentaron además señales relacionadas con la pérdida del

ciclopropano (Audier y col., 1966; Fernández-Ferreira y col., 1990). La discusión de este espectro se presenta en la Figura 6.

El análisis de los espectros de masas del resto de las señales permitió realizar una serie de determinaciones estructurales:

- El pico cromatográfico 26, mostró señales en sus espectros de masas que se encuentran muy relacionadas con la lupenona. El ion correspondiente al M⁺ (m/z 424) presenta la misma masa, por lo que presumiblemente se trate de un isómero de la misma. Los iones fragmentos responden también a los mecanismos de fragmentación de los lupanos, mostrando al ion fragmento m/z 205 como el más intenso del espectro, al igual que la lupenona, así como los fragmentos que se obtienen de los anillos A y B. Por tanto, se sugiere que se trate de un isómero de la lupenona, que presumiblemente difiera de la misma en los anillos D o E. El espectro de este compuesto se muestra en el Anexo 12.
- La señal 28 muestra en su espectro de masas (Anexo 13) fragmentos coincidentes con los detectados para el lupeol (m/z 498, 393, 279, 218, 203 y 198 como pico base). Esto permite sugerir que se trate de un isómero del mismo ya que además posee igual masa molecular.
- La señal 32, presenta algunos iones fragmentos coincidentes con el 9,19-ciclo-lanostan-3 β -ol-24-metileno y podría tal vez tratarse de un compuesto estructuralmente relacionado con este triterpeno (Anexo 14).

Los triterpenos poseen una amplia distribución en especies vegetales de diferentes familias, que a su vez crecen en los más diversos orígenes geográficos. Por tal motivo, la presencia de triterpenos es muy común en muestras de propóleos e incluso llegan a ser los constituyentes mayoritarios de las mismas. En Cuba se identificó un tipo de propóleos donde los triterpenos, tanto como alcoholes como acetatos, constituyen los compuestos principales (Márquez et al., 2010). En diferentes países de prácticamente todos los continentes se han reportado triterpenos ya sea como constituyentes minoritarios o mayoritarios. Las diferencias fundamentales, asociadas al origen geográfico, parecen estar más relacionadas al tipo particular de triterpenos. Sin embargo, algunos triterpenos como la amirina y el lupeol se encuentran ampliamente representados en propóleos (Bankova et al., 2000; Park et al., 2002; de Groot, 2013).

Los datos obtenidos durante el procesamiento de las muestras 17 y 19 se detallan en la siguiente Tabla:

Tabla 10. *Compuestos identificados para las muestras 17 y 19, a partir del análisis por CG-EM*

Muestra 17				Muestra 19		
No.	Tr (min)	Compuestos Químicos	%	Tr (min)	Compuestos Químicos	%
1	6,433	Glicerina	2,79	6.431	glicerina	3,186

Muestra 17					Muestra 19	
2	11,260	Acido hidroxibutano dioico (ácido málico)	0,20	6.670	L-prolina	0,167
3	11,757	2,3,4-trihidroxibutanol	0,11	11.257	Ácido hidroxibutano dioico (ácido málico)	0,236
4	11,924	2,3,4-trihidroxibutanol	2,93	11.755	2,3,4-trihidroxibutanol	0,381
5	12,713	(4-Hidroxi fenil) etanol	0,29	11.923	2,3,4-trihidroxibutanol	5,636
6	16,660	Xilitol	0,99	12.706	Ácido 2,3,4-trihidroxibutírico	0,390
7	18.118	Desconocido	0,88	14.162	D-xilosa	0,143
8	18.381	D fructosa	2,63	16.659	Ribitol	3,004
9	18.540	Isómero D fructosa	5,18	18.118	Desconocido	0,895
10	19.747	5-desoxi mioinositol	0,52	18.380	D fructosa	4,422
11	20.047	D galactosa	3,07	18.537	Isómero de la D fructosa	8,072
12	21.251	inositol	0,35	19.742	5-desoxi mioinositol	1,072
13	21.935	D glucosa	2,96	20.046	D galactosa	5,695
14	22.168	Ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxi D-Gluconico	0,43	21.937	D glucosa	5,633
15	22.240	Ácido hexadecanoico	0,84	22.165	Ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxi D-Gluconico	0,515
16	23.118	Ácido 3-hidroxi-4-metoxi cinámico (ácido felúrico)	0,43	22.238	Ácido hexadecanoico	0,599
17	24.047	Ácido cafeico	1,55	24.043	Ácido cafeico	1,240
18	25.204	Ácido oleico	1,81	25.201	Ácido oleico	1,244
19	26.049	Desconocido	1,33	26.043	Desconocido	0,999
20	27.623	Desconocido	1,52	27.614	Desconocido	0,888
21	28.017	Desconocido	7,73	28.007	Desconocido	6,384
22	28.487	Isómero de 20	1,06	28.884	Ácido eicosanoico	0,658
23	28.896	Ácido eicosanoico	1,57	29.355	Desconocido	2,028
24	29.368	Desconocido	3,22	29.654	Desconocido	3,223
25	29.665	Desconocido	5,05	29.720	Desconocido	2,215
26	29.729	Desconocido	3,00	30.315	Desconocido	5,992
27	30.312	Desconocido	4,54	30.669	Desconocido	1,514
28	30.317	Desconocido	4,69	31.282	Desconocido	1,297
29	30.679	Desconocido	2,31	32.214	Desconocido	1,143
30	31.189	Desconocido	1,46	32.461	Desconocido	2,647
31	31.292	Desconocido	2,27	32.647	Desconocido	0,421
32	32.218	Desconocido	1,54	32.898	α D glucopiranososa	3,133
33	32.477	Desconocido	4,11	33.046	Desconocido	1,515

Muestra 17				Muestra 19		
34	33.180	1,6-dihidroxi-3-metil antraquinona	4,26	33.156	1,6-Dihidroxi-3-methylantraquinona	1,678
35	33.542	1,6,8-trihidroxi-3-metil antraquinona	3,51	33.530	1,6,8-trihidroxi-3-metil antraquinona	1,730
36	34.029	Desconocido	1,71	34.023	Desconocido	1,404
37	34.404	Desconocido	1,19	34.623	Ácido tetracosanoico eicosilglicerol	0,545
38	34.631	Ácido tetracosanoico	0,76	35.307	Desconocido	1,987
39	35.108	Desconocido	0,79	37.153	Desconocido	0,870
40	35.313	eicosilglicerol	0,89	37.407	Desconocido (¿antraquinona?)	3,564
41	36.296	Desconocido	0,98	40.137	Isómero de la lupenona	1,682
42	37.160	Desconocido	2,98	40.326	Desconocido	1,004
43	37.420	1,6-dihidroxi-8-metoxi-3-metil anthraquinona	1,04	40.613	Isómero del lupeol	4,738
44	40.136	Isómero de la lupenona	2,55	40.806	Lupan-20(29)-en-3-ona (lupenona)	0,857
45	40.332	Desconocido	1,01	41.290	Lupeol	1,058
46	40.806	Lupan-20(29)-en-3-ona (lupenona)	3,13	43.533	Desconocido	1,743
47	45.057	Desconocido	1,82	45.036	Desconocido	

Fuente: Autores

El análisis de la Tabla 10 permitió constatar las elevadas semejanzas que presentan estas muestras respecto a la anteriormente discutida (14), por lo que el análisis de ambas se desarrollará de manera comparativa a partir de los resultados obtenidos en la muestra 14. La fragmentación y las sugerencias estructurales de los compuestos coincidentes no se repetirán dado que ya fueron discutidas para la muestra 14.

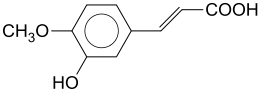
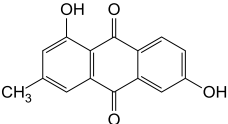
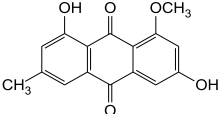
A partir de estos procesos se pudo establecer que:

- Las muestras 17 y 19 presentan el mismo número de componentes identificados a partir de este método analítico, sin embargo, estos resultan superiores a los detectados para la muestra 14
- Al igual que lo detectado para esta última, durante los primeros 21,9 minutos aproximadamente, se apreciaron azúcares y polioles en general. Sin embargo, se constataron compuestos adicionales a los determinados para la primera muestra. A continuación se detallan cuáles son:

- En ambas muestras (17 y 19): ácido hidroxi butanodioico (ácido málico), 2,3,4-trihidroxibutanol, un compuesto desconocido con un tiempo de retención de alrededor de 18,11 minutos y el ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxi D-Glucónico
 - En la muestra 17 además: 4-hidroxi feniletanol, xilitol e inositol
 - En la muestra 19 además: L-prolina, ácido 2,3,4-trihidroxibutírico y la D-xilosa
- A partir de los 22,2 minutos y hasta alrededor de los 37, se detectaron compuestos con características ácidas, éteres derivados de la glicerina, antraquinonas y otros compuestos que no pudieron ser identificados a partir de la comparación con la base de datos. Este comportamiento fue muy similar al descrito para la muestra 14
 - Las diferencias fundamentales en este rango de tiempos de retención radicarón, al igual que en el lapso de tiempo analizado con anterioridad, en la existencia de un mayor número de componentes detectados en ambas muestras con respecto a la 14. Estos, en la mayoría de los casos coincidieron con compuestos donde no fue posible su elucidación estructural por lo que no es posible llegar a conclusiones más concretas
 - Al comparar los compuestos que se lograron identificar en este rango para la muestra 14 y las dos restantes, se observó coincidencia para la mayoría de ellos, con la excepción de la detección adicional de la 1,6-dihidroxi-3-metil antraquinona (33,18 minutos) y la 1,6-dihidroxi-8-metoxi-3-metil antraquinona (37,42 minutos). La muestra 17 presentó además ácido 3-hidroxi-4-metoxi cinámico (ácido felúrico) a los 23,11 min. Se constata que a pesar de la detección de otros compuestos en las muestras 17 y 19, los mismos se encuentran relacionados estructuralmente con los compuestos identificados en la muestra que inicialmente se discutió. Cabe destacar que en las muestras 17 y 19 no se detectó al 1-octadecil glicerol
 - La zona final de los cromatogramas de 17 y 19 (a partir de los 40 minutos de elución), al igual que la muestra 14, se caracterizaron por la presencia presumiblemente de triterpenos. En este rango de tiempo se pudo sugerir la existencia de lupanona en ambas muestras y su posible isómero para la muestra 17 así como lupeol en la 19. También existieron señales que no pudieron ser identificadas.
 - A diferencia de lo que sucedió en la muestra 14, en las muestras 17 y 19 no resultan los triterpenos los compuestos mayoritarios. El porcentaje relativo que mostraron estos componentes con respecto al total de los detectados a partir de este método fue de 8,51 % para la muestra 17 y 14, 64 % para la 19.
 - El porcentaje relativo que mostraron los compuestos que eluyeron en los primeros minutos para la muestra 17 fue de 23,33 %, mientras que para la 19 fue de 38,93 %. En el caso del segundo momento de elución (entre los 22,2 minutos y los 40 minutos) los porcentajes fueron 68,14 % y 52,6 % respectivamente.

A continuación se muestran los fragmentos fundamentales obtenidos para los espectros de masas de aquellos compuestos identificados para las muestras 17 y 19 y que no se encontraron en la 14. La siguiente tabla muestra los fragmentos fundamentales que caracterizaron los espectros de masas del ácido felúrico, de la 1,6-dihidroxi-3-metil antraquinona, la 1,6-dihidroxi-8-metoxi-3-metil antraquinona y su interpretación (Charalampos et al., 2013; Bick y Rhee, 1966). Estos espectros de masas se pueden revisar en los Anexos 15, 16 y 17.

Tabla 11: Estructura de otros compuestos identificados en las muestras 17 y 19 e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos.

Estructura	Iones Fragmentos (m/z)	Interpretación
	338	M ⁺
	323	[M-15] ⁺
	144	[M-177] ⁺ (característico de ácido cinámicos y derivados)
	73	TMS
	398	M ⁺
	383	[M-15] ⁺ (-CH ₃)
	355	[M-15-28] ⁺ (-CH ₃ , -CO)
	311	[M-15-72] ⁺ (-CH ₃ , -TMS)
	73	TMS
	428	M ⁺
	413	[M-15] ⁺ (-CH ₃)
	341	[M-15-72] ⁺ (-CH ₃ , -TMS)
	73	TMS

Fuente: Autores

Realizando un resumen de los principales resultados obtenidos por espectrometría de masas se tiene:

- Las tres muestras se caracterizaron por poseer tres momentos fundamentales de elución: el primero hasta alrededor de los primeros 22 minutos, el segundo desde

los 22,2 minutos hasta alrededor de los 40 minutos y el tercero por encima de este valor

- Durante la primera etapa de elución se presentaron azúcares y polioles en general, en la segunda se detectaron compuestos con características ácidas, éteres derivados de la glicerina, antraquinonas y otros compuestos que no pudieron ser identificados y en la tercera presumiblemente triterpenos
- La glicerina, el 2,3,4 trihidroxi butanal, D-fructosa, un isómero de la misma, 5-desoximioinositol, D-galactosa, D-glucosa, ácido hexadecanoico, ácido cafeico, ácido oleico, ácido eicosanoico, 1,6,8-trihidroxi-3-metil antraquinona, ácido tetracosanoico, eicosilglicerol y la lupenona estuvieron presentes en las muestras objeto de estudio, además de alrededor de 12 compuestos que no pudieron ser identificados a partir de la comparación con la base de datos
- La muestra 14 presentó como compuestos mayoritarios triterpenos mientras que las dos restantes tiene como mayoritarios los compuestos que eluyen en la zona central de los cromatogramas, los cuales en su mayoría no pudieron ser identificados por el método de estudio empleado.

