



**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

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS
DE PROPÓLEOS DE LA REGIÓN DEL AUSTRO
ECUATORIANO**

Autores:

Andrea Del Rocío Buestán Orellana

María Luisa Torres Sigüenza

Dirigido por:

Osmany Cuesta Rubio, Ph. D

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA
Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE LA
REGIÓN DEL AUSTRO ECUATORIANO**

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE
PROPÓLEOS DE LA REGIÓN DEL AUSTRO
ECUATORIANO**

ANDREA DEL ROCÍO BUESTÁN ORELLANA

Bioquímica Farmacéutica
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas
Universidad Politécnica Salesiana

MARÍA LUISA TORRES SIGÜENZA

Bioquímica Farmacéutica
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas
Universidad Politécnica Salesiana

Dirigido por:

OSMANY CUESTA RUBIO, PH. D

Licenciado en Ciencias Farmacéuticas
Máster en Química Farmacéutica
Doctor en Ciencias Farmacéuticas



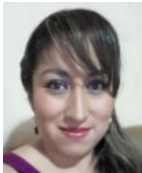
Datos de catalogación bibliográfica

**BUESTÁN ORELLANA ANDREA DEL ROCÍO
TORRES SIGÜENZA MARÍA LUISA**

Estudio de la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos de la región del austro ecuatoriano

Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca – Ecuador, 2018
MAESTRIA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMETICAS
Formato 170 x 240 mm Páginas: 108

Breve reseña de los autores e información de contacto:



Andrea del Rocío Buestán Orellana
Bioquímica Farmacéutica
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas
Universidad Politécnica Salesiana
arbo101@hotmail.com



María Luisa Torres Sigüenza
Bioquímica Farmacéutica
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas
Universidad Politécnica Salesiana
malu_torres28@hotmail.com



Lic. Osmany Cuesta Rubio PhD
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas
Máster en Química Farmacéutica
Doctor en Ciencias Farmacéuticas
osmanycuesta@yahoo.com

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados, puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los tutores.

DERECHOS RESERVADOS

©2018 Universidad Politécnica Salesiana

CUENCA-ECUADOR-SUDMAMÉRICA

Estudio de la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos de la región del austro ecuatoriano

IMPRESO EN ECUADOR – PRINTED IN ECUADOR

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
DEDICATORIA.....	XV
AGRADECIMIENTO.....	XVII
RESUMEN.....	XIX
ABSTRACT	XXI
CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Presentación y planteamiento del problema	1
1.2 Antecedentes teóricos relacionados con el problema planteado.....	1
1.3 Justificación de la investigación.....	3
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo general	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
1.5 Hipótesis.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2 MARCO TEÓRICO	5
2.1 Estado del arte	5
2.2 Propóleos. Generalidades	6
2.2.1 Definición y origen de los propóleos.....	6
2.2.2 Usos tradicionales de los propóleos.....	9
2.2.3 Fuentes vegetales que originan los propóleos	10
2.3 Composición química.....	11
2.3.1 Ácidos Fenólicos	12
2.3.2 Flavonoides.....	12
2.3.3 Ácidos cumáricos y acetofenona	13

2.4	Actividad biológica de propóleos	15
2.4.1	Métodos de difusión en agar.....	15
2.4.2	Métodos de bio-autografía.....	16
2.4.3	Métodos de dilución	16
2.4.4	Otros métodos.....	17
2.5	Usos en cosméticos de los propóleos	17
2.6	Microorganismos: hongos y levaduras	18
2.6.1	<i>Candida albicans</i>	18
2.6.2	<i>Aspergillus niger</i>	18
2.6.3	<i>Malassezia furfur</i>	19
2.7	Conservantes cosméticos.....	19
2.8	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	21
2.8.1	Aplicaciones CG/EM.....	22
CAPÍTULO III		23
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1	Recolección de muestras	23
3.2	Preparación de extractos.....	23
3.3	Cromatografía en capa delgada (CCD)	24
3.4	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	25
3.5	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo	26
3.5.1	Viabilización de las cepas ATCC.....	26
3.5.2	Preparación del inóculo fúngico	27
3.5.3	Control positivo	28
3.5.4	Control negativo	28
3.5.5	Concentración Mínima Inhibitoria	28
CAPÍTULO IV		31
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1	Obtención y rendimiento de los extractos de propóleos	31
4.2	Análisis de cromatografía en capa delgada (CCD).....	32