Los cromatogramas de las muestras 17 y 19 se pueden revisar en los anexos 18 y 19

3.5. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante Folin-Ciocalteu

“Los compuestos fenólicos son metabolitos de interés no solo en el campo de la terapéutica, sino también en la formulación de cosmeceúticos, debido a su actividad antioxidante” (Pokorny, J. (2001). De la misma manera, de acuerdo con Bray “la cuantificación de tales productos naturales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, uno de los más antiguos métodos diseñados para determinar el contenido total de fenoles. Dicho reactivo es capaz de reaccionar con fenoles y sustancias reductoras no fenólicas, para formar cromógenos que se pueden detectar espectrofotométricamente” (1954).

En cuanto al sistema de ensayo, considera a Singleton que “es una mezcla de tungstato y molibdato en un medio altamente básico (5-10 % Na_2CO_3). Los fenoles son energéticamente oxidados en medio básico, promoviendo la formación del anión superóxido, que a su vez, reacciona con el molibdato con la formación de óxido de molibdeno, quien tiene una absorbancia intensa a una longitud de 760 nm”.

El cálculo del contenido de fenoles totales de los tres extractos etanólicos de propóleos, se realizó a partir de una curva de calibración obtenida mediante el análisis de concentraciones crecientes de ácido gálico. El análisis de regresión lineal mostró la recta que se presenta en la figura 7, así como la ecuación de mejor ajuste. Dado que el valor de probabilidad P es inferior a 0,01, se puede plantear una relación estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración, con un nivel de

confianza del 99%. El coeficiente de correlación es igual a 0,9948, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables (Statgraphics Plus versión 5.0).

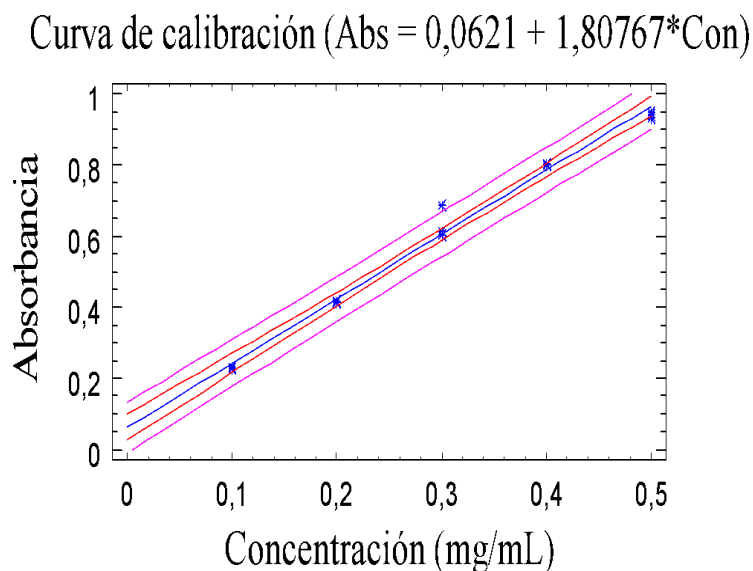


Figura 7. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Fuente: Autores

Los resultados obtenidos (media de tres repeticiones/desviación estándar), evidenciaron que el extracto PE-19 mostró los valores más elevados de polifenoles (mgEAG) por cada gramo de muestra analizada, con un valor de 70,07/3,19, seguido de la PE-14 con 68,93/2,71 y con el menor valor, 63,00/3,20, el extracto PE-17.

Con los datos obtenidos se procedió a determinar si los mismos tienen un comportamiento normal mediante la prueba de shapiro will con la cual se alcanzó un valor de $p > 0,076$ estableciendo que si se cumple el supuesto de normalidad. Con los mismos datos se aplicó el diseño completamente al azar a través de cual estableceremos si los propóleos tienen un comportamiento en fenoles totales similares. Como se puede apreciar en el gráfico de cajas vemos que todos tienen una misma dispersión y en sus medias se puede apreciar que las muestras 14 y 19 son similares. Existe un traslape entre la 14 y 17 mientras que la 17 y 19 un traslape mínimo quiere decir que existe un comportamiento similar de los tres propóleos el mismo que se valida con los resultados del ANOVA que se obtuvo un valor $p > 0,059$

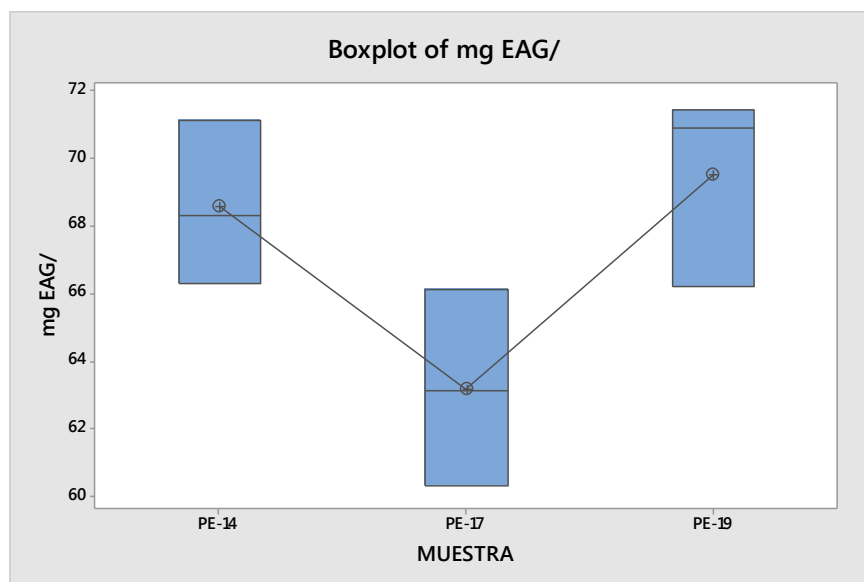


Figura 8. Gráfico de cajas que relaciona la muestra con el porcentaje de fenoles totales

Fuente: Autores

Las tres muestras de extractos estudiadas presentan en su composición química ácidos fenólicos tales como los derivados del ácido cinámico (ácido cafeico y el ácido 3-hidroxi-4-metoxi cinámico), los que no se presentan en concentraciones muy elevadas, según los resultados obtenidos por CG-EM. Otro de los metabolitos de naturaleza fenólica identificados, son las antraquinonas, las que, si bien son poco frecuentes en propóleos, tampoco resultan ser compuestos mayoritarios en ningunos de los extractos estudiados.

Tabla 12. Cuantificación de compuestos fenólicos totales en muestra de propóleos de diferentes localizaciones geográficas.

Propóleos estudiados	mg EAG/g de propóleos	Bibliografía
Propóleos rojo brasileño	91,32 / 0,49	Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017).
Propóleos verde brasileño	90,55 / 1,52	
Propóleos pardo brasileño	55,74 / 0,48	
Piura (Perú)	70,1 / 0,10	Soto-Vásquez, M. R. (2016).
Ayacucho (Perú)	78,6 / 0,20	
Pucallpa (Perú)	60,5 / 0,10	Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., (2007).
Irán	30,8/0,02 - 84,6/0,03	

Fuente: (López 2014)

Ahora, como menciona López y se observa en la Tabla 12 se presentan algunos estudios realizados en muestras de propóleos de otras regiones geográficas. Como se

puede apreciar la concentración de compuestos fenólicos difiere considerablemente, lo que puede estar justificado por el hecho de que la composición química del propóleo puede variar, significativamente, dependiendo de las diferentes regiones geográficas, las condiciones climáticas, la vegetación que crece alrededor de las colmenas, así como el momento de la recolección, diferencias que indudablemente pueden influir en la actividad biológica (López 2014).

Si bien la determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de la actividad antioxidante, puede ser útil para tales estudios, en especial si se combina con métodos que permiten cuantificar tal propiedad.

Haciendo referencia a los compuestos fenólicos, ha sido necesario considerar a Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S.; quienes dan a conocer que estos se constituyen como el grupo más numeroso de componentes identificados en el propóleo, tanto en cantidad como en tipo. Pudiera citarse la presencia de ácidos fenólicos, los aldehídos fenólicos, cumarinas y otros compuestos, incluyendo: eugenol, anetol, quinona, etc. (2003).

“Los ácidos fenólicos, entre ellos, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido isoferúlico, ácido 3,4 - dimetoxicinámico, ácido o-cumárico, ácido m-cumárico, ácido cumarínico, ácido sinápico, ácido hidrocafélico y ácido cinamilidenoacético, han sido identificados en propóleos de Europa, Asia occidental, China, Sudáfrica, América del Norte y Nueva Zelanda” Scheller, S.; Wilczok, T.; Imielski, S.; Król, W.; Gabrys, J.; Shani, J. (1990).

De esta manera, también, los ácidos fenólicos están compuestos por un anillo de benceno, grupos carboxilo e hidroxilo, dependiendo su actividad antioxidante de los grupos hidroxilos presentes en la molécula y de los efectos estéricos Leja, M.; Mareczek, G.; Wyzgolik, G.; Klepacz-Baniak, J.; Czekońska, K. (2007). Igualmente, Iqbal-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G., habla de que la posición de los grupos hidroxilo, así como el tipo de sustitución del anillo aromático, también influyen en la actividad antioxidante de estos compuestos.

Es importante dar cuenta sobre, los derivados monohidroxilados del ácido benzoico, pues,

“con un grupo hidroxilo en la posición orto o para en el anillo, no exhiben actividad antioxidante, contrario a lo que sucede con los derivados meta monohidroxilados. Los monohidroxiácidos son eficaces secuestradores de radicales hidroxilos, aumentando su actividad antioxidante en ácidos que poseen, además de un grupo hidroxilo, un grupo metoxilo en el anillo. La sustitución por un grupo alquilo o metoxilo en la posición orto, aumenta la estabilidad así como las propiedades antioxidantes de dichos productos naturales” (1996).

Por lo mencionadom anteriormente se entiende que: “con relación a los derivados dihidroxilados del ácido benzoico presentan mayor capacidad antioxidante, cuando los hidroxilos aparecen en las posiciones 3 y 5. Aquellos que contiene tres grupos hidroxilo (posiciones 3, 4 y 5) como el ácido gálico, se caracterizan por tener muy buenas propiedades antioxidantes”

En resumen, el poder de la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos depende de la ubicación del grupo carboxilo, incluso, la presencia de un grupo etileno como cadena lateral (ácidos hidroxicinámicos) brinda mejores propiedades antioxidantes, en comparación con los derivados del ácido benzoico. (Leja, M.; Mareczek, G.; Wyzgolik, G.; Klepacz-Baniak, J.; Czekońska, 2006).

Entonces, desde la investigación realizada por la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos puede desarrollarse al secuestrar los radicales libres (superóxido, hidroxilo e hidroxil superóxido), iones quelantes de metales (hierro, cobre), o través del cambio de la actividad enzimática por inhibición de las oxidasas. (Makarska, E.; Michalak, M. Antioxidant activity of phenolic acids of spring barley. *Annal. UMCS. Sec. E* 2005).

3.6. Actividad secuestradora del radical libre DPPH

En la actualidad, existe un creciente interés en los antioxidantes, sobre todo, los de origen natural en lugar de los de fuentes sintéticas, debido a su aplicación en medicina, alimentos y cosméticos (Liu, R. H. 2003).

En relación a los sistemas vivos, se ha visto la necesidad de recurrir a los estudios de Grune, T., Shringarpure, R., Sitte, N., & Davies, K., quienes hablan acerca de:

“Los diversos procesos metabólicos así como condiciones ambientales pueden generar especies reactivas, principalmente especies reactivas de oxígeno (ERO). El aumento del nivel de las ERO puede dañar la estructura de las biomoléculas, modificar sus funciones y conducir a la disfunción celular e incluso a la muerte celular, además, su acumulación puede aumentar el estrés oxidativo a nivel sistémico, lo que se manifiesta en variados problemas de salud como el cáncer, enfermedades relacionadas con la edad y las enfermedades cardiovasculares (2001).

Paralelamente, existe un aumento en el uso de métodos para estimar la eficiencia de los productos naturales como antioxidantes; pues uno de los métodos más importante y utilizados para determinar la actividad antioxidante en propóleos se basa en el uso del radical libre estable difenilpicrilhidrazilo (DPPH); de acuerdo con Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C.,.. & Papotti, G. (2016).

Como se puede observar en la figura 8. en la medida que se incrementa la concentración de cada uno de los extractos, se consigue un mayor porcentaje de inhibición del radical libre DPPH, lográndose en las muestras 14 y 17 valores que superan discretamente el 90%, a concentraciones de 0,3 mg/mL.

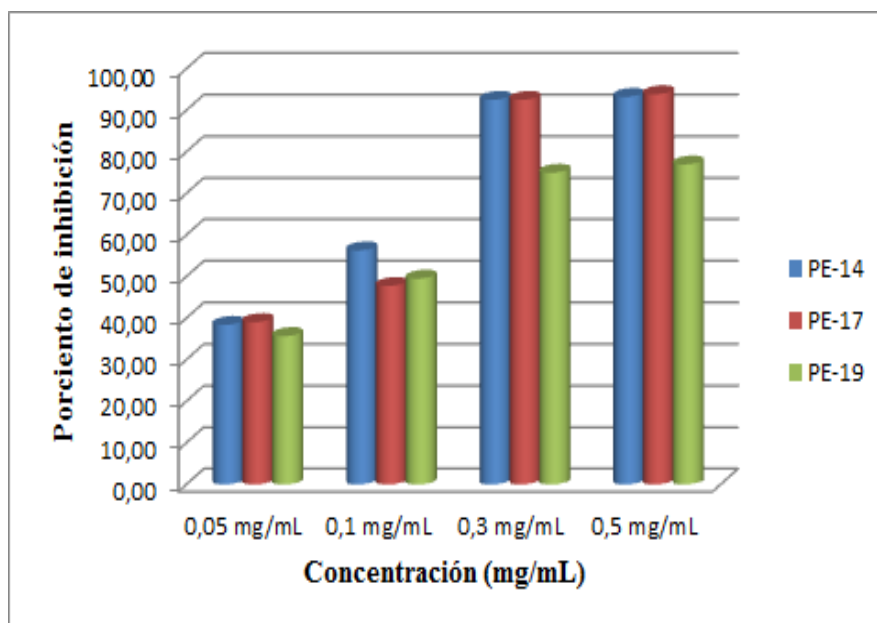


Figura 9. Actividad secuestradora de radicales libres de los tres extractos (PE-14, PE-17; PE-19) a diferentes concentraciones. Fuente: Autores

El parámetro que con mayor frecuencia se utiliza para la interpretación de los resultados del método de DPPH, es la "concentración eficiente" o el valor de EC50 (también denominado valor IC50). Esto se define como la concentración de sustrato que causa una pérdida del 50% de la concentración de DPPH.

Los resultados obtenidos mostraron que todos los extractos lograron reducir el 50% de la concentración de DPPH a concentraciones inferiores a los 0,2 mg/mL. La muestra PE-14 con un valor de 0,070, logra la mayor eficiencia como antioxidante, dado que presenta el menor valor de dicho parámetro. Le continúa la PE-17 con 0,097 y con la menor eficiencia se presenta la muestra PE-19 con un EC50 de 0,131. Debe hacerse notar que un extracto o producto tendrá mayor capacidad antioxidante, en la medida que su EC50 sea más baja.

Haciendo una comparación estadística aplicando el diseño experimental completamente al azar para ver si hay diferencias significativas entre los valores obtenidos como se aprecia en la figura 10.

Con los datos obtenidos se procedió a determinar si los mismos tienen un comportamiento normal mediante la prueba de shapiro will con la cual se alcanzó un valor de $p > 0,052$ estableciendo que si se cumple el supuesto de normalidad. Con los mismos datos se aplicó el diseño completamente al azar a través de cual estableceremos si los propóleos tienen un comportamiento en cuanto al EC50 similares. Como se puede apreciar en el gráfico de cajas vemos que todos tienen una misma dispersión y en sus medias se puede apreciar que las muestras 17 y 19 son similares. Existe un traslape entre la 14 y 17 mientras que la 17 y 19 un traslape mínimo quiere decir que existe un comportamiento similar de los tres propóleos el mismo que se valida con los resultados del ANOVA que se obtuvo un valor $p > 0,056$.

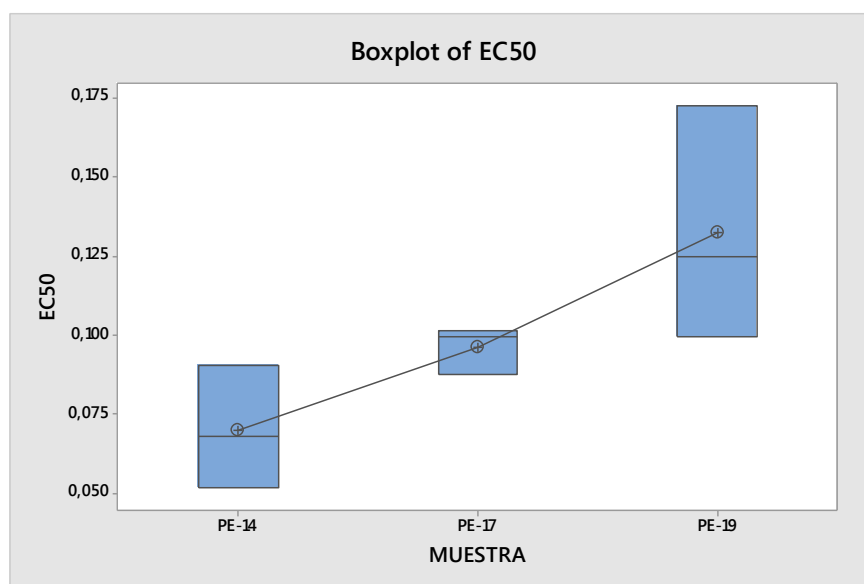


Figura 10. Comparación entre las muestras con la capacidad mínima inhibitoria

Fuente: Autores

En la Figura 11 se puede apreciar un gráfico que relaciona la concentración de polifenoles totales (mgEAG/g de muestra) con la EC50 de dichos extractos.

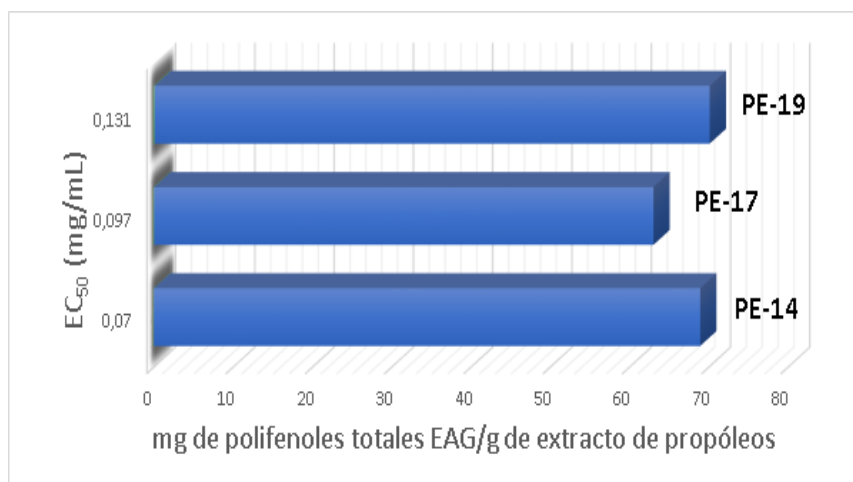


Figura 11. Relación entre el contenido de polifenoles totales y la EC₅₀ de las tres muestras de propóleos (PE-14, 17 y 19). Fuente: Autores

Como se observa no existe una correspondencia directamente proporcional entre dichos parámetros. Haciendo un análisis de los resultados obtenidos por CCD al revelar con DPPH (Figura 2), son múltiples las zonas donde se observa decoloración, lo que lleva a pensar que existen diversos metabolitos que actúan de manera sinérgica en el efecto secuestrador de radicales libres. La literatura plantea que la capacidad secuestradora de radicales libres se asocia, fundamentalmente, con la presencia de compuestos fenólicos, sin embargo, apreciando los resultados del estudio de CG-EM, son pocos los metabolitos de tal naturaleza y, además, están en bajas concentraciones. Dentro de estos se pudo cuantificar la presencia de ácido cafeico, ácido 3-hidroxi-4-metoxi cinámico y compuestos de la familia de las antraquinonas. De los dos primeros existen artículos que avalan el efecto antioxidante como lo señalan en su investigación Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C., sin embargo, de las antraquinonas, aunque por su naturaleza fenólica podrían secuestrar radicales libres, no se encontraron reportes al respecto, estos metabolitos son reconocidos, fundamentalmente, por el efecto laxante; dando a conocer esta idea Evans en sus estudios.

En consecuencia de lo anterior y en términos generales, las muestras en estudio se destacan por presentar una composición química muy diversa, donde los compuestos que prevalecen son de naturaleza triterpénica (muestra 14), quienes tampoco se caracterizan por tener una actividad secuestradora de radicales libres.

Resulta interesante acotar que la técnica empleada para la caracterización química (CG-EM), aunque es de alta sensibilidad, tiene el inconveniente que emplea temperaturas bien elevadas, por lo que pudiera suceder que existan compuestos antioxidantes que se desnaturalicen bajo dichas condiciones, por lo que pudieron ser detectados cualitativamente por CCD, pero no identificados por CG-EM. Trabajos futuros podrían encaminarse al estudio fitoquímico mediante otras técnicas tales como

HPLC-EM o métodos cromatográficos preparativos que propicien el aislamiento y caracterización de posibles compuestos termolábiles, los que, además, podrían ser responsables del agradable olor que presentaron estas muestras recién colectadas de la colmena y aún en forma de extracto seco. No se debe pasar por alto además el hecho de que en el estudio desarrollado por CG-EM, quedó un número elevado de componentes sin identificar. Podrían ser estos compuestos responsables de la actividad antioxidante obtenida. Esto reafirma la necesidad de estudios posteriores, tal y como se comentó con anterioridad.

Es importante citar a Bloids, quien expone en sus estudios refieren que el DPPH no solo puede ser decolorado por compuestos polifenólicos, sino también por la cisteína, el glutatión, el ácido ascórbico, las aminas aromáticas, entre otros (1958). Por otra parte, aunque muchos artículos científicos relacionan el contenido de polifenoles con la capacidad antioxidante, debe tenerse en cuenta que el método de Folin-Ciocalteu, tampoco resulta totalmente específico para compuestos fenólicos. Los extractos naturales contienen una gran cantidad de metabolitos no polifenólicos que pueden interaccionar con el Folin-Ciocalteu, lo que puede repercutir en una sobreestimación del porcentaje obtenido. Algunos de los compuestos que pueden interferir son: azúcares reductores, aminoácidos y ácido ascórbico; por lo que se ha investigado en Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices; trata acerca de los fenólicos y el método analítico en cuanto a su presencia en los alimentos que han sido estudiados.

De esta manera, es relevante coincidir con Muñoz; el contenido de azúcar en los propóleos pudiera interferir en la cuantificación de compuestos polifenólicos, sobre todo, si la concentración es muy alta o está presente, sobre todo, la fructosa (Muñoz, Ó., Torres, G., Núñez, J., de la Rosa, L., Rodrigo, J., Ayala, J. F., & Álvarez, E. 2017). Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de evaluar la actividad antioxidante mediante otras técnicas que se fundamenten en mecanismos diferentes.

Los cosmecéuticos resultan ser un híbrido entre un producto cosmético y uno farmacéutico, están destinados a mejorar la salud y belleza de la piel. Algunos provienen de fuente natural, mientras que otros son sintéticos, pero, todos contienen ingredientes bioactivos que combaten afecciones propias de la piel. Dentro de esto metabolitos naturales se encuentran los antioxidantes, moléculas capaces de reducir la presencia de radicales libres, evitando el deterioro a nivel celular. Inhiben la inflamación, que conduce al agotamiento del colágeno, así como ofrecen protección contra las radiaciones ultravioletas y el cáncer de piel (Wanjari N., Waghmare J. 2015).

Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba, G. dan a conocer que el propóleos es una fuente potencial de antioxidantes naturales por la presencia, fundamentalmente, de ácidos fenólicos y flavonoides. Muchos de los estudios realizados sobre este producto apícola, van encaminados a la búsqueda de compuestos bioactivos de interés, sobre todo para la salud

humana (2013). Del mismo modo, en sentido general Jong-Sung, P., & Kun-Suk, W. resalta en su investigación que el propóleo en cosmética es valorado por su actividad antibacteriana, la hidratación, la revitalización y la elasticidad que le proporciona a la piel (1997).