4.3	Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).....	36
4.4	Análisis de concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo.....	45
4.5	Relación existente entre la composición química de los extractos de propóleos y la concentración mínima inhibitoria	63
4.5.1	Relación entre el porcentaje de polioles, diterpenos y triterpenos frente a la CMI para <i>Aspergillus niger</i>	64
4.5.2	Relación entre el porcentaje de polioles, diterpenos y triterpenos frente a la CMI para <i>Candida albicans</i> y <i>Malassezia furfur</i>	68
CAPÍTULO V		75
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
5.1	Conclusiones.....	75
5.2	Recomendaciones	77
ANEXOS.....		79
BIBLIOGRAFÍA.....		103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ácido Benzoico.	12
Figura 2.- Flavanona.....	13
Figura 3.- Ácido Caféico.	14
Figura 4.- Microplaca de 96 pocillos.....	29
Figura 5.- Revelado cromatográfico con vainillina al 1% en etanol, ácido sulfúrico al 50 % en etanol y calor.	33
Figura 6.- Revelado cromatográfico con luz UV a 254 nm.....	34
Figura 7.- Revelado cromatográfico con luz UV a 365 nm.....	34
Figura 8.- Cromatograma gaseoso de la muestra PE-15.	37
Figura 9.- Cromatograma gaseoso de la muestra PE-16.	40
Figura 10.- Cromatograma gaseoso de la muestra PE-18.	43
Figura 11.- Absorbancias vs. Concentración de PE-15 a (i) 450nm y (ii) 630nm para <i>Aspergillus niger</i>	52
Figura 12.- Absorbancias vs. Concentración de PE-16 a (i) 450nm y (ii) 630nm para <i>Aspergillus niger</i>	53
Figura 13.- Absorbancias vs. Concentración de PE-18 a (i) 450nm y (ii) 630nm para <i>Aspergillus niger</i>	54
Figura 14.- Determinación de la CMI para el hongo <i>Aspergillus niger</i>	58
Figura 15.- Determinación de la CMI para el hongo <i>Candida albicans</i>	60
Figura 16.- Determinación de la CMI para el hongo <i>Malassezia furfur</i>	62
Figura 17.- Relación entre el % de polioles y la CMI para <i>Aspergillus niger</i>	65
Figura 18.- Relación entre el % de diterpenos y la CMI para <i>Aspergillus niger</i>	66
Figura 19.- Relación entre el % de triterpenos y la CMI para <i>Aspergillus niger</i> ,	67
Figura 20.- Relación entre el % de polioles y la CMI para <i>Candida albicans</i>	69
Figura 21.- Relación entre el % de polioles y la CMI para <i>Malassezia furfur</i>	69

Figura 22.- Relación entre el % de diterpenos y la CMI para <i>Candida albicans</i>	70
Figura 23.- Relación entre el % de diterpenos y la CMI para <i>Malassezia furfur</i>	70
Figura 24.- Relación entre el % de triterpenos y la CMI para <i>Candida albicans</i>	71
Figura 25.- Relación entre el % de triterpenos y la CMI para <i>Malassezia furfur</i>	71
Figura 26.- Gráfica de intervalos de CMI vs. Propóleos.	72
Figura 27.- ICs simultáneos de 95% de Tukey.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Fuentes vegetales de propóleos de diferente origen geográfico	11
Tabla 2.- Límites de contenido microbiológico de productos cosméticos.....	20
Tabla 3.- Datos de recolección de las muestras de propóleos.....	23
Tabla 4.- Método de Activación de las cepas ATCC.....	26
Tabla 5.- Concentración final de los extractos de propóleos en la microplaca.....	29
Tabla 6.- Rendimiento de los extractos secos de propóleos.	31
Tabla 7.- Relación entre el color y la posible estructura de los compuestos químicos.	35
Tabla 8.- Compuestos identificados en el análisis de la muestra PE-15 por CG/EM.	38
Tabla 9.- Compuestos identificados en el análisis de la muestra PE-16 por CG/EM.	41
Tabla 10.- Compuestos identificados en el análisis de la muestra PE-18 por CG/EM.	44
Tabla 11.- Absorbancias a 450nm y 630nm para <i>Aspergillus niger</i>	46
Tabla 12.- Absorbancias a 450nm y 630nm para <i>Candida albicans</i>	48
Tabla 13.- Absorbancias a 450nm y 630nm para <i>Malassezia furfur</i>	50
Tabla 14.- CMI de cada propóleos para <i>Aspergillus niger</i> a 450nm y 630nm.	56
Tabla 15.- CMI de cada propóleo para <i>Candida albicans</i> a 450nm y 630nm.	58
Tabla 16.- CMI de cada propóleo para <i>Malassezia furfur</i> a 450nm y 630nm.	61
Tabla 17.- CMI para cada hongo por tipo de propóleos	62
Tabla 18.- Composición Química de los Propóleos.	63
Tabla 19.- Composición Química de los Propóleos y CMI.....	63
Tabla 20.- Resultados de la regresión lineal realizada en Minitab 18.	64
Tabla 21.- Orden de propóleos frente a la CMI.....	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1,- Espectro de masas del trimetilsilil éter de glicerol,.....	79
Anexo 2,- Espectro de masas del ácido málico, tris-TMS,	79
Anexo 3,- Espectro de masas del butanal 2,3,4-tris(trimetilsilil)oxy-	80
Anexo 4,- Espectro de masas del butane,1,2,3,4-tetrakis(trimetilsilil)oxy-	80
Anexo 5,- Espectro de masas del 4-hidrofeniletanol di-TMS,	81
Anexo 6,- Espectro de masas del xilitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-TMS,.....	81
Anexo 7,- Espectro de masas del d-xylopiranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-TMS,	82
Anexo 8,- Espectro de masas del ácido benzoico, 3,4, -bis [(trimetilsilil)oxy]-, éster trimetilsilil,	82
Anexo 9,- Espectro de masas del D-Fructosa,1,3,4,5,6-pentakis-O-TMS,	83
Anexo 10,- Espectro de masas del Myo-inositol,5-deoxy-1,2,3,4,6-penyakis-O-TMS,	83
Anexo 11,- Espectro de masas del d-galactosa,2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS,	84
Anexo 12,- Espectro de masas del Glucosa, pentakis-O-TMS,	84
Anexo 13,- Espectro de masas del ácido hexanodecanoico, TMS,	85
Anexo 14,- Espectro de masas del ácido cinámico, 4-methoxy--(trimetilsiloxy)-, éster Trimetilsilil,.....	85
Anexo 15,- Espectro de masas del trimetilsilil ,4-bis(trimetilsilil) cinamato,.....	86
Anexo 16,- Espectro de masas del 9,12-ácido octadecenoico (Z,Z)- éster trimetilsilil,	86
Anexo 17,- Espectro de masas del ácido oleico, éster Trimetilsilil,.....	87
Anexo 18,- Espectro de masas del ácido eicosanoico, éster trimetilsilil,.....	87
Anexo 19,- Espectro de masas del isómero 23,.....	88
Anexo 20,- Espectro de masas del ácido docosanoico, éster trimetilsilil,.....	88
Anexo 21,- Espectro de masas del ácido tetracosanoico, éster trimetilsilil,.....	89
Anexo 22,- Espectro de masas del lupan-20(29)-en-3-ona,	89