Tomando en consideración los resultados obtenidos, podría valorarse la posibilidad de incorporar tales extractos apícolas como componentes activos de preparaciones cosmeceúticas, aprovechando, entre otras bondades, su actividad antioxidante para el usuario. Adicionalmente, por tal efecto, podría tomarse en consideración como excipiente capaz de inhibir la oxidación de otros principios activos fácilmente oxidables, presentes en la formulación. Ahora es importante, recalcar algunos datos que son relevantes para el presente estudio, tomando en consideración a Jong-Sung, P., & Kun-Suk, W. quien menciona en su trabajo sobre el uso del en los cosméticos:

“En el mercado existen varias formulaciones que poseen propóleos en su composición, sin embargo, no todas han sido sujetas a estudios científicos que avalen su calidad. Por ejemplo, a partir de propóleos chilenos en Corea se han diseñado, con muy buena aceptación, una variedad de preparaciones como, crema (2% de propóleos) de uso recomendable para pieles grasas propensas al acné. También se sugiere para calmar pieles sensibles y mejorar tal situación. Se han elaborado bases líquidas (3%) que ayudan a equilibrar el pH de la piel y actúan como protector solar para bloquear los rayos UV, lo que incide en el envejecimiento. Adicionalmente, la crema para los ojos con 1% de propóleos ayuda a absorber los nutrientes y prevenir el exceso de humedad, además, aumenta la firmeza y elasticidad de la piel (1997).

Colateralmente, aunque las potencialidades del propóleo sugieren su uso como componente bioactivo de cosmeceúticos, no debe dejar de evaluarse su posible irritabilidad dérmica, ya que algunos artículos comentan las reacciones alérgicas que este producto apícola produce, sobre todo, los propóleos derivados de los álamos (Münstedt, K., Hellner, M., Hackethal, A., Winter, D., & Von Georgi, R. (2007).

Finalmente se podrá establecer si existe una relación a través de regresión entre la composición química y la capacidad antioxidante de los tres propóleos analizados.

En la Figura 12 se puede apreciar un gráfico que relaciona la EC50 de dichos extractos con la composición química del grupo de polioles que aparecen en la primera zona cromatográfica.

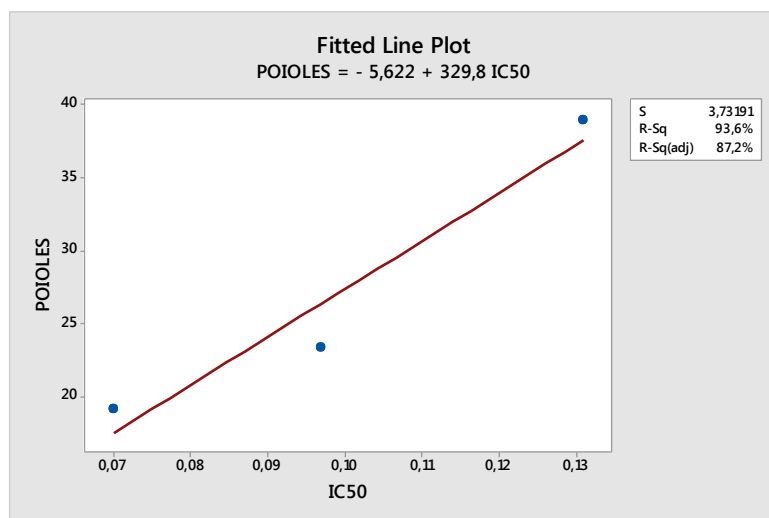


Figura 12. Relación entre la EC50 y el porcentaje de polioles en las muestras.

Fuente: Autores

En la Figura 13 se puede apreciar un gráfico que relaciona la EC50 de dichos extractos con el porcentaje de éteres, glicerina y antraquinonas del segundo fragmento cromatográfico.

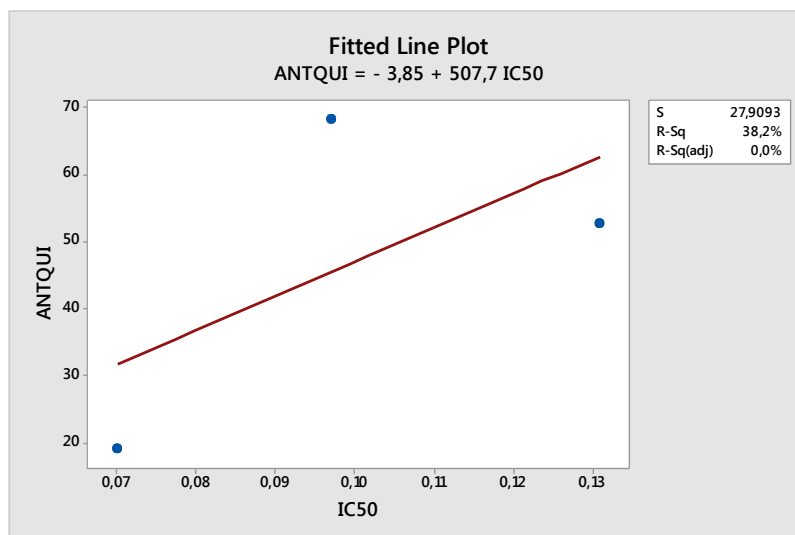


Figura 13. Relación EC50 y porcentaje de éteres, glicerina y antraquinonas

Fuente: Autores

En la Figura 14 se puede apreciar un gráfico que relaciona la EC50 de dichos extractos con el contenido triterpénico del tercer fragmento cromatográfico

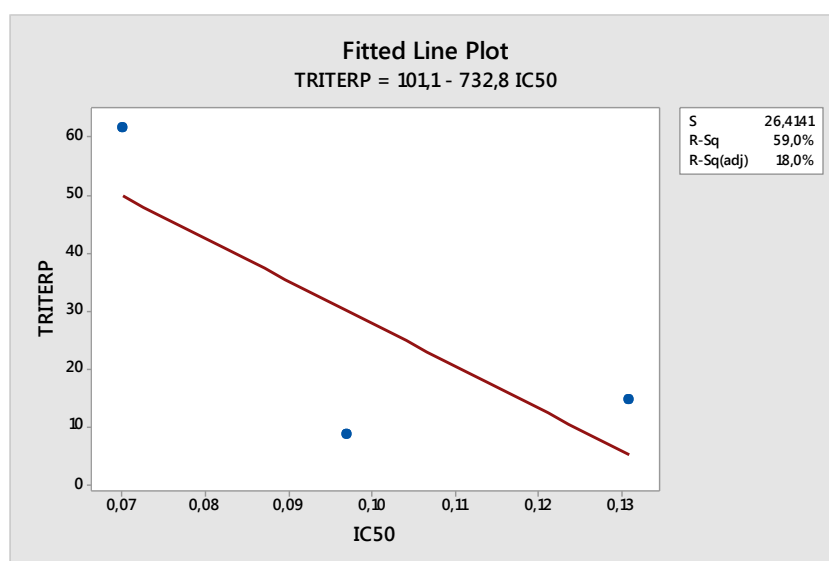


Figura 14. Relación entre EC50 y el porcentaje de triterpénicos

Fuente; Autores

Analizando los gráficos anteriores el contenido de grupos terpénicos y antraquinonas no tienen ninguna relación con el capacidad antioxidante pues los valores obtenidos de r son de 0 y de 18, no sucede con el contenido de fenoles con la capacidad antioxidante cuyo valor de r es de 58 por lo tanto podemos decir que a medida que el porcentaje de grupos polioles y azúcares aumenta la capacidad antioxidante disminuye.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se observaron discretas diferencias en los rendimientos de sustancias extraíbles en las diferentes muestras trabajadas, a partir de la utilización de la maceración en metanol

Los estudios por CCD utilizando placas de Sílica gel GF254, como fase móvil cloroformo: metanol en proporciones 9:1 y como reveladores luz UV (254 y 365 nm) y vainillina, ácido sulfúrico y calor; permitieron sugerir que las tres muestras presentan compuestos de diversa polaridad, presumiblemente compuestos conjugados, fenoles, quinonas y triterpenos. El revelado utilizando disolución al 0,2% en metanol del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) evidenció la existencia de componentes con capacidad secuestradora de radicales libres en las muestras objeto de estudio

La CG-EM por su parte permitió establecer una gran similitud química para las tres muestras estudiadas. Se pudieron detectar azúcares, polioles, ácidos, antraquinonas y triterpenos de las familias de los lanstanos y de los lupanos. La cuantificación relativa llevada a cabo mediante este método evidenció un perfil triterpénico dominante para la muestra 14 diferente al obtenido para las dos restantes, donde el dominio lo tienen compuestos que no pudieron ser identificados

La cuantificación de los compuestos fenólicos desarrollados mediante el método de Folin-Ciocalteu, estableció que la muestra 19 presenta la mayor concentración de estos metabolitos (70,07 mgEAG), seguida de la muestra 14 con 68,93 mgEAG y por último la 17 con 63,00 mgEAG

Los valores de EC50 obtenidos en Lo resultados obtenidos mostraron que todos los extractos lograron reducir el 50% de la concentración de DPPH a concentraciones inferiores a los 0,2 mg/mL. La muestra PE-14 con un valor de 0,070, logra la mayor eficiencia como antioxidante, dado que presenta el menor valor de dicho parámetro. Le continúa la PE-17 con 0,097 y con la menor eficiencia se presenta la muestra PE-19 con un EC50 de 0,131. Debe hacerse notar que un extracto o producto tendrá mayor capacidad antioxidante, en la medida que su EC50 sea más baja.

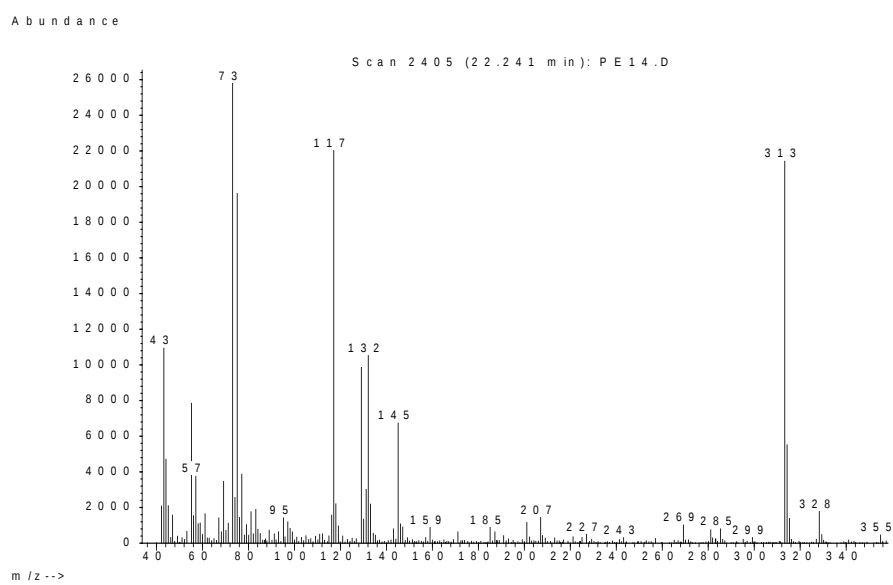
4.2 Recomendaciones

Realizar una investigación dirigida a la identificación de la flora que rodea las colmenas productoras de los propóleos usados en este trabajo. De esta forma se podría identificar la o las especies vegetales responsables de esta composición química

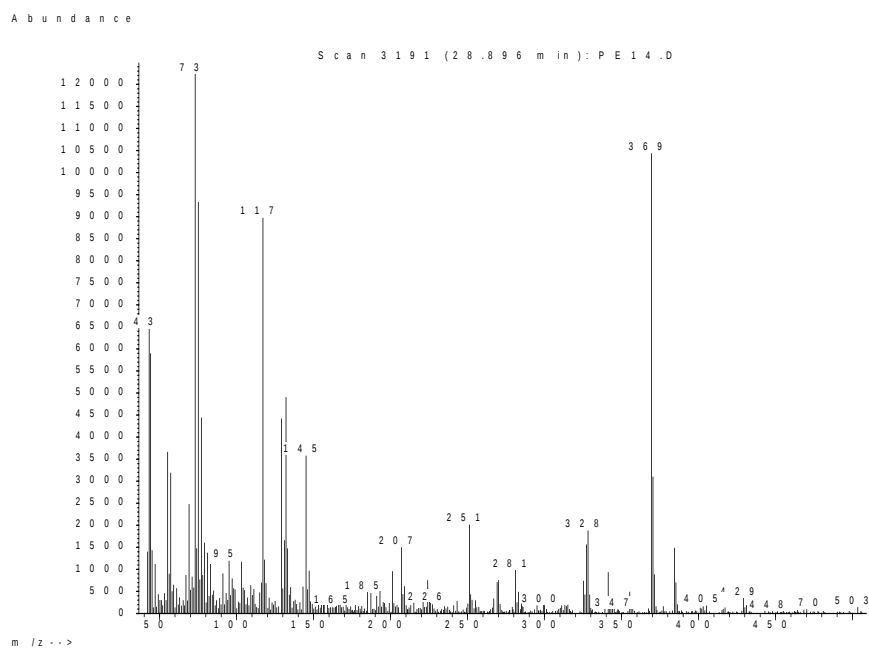
Desarrollar estudios fotoquímicos mediante otras técnicas tales como HPLC-EM o métodos cromatográficos preparativos y espectroscópicos que propicien el aislamiento y caracterización de los componentes no identificados o posibles compuestos termolábiles, los que, además, podrían ser responsables del agradable olor que presentaron estas muestras recién colectadas de la colmena y aún en forma de extracto seco.

ANEXOS

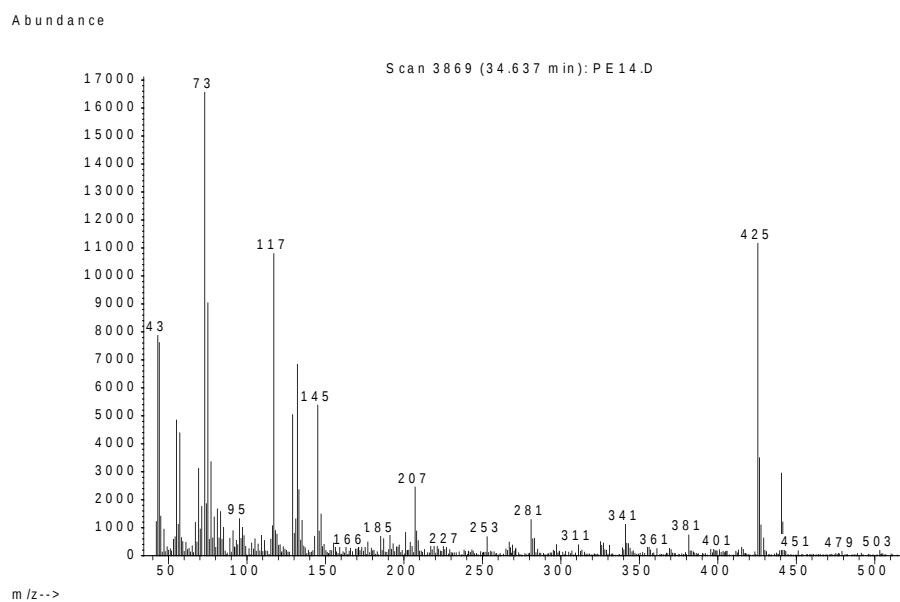
Anexo 1. Espectro de masas del ácido palmítico



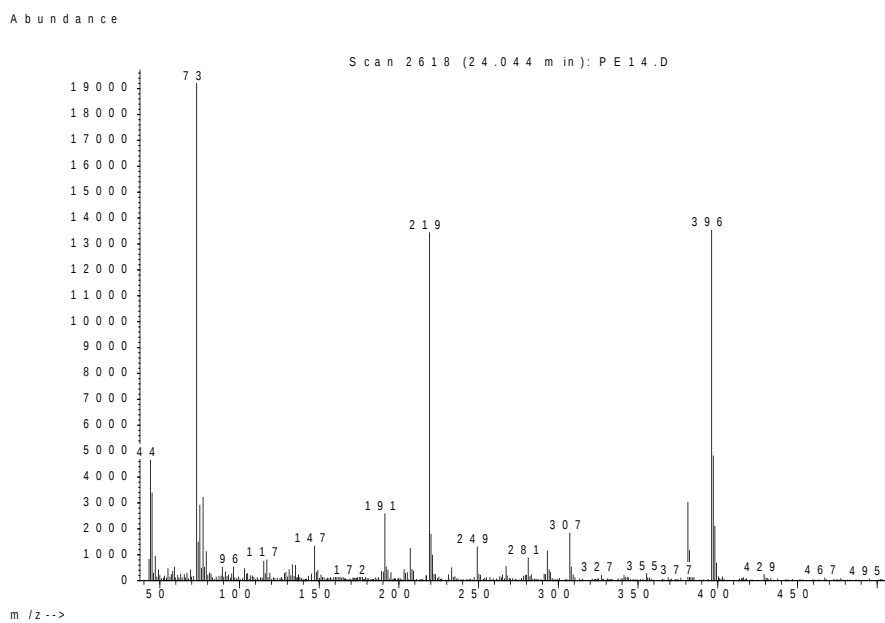
Anexo 2. Espectro de masas del ácido eicosanoico



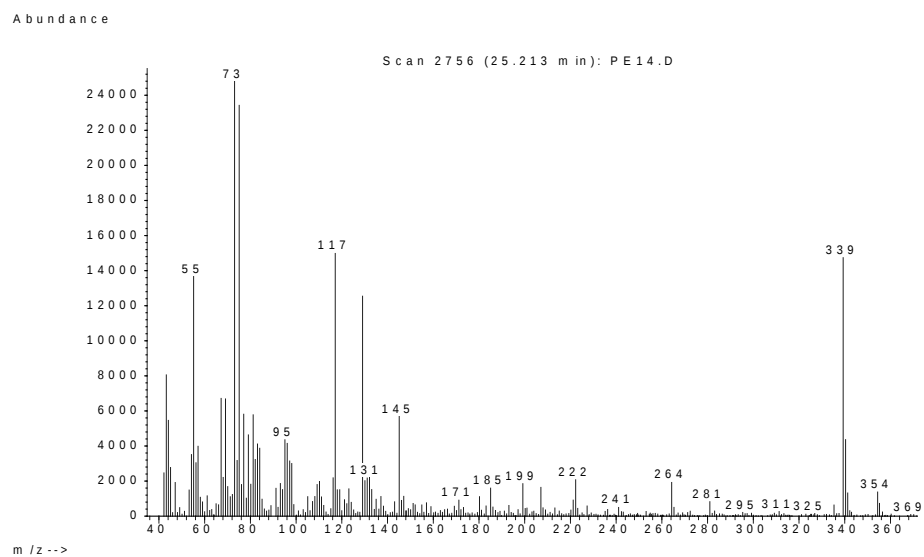
Anexo 3. Espectro de masas del ácido tetracosanoico



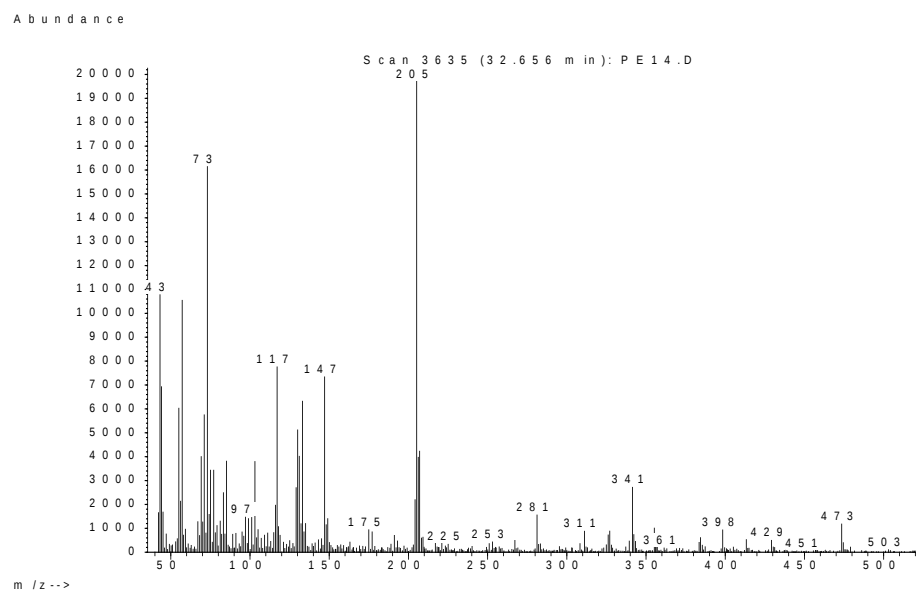
Anexo 4. Espectro de masas del ácido caféico



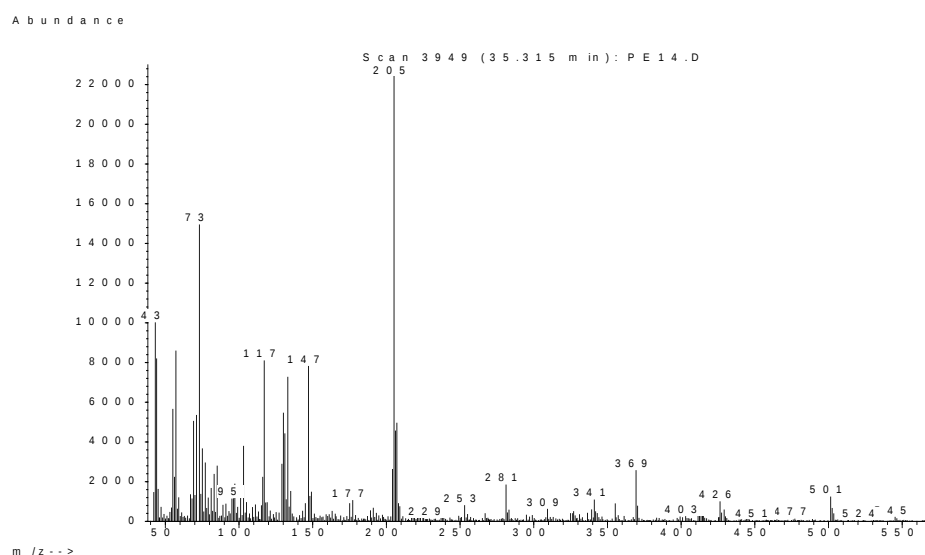
Anexo 5. Espectro de masas del ácido oleico



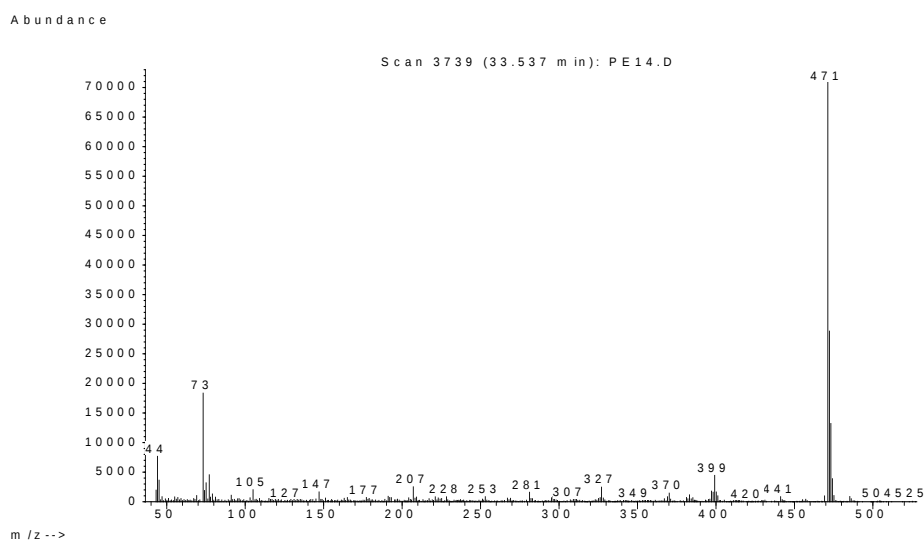
Anexo 6. Espectro de masas del 1-octadecil glicerol