Anexo 23,- Espectro de masas del silane, (9,19-cyclo-9-beta-lanost-24-en-3-beta-yloxy)trimetil,	90
Anexo 24,- Espectro de masas del 2,3,4-trihydroxybutyric acid tetra TMS,	90
Anexo 25,- Espectro de masas del isómero de 7,	91
Anexo 26,- Espectro de masas del inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS-, epi-.....	91
Anexo 27,- Espectro de masas del Ácido D-glucónico, 2,4,5,6-pentakis-O-TMS-, éster trimetilsilil,	92
Anexo 28,- Espectro de masas del ácido hexanodecanoico, éster trimetilsilil,	92
Anexo 29,- Espectro de masas del ácido octadecanoico - éster trimetilsilil,.....	93
Anexo 30,- Espectro de masas del isómero de 20,	93
Anexo 31,- Espectro de masas del isómero de 23,	94
Anexo 32,- Espectro de masas del compuesto relacionado al heptadecylglycerol,	94
Anexo 33,- Espectro de masas del alfa-D-glucopiranosido, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS-beta-D-fructofuranosyl, 2,3,4,6-tetrakis O-TMS,.....	95
Anexo 34,- Espectro de masas del azúcar,	95
Anexo 35,- Espectro de masas relacionado con 27,	96
Anexo 36,- Espectro de masas del xilitol, 1,2,4,5-pentakis-O-TMS,.....	96
Anexo 37,- Espectro de masas del D-xilosa, tetrakis(trimetilsilil),.....	97
Anexo 38,- Espectro de masas del D-fructosa,1,4,5,6-pentakis-O-TMS,	97
Anexo 39,- Espectro de masas del D-fructosa,1,4,5,6-pentakis-O-TMS (Isómero de 4)	98
Anexo 40,- Espectro de masas del D-manitol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS,	98
Anexo 41,- <i>Espectro de masas del ácido D-glucónico, 2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS,</i>	99
Anexo 42,- Espectro de masas del myo-inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS,	99
Anexo 43,- Espectro de masas del ácido oleico, TMS,	100
Anexo 44,- Espectro de masas del alpha-D-glucopiranosido, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS isómero de 20,	100
Anexo 45,- Espectro de masas del isómero de 22 o compuesto relacionado,	101
Anexo 46,- Espectro de masas del lup-20(29)-en-one,	101

DEDICATORIA

A mi esposo Juan Carlos por su amor y apoyo incondicional, a mis hijos Juan Andrés, Ana Gabriela, Carlos Daniel e Isabella Victoria quienes han sido el motor fundamental para alcanzar esta meta, a mis padres por haberme forjado a ser la persona que soy en la actualidad.