Anexo 7. Espectro de masas del eicosylglicerol

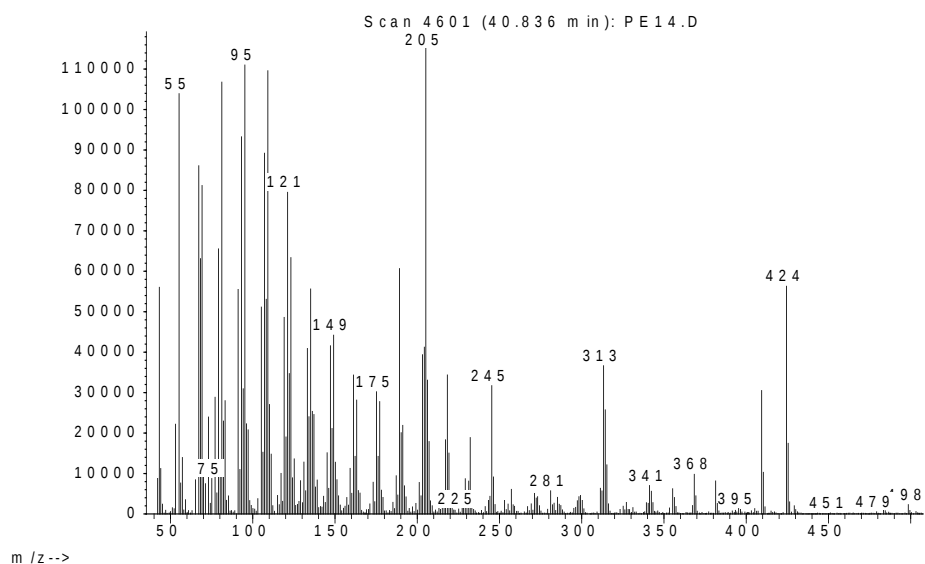


Anexo 8. Espectro de masas de 1,6,8-trihidroxi-3-metilantraquinona



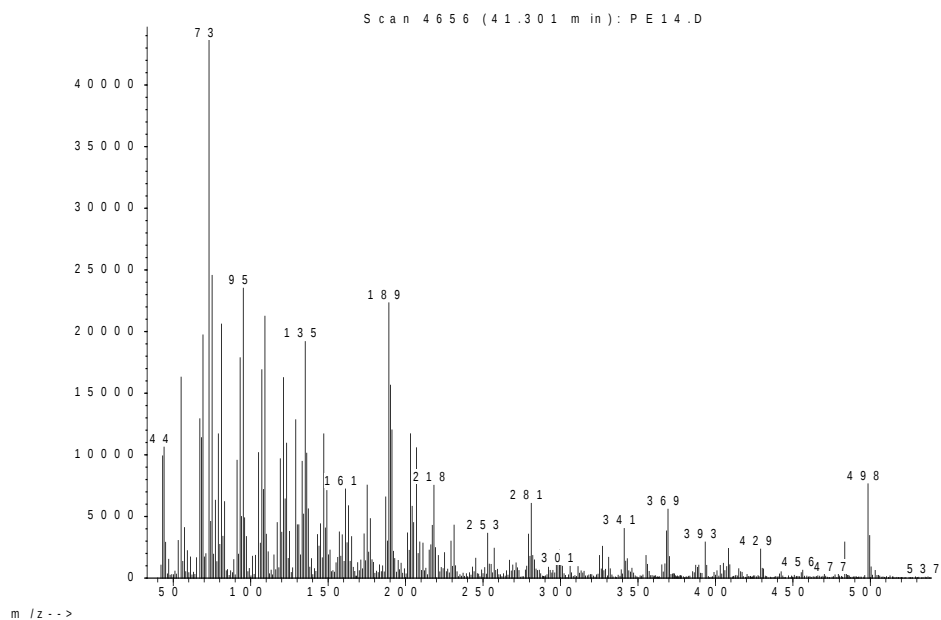
Anexo 9. Espectro de masas de la lupenona

Abundance

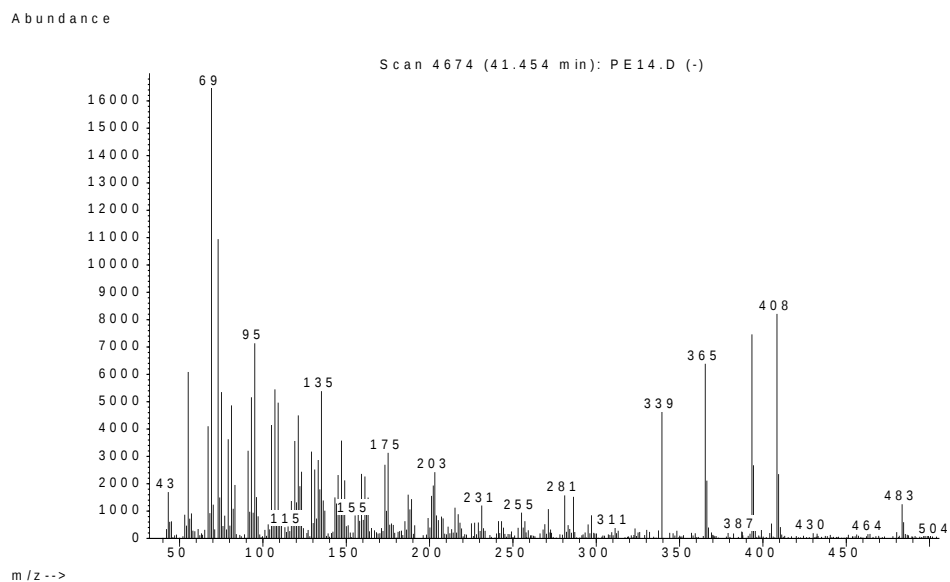


Anexo 10. Espectro de masas del lupeol

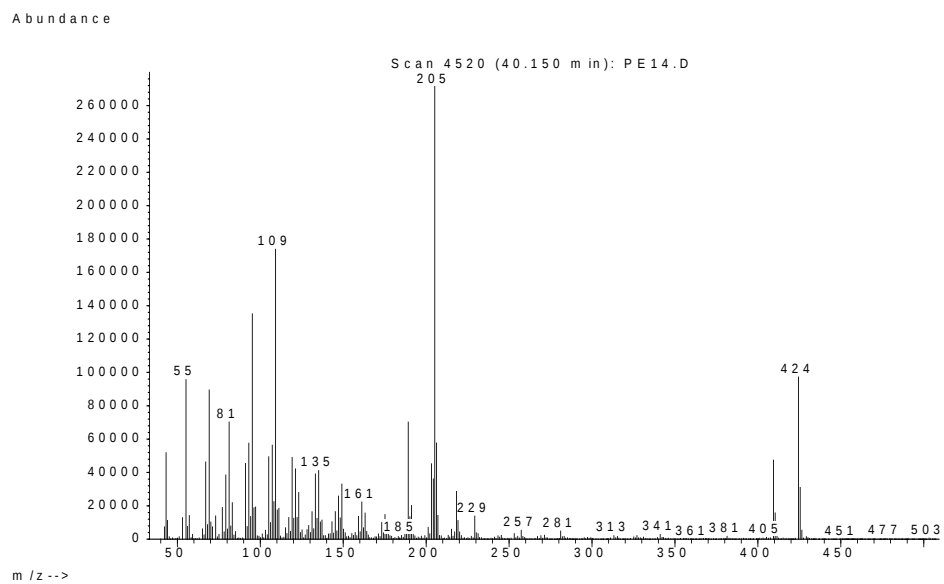
Abundance



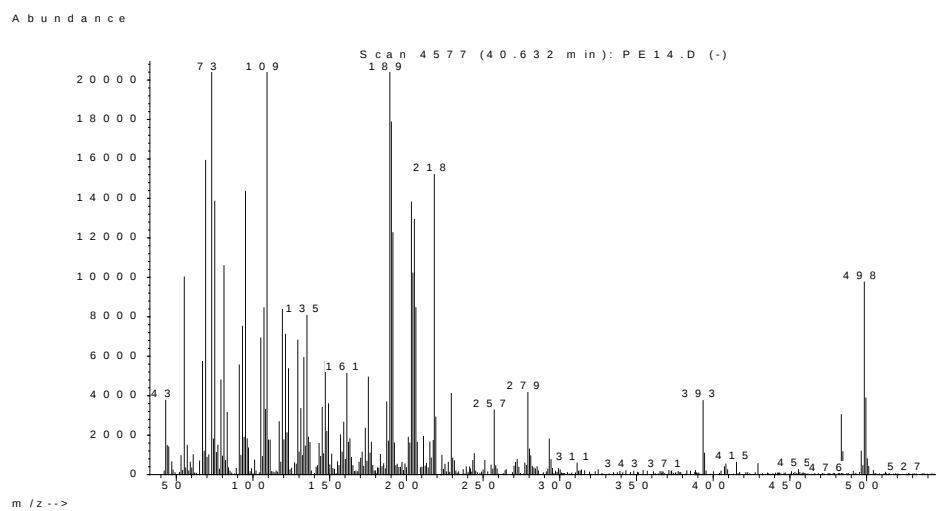
Anexo 11. Espectro de masas del cicloartenol



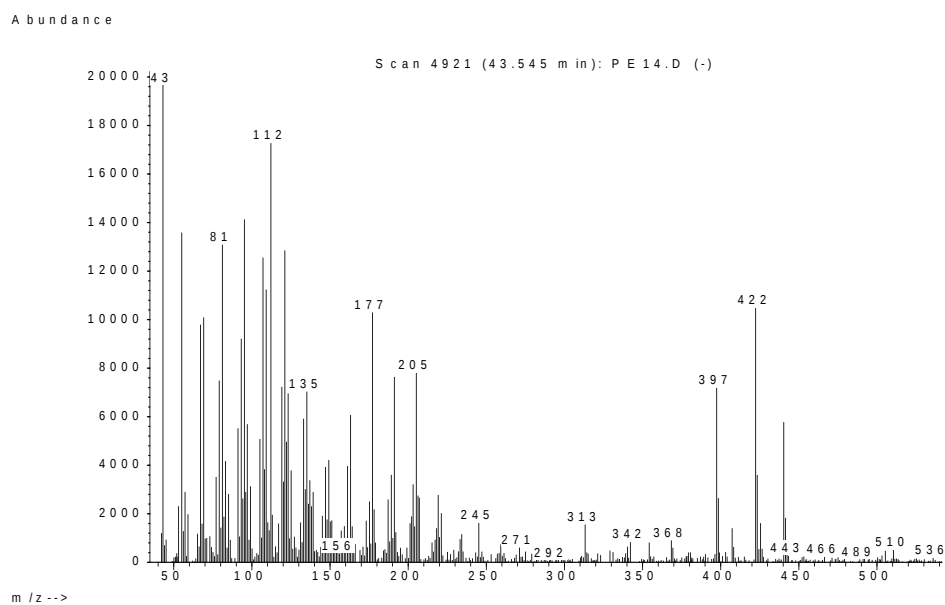
Anexo 12. Espectro de masas de la señal rotulada con el número 26



Anexo 13. Espectro de masas de la señal rotulada con el número 28

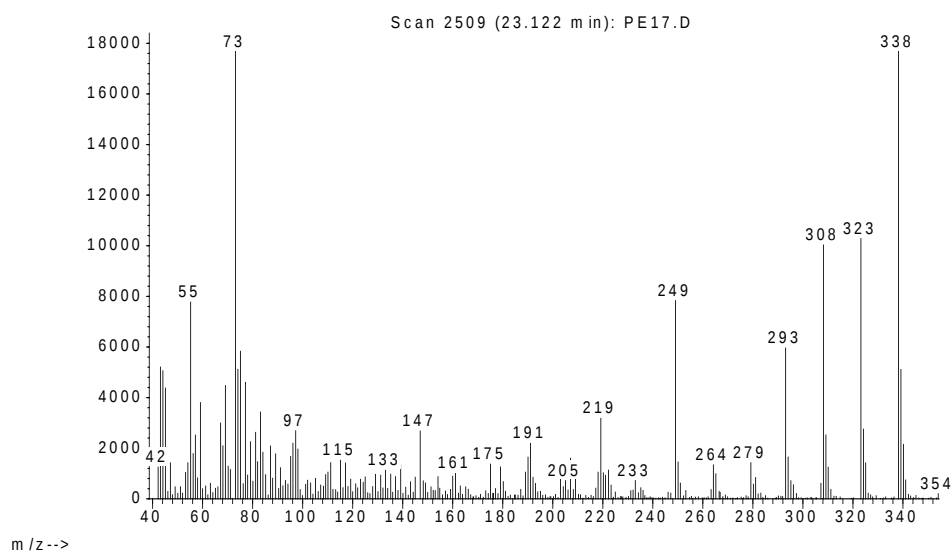


Anexo 14. Espectro de masas de la señal rotulada con el número 32



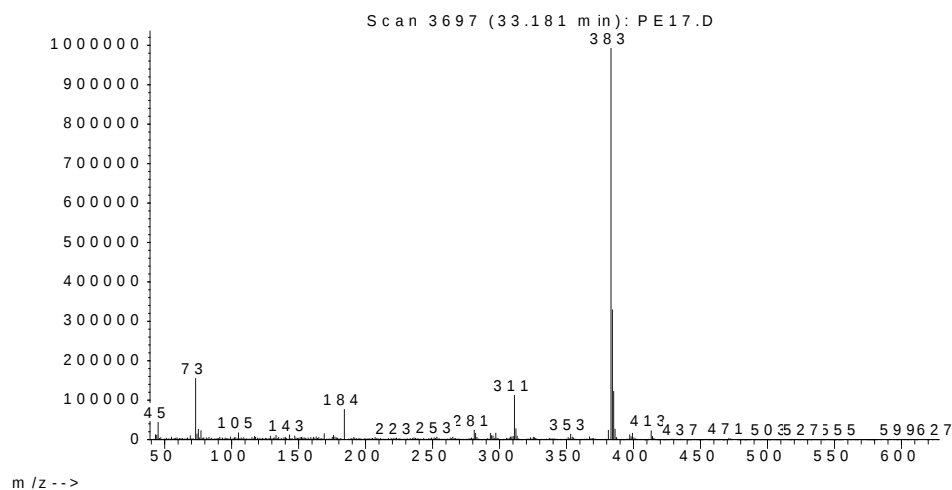
Anexo 15. Espectro de masas de la señal rotulada con el número 16 para la muestra 17

Abundance



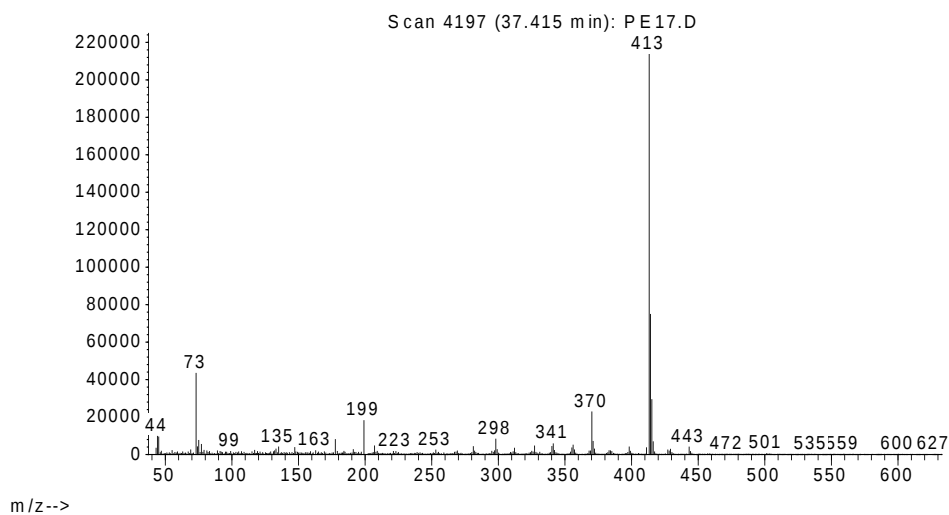
Anexo 16. Espectro de masas de la señal rotulada con el número 34 para las muestras 17 y 19

Abundance



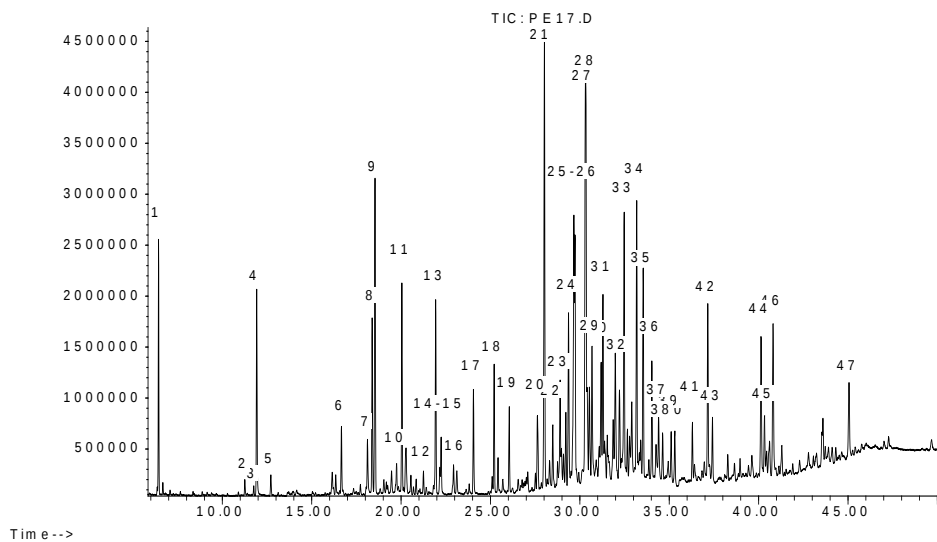
Anexo 17. Espectro de masas de la señal rotulada con el número 43 para la muestras 17 y 40 para la muestra 19

Abundance

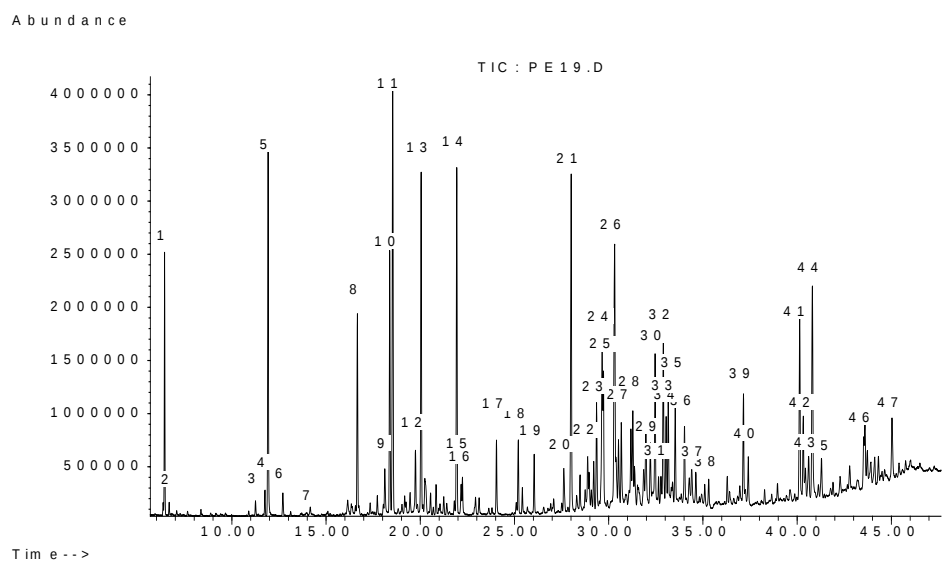


Anexo 18. Cromatograma gaseoso obtenido para la muestra 17

Abundance



Anexo 19. *Cromatograma gaseoso obtenido para la muestra 19*



Anexo 20. *mgEAG/g PE-14 de las diferentes muestras Folin-Ciocalteu.*

P14			P17			P19		
mg en los 200 microlitros tomados	mg en los 0,1 g que se pesó para lograr 10 mg/ml	mg de fenólicos por cada 1 g de extracto de propóleos	mg en los 200 microlitros tomados	mg en los 0,1 g que se pesó para lograr 10,03 mg/ml	mg de fenólicos por cada 1 g de extracto de propóleos	mg en los 200 microlitros tomados	mg en los 0,1 g que se pesó para lograr 10,03 mg/ml	mg de fenólicos por cada 1 g de extracto de propóleos
0,1172	5,86	58,6	0,1074	5,37	53,7	0,1198	5,99	59,9
0,1364	6,82	68,2	0,1282	6,41	64,1	0,1334	6,67	66,7
0,1396	6,98	69,8	0,128	6,4	64	0,1388	6,94	69,4

Se decide repetir partiendo de muestras más diluidas por salirse los valores de absorbancia de la recta de la curva de calibración. Por tanto los resultados que se tomaron fueron estos.

P14			P17			P19		
mg en los 200 microlitros tomados	mg en los 0,05 g que se pesó para lograr 10 mg/ml	mg de fenólicos por cada 1 g de extracto de propóleos	mg en los 200 microlitros tomados	mg en los 0,05 g que se pesó para lograr 10 mg/ml	mg de fenólicos por cada 1 g de extracto de propóleos	mg en los 200 microlitros tomados	mg en los 0,05 g que se pesó para lograr 10 mg/ml	mg de fenólicos por cada 1 g de extracto de propóleos
0,0718	3,59	71,8	0,0598	2,99	59,8	0,0664	3,32	66,4
0,0686	3,43	68,6	0,063	3,15	63	0,0722	3,61	72,2
0,0664	3,32	66,4	0,0662	3,31	66,2	0,0716	3,58	71,6

Fuente: Autores

Anexo 21. % DPPH remanente a diferentes concentraciones.

P-14				
	% DPPH remanente (0,5 mg/mL)	% DPPH remanente (0,3 mg/mL)	% DPPH remanente (0,1 mg/mL)	% DPPH remanente (0,05 mg/mL)
T=30 min	92,57	92,12	57,01	42,15
	93,15	92,93	56,53	33,02
	94,02	92,53	55,39	40,06
Media	93,24	92,53	56,31	38,41
P-17				
	% DPPH remanente (0,5 mg/mL)	% DPPH remanente (0,3 mg/mL)	% DPPH remanente (0,1 mg/mL)	% DPPH remanente (0,05 mg/mL)
T=30 min	94,07	92,55	46,18	39,26
	93,59	91,98	48,47	38,01
	93,97	93,03	48,66	39,92
Media	93,88	92,52	47,77	39,06
P-19				
	% DPPH remanente (0,5 mg/mL)	% DPPH remanente (0,3 mg/mL)	% DPPH remanente (0,1 mg/mL)	% DPPH remanente (0,05 mg/mL)
T=30 min	76,52	77,05	52,88	38,71
	76,93	79,88	49,95	35,08
	77,54	68,05	45,80	33,37
Media	77,00	74,99	49,54	35,72

Fuente: Autores

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, A.E. and Roozen, J.P. (1999). *Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion*, Food Chemistry.

Alaribe, C. S., Oladipupo, A., Adisa, O. O., Okeoma, C., Adeyeye, A. O. & Rastrelli, L. (2016). *Comparative qualitative and quantitative analysis of flavonoids in propolis samples from two regions in Nigeria*. *Planta Medica*, 81(S 01), P145.

Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017). *Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region*. *Food Research International*.

Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., & Lamuela-Raventos, R. M. (2010). *Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables*. *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*.

Angulo Vaca, J. B. (2014). *Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la empresa Apicare-Riobamba*. (Bachelor's thesis).

Audier, H.E.; Beugelmans, R.; Das, B.C. *Mass spectrometry of tetracyclic triterpenes. Part II. The lanostane group: influence of the 9:19-cyclopropene ring*. *Tetrahedron Letters*, 1966, 36, 4341-4347.

Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. Atenea (Concepción).

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., & Papotti, G. (2016). *Standard methods for Apis mellifera propolis research*. *Journal of Apicultural Research*.

Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C., & Popov, S. (1995). *Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis*. *Zeitschrift für Naturforschung*.

Bankova, V.; De Castro, S. L.; Marcuccic, M. C. (2000). *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin*. *Apidologie*.

Barron-Yanez, R. M., del Rosario Garcia-Mateos, M., Soto-Hernández, M. R., Colinas-Leon, T., & Kite, G. (2011). *Flavonoids and antioxidant activity of Calia secundilfora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(3).

Bawazeer, N. A., Choudary, H., Zamzami, M. A., Abdulaal, W. H., Zeyadi, M., ALbukhari, A., ... & Moselhy, S. S. (2017). *Possible regulation of LDL-receptor by*

naringenin in HepG2 hepatoma cell line. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines.

Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., & Rodriguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense.*

Billion (2018). *Cosmetics & Toiletries.*

Blonds, M. S. (1958). *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. Scientific Research. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices.*

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology.*

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). *Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology.*

Budryn, G.; Nebesny, E. (2005), *Structure and antioxidant properties of coffee bean polyphenols.* Bromat. Chem. Toksykol.

Budzikiewics, H.; Wilson, J.M.; Djerassi, C. Mass Spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J.Am.Chem.Soc.*, 1963, 85, 3688-3699.

Calegari, M. A., Prasniewski, A., SILVA, C. D., Sado, R. Y., Maia, F., Tonial, L., & Oldoni, T. L. (2017). Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. *Anais da Academia Brasileira de Ciências, (AHEAD)*, 0-0.

Campo, M.; Cuesta, O.; and Rosado, A. J. GC-MS Determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples . *Agric. Food Chem.* 2008, 56, 9927 - 9932.

Carpio C. & Barragán Á. (2008), *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador: Plantas apícolas.*

Castillo Espinoza, J. C. (2014), Doctoral dissertation, *Determinación del efecto vasodilatador de plantas y propóleos utilizados en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.*

Charalampos Proestos; Michael Komaitis. Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation. [Foods](#). 2013 Mar; 2(1): 90–99)

- Cos, P.; Rajan, P.; Vedernikova, I.; Calomme, M.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Augustyns, K.; Haemers, A.; Vanden Berghe, D. (2002), *In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives*. *Free Radic. Res.*
- Cuesta-Rubio, O. “Estudio químico de propóleos cubanos”. Tesis en opción al título de doctor en Ciencias Farmacéuticas. Ciudad de La Habana, 2001.
- Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. (1996), *Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary*.
- Dărăban, A., Olah, N. K., Câmpean, R. F., Furtuna, F., Cobzac, C., Dehelean, G.,... & Hanganu, D. (2015). *Comparative Study Of Polyphenols From Propolis Extracts Of Different Origin*. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia*, 60.
- De Groot, A. C. (2013). Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24(6), 263-282.
- De Groot, A. C. (2013). *Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects*. *Dermatitis*.
- De la Torre, L. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Duke, C. C., Tran, V. H., Duke, R. K., Abu-Mellal, A., Plunkett, G. T., King, D. I. & Bruhl, J. J. (2017). A sedge plant as the source of Kangaroo Island propolis rich in prenylated p-coumarate ester and stilbenes. *Phytochemistry*, 134, 87-97.
- El Sohaimy, S. A., & Masry, S. H. D. (2014). *Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian and Chinese propolis*. *American-Eurasian J. Agric & Environ. Sci.*
- Elnager, A. M., Sulaiman, S. A., & Abdullah, W. Z. (2017). Quantitation of Caffeic Acid Phenethyl Ester and in vitro Haemostatic Activities of Malaysian *Trigona itama* propolis. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 10(1), 16-24.
- Evans W. C. (2009). *Trease and Evans' Pharmacognosy*, Elsevier, 16th Edition.
- Fernández, M. C., Rubio, O. C., & Pérez, A. R. (2012). *Estudio químico de propóleos rojos cubanos*. Editorial Universitaria.
- Fernández, M. C., Rubio, O. C., & Pérez, A. R. (2012). *Estudio químico de propóleos rojos cubanos*. Editorial Universitaria.
- Fernández-Ferreira, M.; Novais, J.M.; Salomé, P.M. Free terpenols and sterols produced by in vitro cultures and laticifer from *Euphorbia characias*. *Phytochemistry*, 1990, 29(6), 1855-1860.