Andrea

A mi esposo Jorge Luis por ser mi compañero de cada nueva aventura y ayudarme a lograr este sueño, a mis hijos Jorgito y Emma por ser mi razón de vivir y lograr todo lo que me propongo, a mi madre por su amor y apoyo en cada momento, a mis suegros por alentarme en cada propósito.

María Luisa

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer primeramente a Dios que ha permitido que culminemos este trabajo de investigación, a nuestro tutor Lic. Osmany Cuesta Rubio PhD por su ayuda, colaboración, tiempo y conocimientos que nos ha brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Un sincero agradecimiento también a la Dra. Inés Malo, al Dr. Pablo Arévalo y al Ing. Jorge Rojas quienes han sido un apoyo fundamental para la culminación de este proyecto.

RESUMEN

Los propóleos son sustancias resinosas o pegajosas elaborados principalmente por abejas de la especie *Apis mellifera* a partir de diferentes fuentes vegetales. La palabra propóleos proviene del griego *pro* que significa (defensa) y de *propolis* (ciudad), lo que se traduce en una sustancia en defensa de las colmenas.

En este trabajo de investigación se determinó la relación entre la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos recolectados de la región del austro ecuatoriano para la identificación de los metabolitos responsables de esta actividad mediante métodos cromatográficos, espectroscópicos y ensayos in vitro, y de esta manera reemplazar en formulaciones cosméticas los ingredientes de origen sintético por aquellos de origen natural.

Se elaboraron extractos metanólicos por maceración, los mismos que fueron analizados por cromatografía en capa delgada (CCD) usando placas de Sílica gel GF₂₅₄, como fase móvil una mezcla de cloroformo:metanol (9:1) y se realizaron dos tipos de revelado, físico y químico. Se empleó además la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) para la identificación y cuantificación relativa de los metabolitos presentes. Asimismo, la actividad antifúngica de los extractos obtenidos se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo frente a las cepas de *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.

En el estudio por CCD las tres muestras presentaron una composición química semejante, con la presencia de grupos cromóforos conjugados entre los que destacan ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas. En el análisis por CG/EM todas las muestras evidenciaron cromatogramas complejos con un total de 44 compuestos identificados para la muestra PE-15, 37 para la muestra PE-16 y 32 para la muestra PE-18 donde se

incluyen azúcares, polioles, ácidos grasos, diterpenos y triterpenos como sus principales componentes. En el estudio de la CMI por microdilución en caldo se encontró que la CMI para inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* fue de 25 mg/mL para la muestra PE-15 y PE-16 y para PE-18 fue de 12,5 mg/mL; la CMI para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* fue de 25 mg/mL para la muestra PE-15, para PE-16 y PE-18 fue de 12,5 mg/mL; la CMI para inhibir el crecimiento de *Malassezia furfur* fue de 25 mg/mL usando la muestra PE-15, para PE-16 fue de 12,5 mg/mL y para PE-18 fue de 0,195mg/mL.

Palabras claves: propóleos, composición química, actividad antifúngica, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Malassezia furfur*.

ABSTRACT

Propolis are resinous or sticky substances made mainly by bees of the species *Apis mellifera* from different plant sources. The word propolis comes from the greek *pro* meaning (defense) and *propolis* (city), which translates into a substance in defense of the beehives.

In this research work, the relationship between the chemical composition and antifungal activity of propolis extracts collected from the Ecuadorian region was determined for the identification of the metabolites responsible for this activity by chromatographic, spectroscopic and in vitro assays, and from this way to replace in synthetic formulations the ingredients of synthetic origin by those of natural origin.

Methanolic extracts were elaborated by maceration, which were analyzed by thin layer chromatography (CCD) using plates of Silica gel GF₂₅₄, as mobile phase a mixture of chloroform:methanol (9:1) and two types of development were carried out, physical and chemical. In addition, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) was used for the identification and relative quantification of the metabolites present. Likewise, the antifungal activity of the obtained extracts was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution in broth against the strains of *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Malassezia furfur*.

In the CCD study, the three samples presented a similar chemical composition, with the presence of conjugated chromophore groups, among which are phenolic acids, flavonoids and coumarins. In the analysis by GC/MS, all the samples showed complex chromatograms with a total of 44 compounds identified for sample PE-15, 37 for sample PE-16 and 32 for sample PE-18, which included sugars, polyols, acids fatty acids, diterpenes and triterpenes as its main components. In the MIC study by broth

microdilution, the MIC to inhibit the growth of *Aspergillus niger* was found to be 25 mg/mL for sample PE-15 and PE-16 and for PE-18 was 12.5 mg/mL; the MIC to inhibit the growth of *Candida albicans* was 25 mg/mL for sample PE-15, for PE-16 and PE-18 it was 12.5 mg/mL; the MIC to inhibit the growth of *Malassezia furfur* was 25 mg/mL using sample PE-15, for PE-16 it was 12.5 mg/mL and for PE-18 it was 0.195 mg/mL.

Key words: propolis, chemical composition, antifungal activity, *Aspergillus niger*, *Malassezia furfur*.

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Presentación y planteamiento del problema

La tendencia actual por productos cosméticos naturales ha hecho que la industria cosmética desarrolle formulaciones con ingredientes de origen natural que sustituyan a los sintéticos que podrían estar causando daños a la salud humana, entre ellos, ingredientes que ayuden a preservar las formulaciones cosméticas de microorganismos contaminantes que deterioran el tiempo de vida útil de los productos cosméticos.

En el Ecuador hay una carencia de conocimientos y estudios de productos derivados de las abejas, como los propóleos, debido a que la mayor parte de apicultores son informales sin ninguna clase de preparación, ni capacitación.

Se desconoce la composición química y propiedades antifúngicas de los propóleos, las mismas que varían de acuerdo a la flora de la región geográfica, la temporada, la forma de recolección y la especie de abeja de la que se colectan los propóleos.

1.2 Antecedentes teóricos relacionados con el problema planteado

La cosmética natural representa todavía una parte minoritaria en comparación con la cosmética convencional, pero en los próximos años según estudios de mercado se estima un crecimiento del 15% frente al 5% global del resto de productos de cuidado personal. Una importante empresa de investigación de mercado en los Estados Unidos

Kline & Company estima que en Europa Occidental y América del Norte la demanda de productos naturales crezca en un 10% para el año 2016, en cuanto a nuestro país no se cuenta con datos exactos sobre esta nueva tendencia (Kline & Company, 2008).

Actualmente se encuentra en boga el uso de productos cosméticos naturales por lo que se busca sustituir los productos sintéticos utilizados en la elaboración de cosméticos por ingredientes de origen natural, entre ellos tenemos los productos derivados de las abejas, como la miel, excelente humectante para la piel, así también los propóleos que cuentan con actividades microbiológicas de gran significancia pudiéndose utilizar como conservantes dentro de una formulación.

En el Ecuador la actividad comercial apícola comenzó desde el año 1870 con colmenas de *Apis mellifera* traídas desde Francia hacia Cuenca (Cabrera, 2007), pero todavía se encuentra en una etapa de desarrollo incipiente, se realiza de forma rudimentaria por la escasa especialización y tecnificación. El único producto que se obtiene es la miel por su facilidad de recolección, sin aprovecharse adecuadamente toda la gama de productos apícolas que se pueden obtener, entre ellos los propóleos que solamente se comercializan en un 3% a nivel nacional frente a un 90% de la miel de abeja.

Al ser la apicultura una industria artesanal ha hecho que el gobierno ecuatoriano no preste atención al control en los procesos de producción y comercialización de estos productos derivados de las abejas, por lo que muchas empresas han tenido que abandonar esta actividad, debido a que no se está explotando adecuadamente esta parte de la industria (Falquez Chávez, 2014).

Desde la década de los 40 se han realizado varios estudios acerca de su composición química y propiedades biológicas de los propóleos en países como Chile, (Valenzuela-Barra, y otros, 2015) Cuba, (Márquez Hernández, y otros, 2010) Brasil (da Silva

Frozzaa, y otros, 2013) y Argentina (Lima, y otros, 2009) encontrando una composición química muy compleja y diversas actividades biológicas como antioxidante, antibacteriana, antifúngica, cicatrizante, antitumoral entre otras, útiles en la Medicina, Biología y en la Industria (Ordóñez, 2005).

1.3 Justificación de la investigación

Esta nueva tendencia en la industria cosmética, por lo natural y ecológico, se fundamenta en la necesidad de aumentar la búsqueda e investigación de materias primas de origen natural, como alternativas para sustituir aquellas de origen sintético en las formulaciones cosméticas.

Los productos provenientes de las abejas, principalmente los propóleos, que son sustancias resinosas y aromáticas de origen vegetal utilizadas por las abejas en la construcción de sus colmenas para protegerlas del viento y del ingreso de organismos extraños a sus colmenas, actualmente están siendo utilizados en la industria cosmética y farmacéutica por las diferentes propiedades biológicas que presentan, entre ellas las actividades microbiológicas.

En el Ecuador se han realizado muy pocos estudios o casi nulos sobre la composición química y actividad antifúngica de los propóleos, por lo que no se está aprovechando de manera adecuada los múltiples beneficios que este producto ofrece.

Esta falta de estudios, se ha convertido en un factor limitante para usar los propóleos como un ingrediente de origen natural dentro de una formulación cosmética que evite la contaminación con hongos y levaduras.