- Ferreira, J. M., Fernandes-Silva, C. C., Salatino, A., Negri, G., & Message, D. (2017). New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Gawlik-Dziki, U. (2004), *The effect of cooking on composition and antioxidant activity of phenolic acids isolated from broccoli*. *Annal. UMCS*.
- Granato, D., Sousa, J., Galvão, L., & Sávio, D. (2016). *Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices*. *ScienceDirect*.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1988). Composition of propolis in Oxfordshire, UK and its relation to poplar bud exudate. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 43(3-4), 301-304.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee world*, 71(3), 107-118.
- Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F.R. (1990). *The composition and plant origins of propolis: a report of work*. *Bee world*.
- Hausen BM. (2005). Evaluation of the main contact allergens in propolis (1995to 2005). *Dermatitis*.
- Heinzen, H.; De Vries, J.X; Moyna, P.; Remberg, G.; Martínez, R.; Tietze, L.F. Mass spectrometry of labelled triterpenoids: thermospray and electron impact ionization analysis. *Phytochemical analysis*, 1996, vol 7, 237-244.
- I. R. C. Bick and C. Rhee .Anthraquinone pigments from *Phoma foveata* Foister. *Biochem J*. 1966 Jan; 98(1): 112–116.
- Jain, S., Marchioro, G., Mendonça, L., Batista, M., & Araujo, E. (2014). *Botanical origin of the Brazilian red propolis: A new approach using DNA analysis*. *Journal of Apicultural Science*.
- Jong-Sung, P., & Kun-Suk, W. (1997). *The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea*. In *Bee Products*.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., & Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116(2), 452-461.
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). *Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium’s health*. *International journal of food science & technology*.
- Klein, B. P., & Kurilich, A. C. (2000). *Processing effects on dietary antioxidants from plant foods*. *HortScience*.

- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba, G. (2013). *Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis*. *Molecules*.
- Leja, M.; Mareczek, G.; Wyzgolik, G.; Klepacz-Baniak, J.; Czekońska, K. (2007), *Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species*. *Food Chem*.
- Liu, R. H. (2003). *Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals*. *American Journal of Clinical Nutrition*.
- López, B. G.-C., Schmidt, E. M., Eberlin, M. N., & Sawaya, A. C. H. F. (2014). *Phytochemical markers of different types of red propolis*. *Food Chemistry*.
- LÓPEZ, E. R. (2015). Doctoral dissertation, *Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante de propóleos de distintos orígenes*.
- Ludwig, I., Bravo, J., Paz de Peña, M., & Cid, C. (2013). *Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee*. *ScienceDirect*.
- Makarska, E.; Michalak, M. (2005), *Antioxidant activity of phenolic acids of spring barley*. *Annal. UMCS*.
- Mangold H.K and Paltauf F. Ethers lipids. Biochemical and biomedical aspects. Edit Academic press, 1983.
Consulatdo:<https://books.google.com.ec/books?isbn=0323149723>
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83-99.
- Markham, K. R., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., & Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. *Phytochemistry*, 42(1), 205-211.
- Marquez Hernandez, I., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rosado Perez, A., Montes de Oca Porto, R., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2010). Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4725-4730.
- Martínez, E. G., Segovia, I. F., & López, A. F. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. *Nutr Hosp*, 17(6).
- Massaro, C. F., Katouli, M., Grkovic, T., Vu, H., Quinn, R. J., Heard, T. A.,... & Brooks, P. (2014). *Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis*

of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia*.

Mirzoeva, O. K., & Calder, P. C. (1996). *The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55(6), 441-449.

Montani, M. S. G., Granato, M., Cuomo, L., Valia, S., Di Renzo, L., D'Orazi, G., & Cirone, M. (2016). *High glucose and hyperglycemic sera from type 2 diabetic patients impair DC differentiation by inducing ROS and activating Wnt/ β -catenin and p38 MAPK. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*.

Muñoz, Ó., Torres, G., Núñez, J., de la Rosa, L., Rodrigo, J., Ayala, J. F., & Álvarez, E. (2017). *Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*.

Münstedt, K., Hellner, M., Hackethal, A., Winter, D., & Von Georgi, R. (2007). *Contact allergy to propolis in beekeepers. Allergologia et immunopathologia*, 35(3), 95-100; Walgrave SE, Warshaw EM, Glesne LA. (2005) *Allergic contact dermatitis from propolis. Dermatitis*.

Nishikawa, S., Aoyama, H., Kamiya, M., Higuchi, J., Kato, A., Soga, M. & Tsuda, T. (2016). *Artepillin C, a Typical Brazilian Propolis-Derived Component, Induces Brown-Like Adipocyte Formation in C3H10T1/2 Cells, Primary Inguinal White Adipose Tissue-Derived Adipocytes, and Mice. PloS one*, 11(9), e0162512.

Oliveira, J. M. D. S., Nascimento, T. G. D., Souza, N. S. D., Mousinho, K. C., Barreto, F. S., Porto, I. C. C. D. M. & Basílio-Júnior, I. D. (2016). *Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells*.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative medicine and cellular longevity*.

Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). *Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2502-2506.

Peña, Raúl C. (2008). *Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Ciencia e investigación agraria*.

Penning, A. (2013). *Demand for Organic Beauty to Grow to Over*.

Piccinelli, A. L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., & Rastrelli, L. (2011). *Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array*

detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcuzzan, G. L., & Sabatini, A. G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38(3), 306-306.

Popova, M., Trusheva, B., & Bankova, V. (2017). Content of biologically active compounds in Bulgarian propolis: a basis for its standardization. *Bulgarian chemical communications*, 49, 115-120.

Popova, M.; & et al. A Validated Spectrophotometric Method for Quantification of Prenylated Flavanones in Pacific Propolis from Taiwan. *Phytochem.* 2010, 21, 186 - 191.

Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcuzzan, G.L.; Bogdanov, S. Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcuzzan, G.L.; Bogdanov, S. (2003). *Poplar type propolis and analysis of its biologically active components*. *Honeybee Sci*.

Ramnath, Venkataramgowda, y Singh (2015). Chemical composition of bee propolis collected from different regions in India by GCMS analysis. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.

Ramos, A. F. N., & Miranda, J. D. (2007). *Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*.

Rebiai, A., Belfar, M. L., Mesbahi, M. A., Nani, S., Tliba, A., Amara, D. G., & Chouikh, A. (2017). FATTY ACID COMPOSITION OF ALGERIAN PROPOLIS. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(3), 1656-1671.

Revista de Química, ISSN 2173-0903 (2012), *Radicales libres*, Sevilla, España, Universidad Pablo de Olavide.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996), *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid*. *Free Radic. Biol. Med*.

Ringuelet J. y Viña S. (2008), *Productos Naturales Vegetales*, Editorial de la Universidad de La Plata, Universidad Nacional de La Plata, Facultad De Ciencias Agrarias Y Forestales.

Roberto, M. M., Jamal, C. M., Malaspina, O., & Marin-Morales, M. A. (2016). Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genetics and molecular biology*, 39(2), 257-269.

- Roginsky, V., y Lissi, E. A. (2005). *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*. *Food Chemistry*.
- Said, S. A., Khan, S. A., Ahmad, I., & Ali, H. S. (2006). Chemical composition of Egyptian and UAE propolis. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19(1), 58-61.
- Salamanca Grosso, G., Correa Carvajal, I. L., & Principal, J. (2007). *Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos*. *Zootecnia Tropical*.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). *Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*. *Food Science and Technology International*.
- Sanpa, S., Popova, M., Tunkasiri, T., Eitssayeam, S., Bankova, V., & Chantawannakul, P. (2017). Chemical Profiles and Antimicrobial Activities of Thai Propolis Collected from *Apis mellifera*. *CHIANG MAI JOURNAL OF SCIENCE*, 44(2), 438-448.
- Scheller, S.; Wilczok, T.; Imielski, S.; Król, W.; Gabryś, J.; Shani, J. (1990). *Free radical scavenging by ethanol extract of propolis*. *Int. J. Radiat. Biol.*
- Schmidt, E. M., Stock, D., Chada, F. J. G., Finger, D., Christine Helena Frankland Sawaya, A., Eberlin, M. N. & Torres, Y. R. (2014). A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *BioMed research international*, 2014.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H. and Tijburg, L. (2001), *Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds*, *Eur. Food Res. Technol*
- Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2016). Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S425-S428.
- Siquet, C.; Paiva-Martins, F.; Lima, J.L.; Reis, S.; Borges, F. (2006), *Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-a structure-activity relationship study*.
- Soltani, E. K., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M. A., & Zerroug, M. M. (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & shellfish immunology*, 62, 57-67.
- Soltani, E. K., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M. A., & Zerroug, M. M. (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal

activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & shellfish immunology*, 62, 57-67.

Talla, E., Tamfu, A. N., Gade, I. S., Yanda, L., Mbafor, J. T., Laurent, S. & Bankova, V. (2017). New mono-ether of glycerol and triterpenes with DPPH radical scavenging activity from Cameroonian propolis. *Natural product research*, 31(12), 1379-1389.

Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2001). *HPLC– DAD– ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Valadão, A. F., Dos Reis, G. S., De Lima, L. R. P., & Moreira, M. L. (2009). Preparación de un protector solar y evaluación de la acción fotoprotectora del propóleo verde del Vale do Aço, Minas Gerais, Brasil. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*.

Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez Escalante, J. J., & Sánchez-Escalante, A. (2014). *Mecanismos Involucrados En La Actividad Antioxidante Y Antibacteriana Del Propóleos. Biotecnia*.

Veiga, R. S., De Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A., ... & Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of applied microbiology*, 122(4), 911-920.

Veloz, J. J., Saavedra, N., Lillo, A., Alvear, M., Barrientos, L., & Salazar, L. A. (2015). Antibiofilm activity of Chilean propolis on *Streptococcus mutans* is influenced by the year of collection. *BioMed research international*.

Volpi, N. (2004) *Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis*.

Wagner H., Bladt S. (1996). *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas*, 2^a ed. Berlin, Springer.

Wali, A. F., Mushtaq, A., Rehman, M. U., Akbar, S., & Masoodi, M. H. (2017). BEE PROPOLIS (BEE'S GLUE): A phytochemistry review. *Journal of Critical Reviews*, 4(4).

Wanjari N., Waghmare J. *A Review on Latest Trend of Cosmetics-Cosmeceuticals. International Journal of Pharma Research & Review*, May 2015.

Zhang, C., Shen, X., Chen, J., Jiang, X., & Hu, F. (2017). Identification of Free Radical Scavengers from Brazilian Green Propolis Using Off-Line HPLC-DPPH Assay and LC-MS. *Journal of Food Science*.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

UNIDAD DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS

Autores:

María Augusta Verdugo Torres
Bruno Esteban Tola Álvarez

Dirigido por:

Lic. Ingrid Márquez Hernández PhD.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE VARIOS EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE LA ZONA SUR DEL ECUADOR

El propóleo es una sustancia resinosa colectada por las abejas de diferentes árboles y plantas. El objetivo de la investigación fue establecer la relación existente entre la capacidad antioxidante y la composición química de varios extractos de propóleos para su aplicación en la industria cosmética, colectados en diferentes lugares de la provincia del Azuay, Ecuador.

En cuanto al contenido total de fenoles PE-19 mostró los valores más elevados de polifenoles (mgEAG) por cada gramo de muestra analizada, seguido de la PE-14 y con el menor valor el extracto PE-17. Los extractos de propóleos (EP) mostraron variable actividad antioxidante determinada con el radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) Los resultados obtenidos mostraron que todos los extractos lograron reducir el 50% de la concentración de DPPH a concentraciones inferiores a los 0,2 mg/mL. La muestra PE-14 logra la mayor eficiencia como antioxidante, dado que presenta el menor valor de dicho parámetro. Le continúa la PE-17 y con la menor eficiencia se presenta la muestra PE-19. La presencia de compuestos fenólicos, sin embargo, apreciando los resultados del estudio de CG-EM, son pocos los metabolitos de tal naturaleza y, además, están en bajas concentraciones. En términos generales, las muestras en estudio se destacan por presentar una composición química muy diversa, en tal sentido no se pudo encontrar una relación entre la actividad antioxidante y la composición química de las muestras de propóleos.