De esta manera se podrían reemplazar los ingredientes de origen sintético que están causando daño en la salud, por ingredientes de origen natural como son los extractos de propóleos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar la relación entre la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos de la región del austro ecuatoriano para la identificación de los metabolitos responsables de la actividad antifúngica.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición química de los extractos de propóleos mediante métodos cromatográficos para la identificación de metabolitos que están presentes.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de propóleos, mediante la técnica de microdilución determinando su concentración mínima inhibitoria.
- Determinar la relación existente entre la composición química de los extractos de propóleos y la actividad antifúngica para la relación entre el metabolito y su actividad antifúngica.

1.5 Hipótesis

Si en los propóleos hay la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides entonces serían los responsables de la actividad antifúngica ante las cepas de *Candida albicans*, *Malassezia furfur* y *Aspergillus niger*.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Estado del arte

El presente trabajo investigativo y experimental surge como una necesidad de conocer y evaluar la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos de la región del austro ecuatoriano, que podrían utilizarse dentro de la industria cosmética como un ingrediente de origen natural que reemplacen aquellos de origen sintético, por lo que se ha visto menester recopilar estudios e investigaciones sobre este tema, para tener un conocimiento más amplio sobre el mismo.

Se han realizado varios estudios sobre la composición química y propiedades antimicrobianas de los propóleos en países como EEUU, Francia, Checoslovaquia, Rumania, Japón, Brasil, Cuba y Uruguay, entre otros países.

En el año 2007, en la ciudad de la Habana-Cuba la Dra Mercedes Campo realizó un estudio químico de los propóleos rojos cubanos a través de técnicas cromatográficas y espectroscópicas en donde aisló y caracterizó 12 productos naturales en estos propóleos, además mediante la GC-EM se confirmó la presencia de flavonoides en los propóleos rojos cubanos, así como la semejanza en la composición química, independientemente de la zona geográfica de recolección (Campo Fernández, 2008).

Asimismo en un estudio realizado sobre la caracterización organoléptica y físico-química de propóleos en la Libertad-Perú, en los análisis espectrofotométricos en la región UV-VIS se pudieron observar en todos los casos la presencia de bandas típicas

de flavonoides, los cuales serían responsables en su mayor parte de la actividad biológica que presentan los propóleos (Alvarez M., 2010).

Hay que mencionar además, que en un estudio realizado en México de la actividad antifúngica de extractos de propóleos de la abeja *Apis mellifera* se observó actividad inhibitoria sobre los hongos *Candida albicans* (ATCC 14055), *Cryptococcus neoformans*, y *Aspergillus fumigatus*, mediante dos pruebas de susceptibilidad: difusión en agar y microdilución; por lo que estos resultados sugieren su posible uso como tratamiento alternativo en infecciones contra hongos tanto filamentosos como levaduriformes (Londoño Orozco, y otros, 2008).

Por otra parte, en una investigación de la actividad antifúngica de propóleos en diferentes especies de *Candida*, se determinó la concentración mínima inhibitoria por difusión en discos dando como resultado que la cepa más sensible era *C. albicans*, que mostró la más alta actividad antifúngica a 8 mg/mL (Ota, Unterkircher, Vera, & Shimizu, 2001).

Se debe agregar que, en un estudio realizado de la eficacia de los propóleos sobre *Malassezia pachydermatis*, en Buenos Aires-Argentina, empleándose la técnica de dilución en placa de agar Sabouraud se determinó la sensibilidad in vitro de la cepa de *Malassezia* al extracto de propóleos empleado, obteniendo una concentración mínima inhibitoria de 0,30 mg/mL (Lozina, Boehringer, D'Aquino, & Acosta, 2006).

2.2 Propóleos. Generalidades

2.2.1 Definición y origen de los propóleos

La palabra propóleos proviene del griego *pro* que significa (antes, defensa) y de *propolis* (gente, ciudad), lo que se traduce en una sustancia en defensa de la ciudad de

las abejas (colmena). El uso de los propóleos se remonta desde la antigüedad por los sacerdotes egipcios en el año 300 AC (Asís, 2013) (Campo Fernández, 2008) (Ghisalberti E. , 2015) (Lotfy, 2006).

Las especies de abejas que producen propóleos son *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona sp* (Cupull-Santana, Cortés-Rodríguez, Olazábal-Manso, & Hernández-Medina, 2013).

Los propóleos son productos elaborados por las abejas a partir de material resinoso o pegajoso recolectado de diferentes fuentes vegetales, como brotes de árboles o arbustos, dicho material es recolectado y llevado por las abejas en sus mandíbulas hacia sus nidos, para la construcción, protección y reparación de sus colmenas, tienen una consistencia viscosa, constituidos principalmente por resinas y ceras (Farré, Frasset, & Sánchez, 2004) (Salatino, Fernandes-Silva, Abbud Righi, & F. Salatino, 2011) (König, 2015).

Las abejas utilizan los propóleos para cubrir con una capa delgada las paredes del interior de sus colmenas, bloqueando de esta manera agujeros o grietas que se puedan hallar, además para fortalecer los bordes delgados de los peines y repararlos, también lo utilizan para embalsamar los cuerpos de organismos invasores extraños a los cuales han matado y no los pueden transportar fuera de las colmenas (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000).

Hay que mencionar, también, que las abejas hacen uso de las propiedades mecánicas y diversas actividades biológicas que presentan los propóleos para crear en el interior de las colmenas una superficie limpia y lisa, reducir el crecimiento microbiano, prevenir el flujo de aire no controlado y proteger de la humedad proveniente del exterior (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000) (Simone-Finstrom & Spivak, 2010).

En la actualidad se ha visto una reducción de la cantidad de propóleos elaborados sobre todo por las abejas domesticadas productoras de miel a diferencia de las que se encuentran en estado salvaje, pues para el apicultor se hace molesto y dificultoso en el momento de abrir las colmenas para recolectar la miel, por este motivo han optado por reducir la producción de propóleos en las colmenas (Simone-Finstrom & Spivak, 2010).

Desde mucho tiempo atrás los propóleos han sido utilizados en la medicina popular debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, se han reportado también otras actividades biológicas, entre las que se incluyen antiinflamatorias, antitumoral, hepatoprotector, anestésico local, inmunoestimulante (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000) (Nolkemper, Reichling, Heinz Sensch, & Schnitzler, 2010).

Por todas estas propiedades los propóleos han sido utilizados en la apiterapia, en la elaboración de cosméticos, como alimentos y productos medicinales (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000).

Las diversas propiedades que presentan los propóleos han hecho que se despierte un gran interés por parte de los científicos quienes han comenzado sus estudios desde la década de los 60 existiendo en la actualidad muchas publicaciones sobre las actividades biológicas, composición química, usos farmacéuticos y terapéuticos de los propóleos (Nolkemper, Reichling, Heinz Sensch, & Schnitzler, 2010).

La composición química es bastante amplia y compleja, entre sus principales compuestos tenemos fenoles, taninos, polisacáridos, terpenos, ácidos aromáticos, aldehídos entre otros, pero cabe mencionar que sus componentes químicos varían cualitativa y cuantitativamente dependiente del origen geográfico, de la ecología vegetal de la región y del método de recolección, (Cupull-Santana, Cortés-Rodríguez, Olazábal-Manso, & Hernández-Medina, 2013) lo que hace aún más complicado el estudio de los

mismos por la amplia variabilidad que presentan (Nolkemper, Reichling, Heinz Sensch, & Schnitzler, 2010) (Lotfy, 2006).

2.2.2 Usos tradicionales de los propóleos

En la medicina tradicional georgina se usaban los propóleos como unguento para el tratamiento de algunas enfermedades, se tenía la costumbre de colocar emplastos de propóleos en el ombligo del recién nacido y los médicos los usaban para curar las heridas de guerra en los soldados, debido a sus propiedades cicatrizantes (Lotfy, 2006) (Santos Pereira, Rodrigues, Silva Seixas, & de Aquino Neto, 2002).

En muchos países de América, Europa y Asia se han utilizado los propóleos como una bebida buena para la salud (Banskota, Tezuka , & Kadota, 2001).

En Egipto por el año 1700 AC se utilizaba la cera negra, como eran conocidos los propóleos para embalsamar los cadáveres (Santos Pereira, Rodrigues, Silva Seixas, & de Aquino Neto, 2002).

En la antigua Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) se usaba como medicina humana y veterinaria, incluso se utilizaban para el tratamiento de la tuberculosis observándose una reducción en los problemas pulmonares y un evidente aumento del apetito (Santos Pereira, Rodrigues, Silva Seixas, & de Aquino Neto, 2002).

En Grecia también se utilizaba como un cicatrizante interno y externo, pues se observaba que aliviaba inflamaciones y reducía los dolores (Santos Pereira, Rodrigues, Silva Seixas, & de Aquino Neto, 2002).

2.2.3 Fuentes vegetales que originan los propóleos

Para la fabricación de los propóleos las abejas utilizan materiales que recolectan de los exudados producidos por las heridas en algunas plantas, sustancias secretadas constantemente por las plantas, materiales lipofílicos en brotes foliares y hojas, resinas, mucílagos, etc (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000).

A lo largo del tiempo se han hecho estudios para comparar la composición química de los propóleos recolectados de diferentes zonas geográficas, es así que las primeras investigaciones surgieron por la década de los 70 en Francia y Rusia, en donde se analizaron la composición de los flavonoides y se compararon con los exudados de álamo y abedul (Bankova, Castro, & Marcucci, 2000).

Además, se pudo corroborar con otras publicaciones subsecuentes que en las zonas templadas los exudados de las especies de *Populus* y sus híbridos son las fuentes principales en la fabricación de los propóleos, en especial para lugares como Europa, Norteamérica y regiones de Asia que no son tropicales (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000).

A diferencia de las zonas templadas en las zonas tropicales no se encuentran siempre disponibles este tipo de vegetación es por eso que las abejas deben recurrir a otras fuentes vegetales para la elaboración de los propóleos como son los exudados foliares de *Cistus spp* en Túnez, de *Ambrosia deltoidea* en el desierto de Sonora y de especies de *Clusia* en Venezuela (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000).

La importancia del conocimiento de las fuentes vegetales radica en tener una estandarización establecida de la composición química de los propóleos, también es necesario para que los apicultores se aseguren de que en el rango de vuelo de las abejas exista la vegetación necesaria para su elaboración, porque se conoce además que las

abejas al no encontrar el material adecuado recolectan en lugar de secreciones de las plantas, elementos como pinturas, asfaltos y aceites minerales que podrían afectar gravemente los usos farmacéuticos que proporcionan los propóleos (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000).

Tabla 1.- Fuentes vegetales de propóleos de diferente origen geográfico

Origen Geográfico	Fuente vegetal
Europa, Asia, América del Norte	<i>Populos spp.</i> (álamo)
Norte de Rusia	<i>Betula verrucosa</i> (abedul)
Brasil	<i>Baccharis spp.</i> , <i>Araucaria spp.</i>
Islas Canarias	Desconocido

Fuente: (Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000).

2.3 Composición química

El propóleo es una resina recolectada por abejas (*Apis mellifera*), que puede presentar varios colores desde el verde al café dependiendo del origen botánico. Varias investigaciones han demostrado que el propóleo está constituido por cera, flavonoides, aminoácidos, aceites esenciales, polen, minerales y materias orgánicas (Ozcan, 1999).

La composición química del propóleo depende de muchas características tales como son: flora, sitio de recolección, estación del año, materiales empleados para la recolección y vegetación. Entre los compuestos presentes en las muestras de propóleos de gran interés tenemos polifenoles (ácidos fenólicos y sus ésteres, flavonoides, alcoholes y cetonas fenólicas, aldehidos), aminoácidos, esteroides, terpenoides y compuestos inorgánicos (Palomino, Martínez, García, Gil, & Durango, 2010).

En Europa, Asia y América del Norte, la composición química del propóleo se caracteriza por constituyentes fenólicos: flavonoides agliconas, ácidos aromáticos y sus ésteres (Bankova, Castro, & Marcucci, 2000).

2.3.1 Ácidos Fenólicos

Son compuestos fenólicos, los ácidos fenólicos y sus ésteres, los mismos que son componentes bioactivos del propóleo. Estos compuestos están formados por un anillo aromático unido a un grupo oxhidrilo. La estructura más sencilla es la del ácido benzoico (figura 1), pero con otros sustituyentes en el anillo se forman ácidos fenólicos. También están presentes ácidos orgánicos como el ácido caféico, cinámico, ferúlico y cumárico, comunes en los vegetales y en los propóleos. Esta composición es la que le da propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales (Bedascarrasbure, Maldonado, Alvarez, & Rodríguez, 2004).

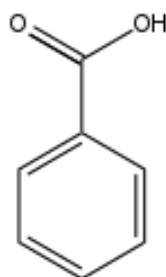


Figura 1.- Ácido Benzoico.

2.3.2 Flavonoides

Los flavonoides están formados por dos anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de tres átomos de carbono a la que se le pueden adicionar grupos tales como oxhidrilos, metilos, azúcares, etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides tales como flavonoles, flavanonas (figura 2), flavonas,

catequinas, antocianinas e isoflavonoides (Bedascarrasbure, Maldonado, Alvarez, & Rodríguez, 2004).

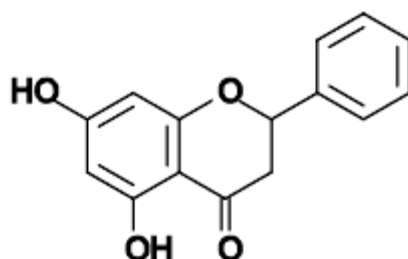


Figura 2.- Flavanona

Estos compuestos tienen propiedades antioxidantes importantes, debido a que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres (Bedascarrasbure, Maldonado, Alvarez, & Rodríguez, 2004).

Según Kustenmacher determina que entre los constituyentes del propóleo están: alcohol de Cinamilo y Ácido Cinámico, vanilina. Flavonoides como Crisina, Quercetina, 3,3, 4,5,7 – pentahidroxi flavona, Kaempferol 3,5,7-trihidroxi - 4-metoxiflavona, ramnetina (3,4, 5 - trihidroxi -7-metoxiflavona), 5,7dihidroxi - 4-metoxiflavona (Acacetina), 5,7-dihidroxi-3,4-Dimetil-Oxifavona y 3,5-dihidroxi - 4,7-dimetoxiflavona. Aldehído como son 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehido (Isovanilina) (Ghisalberti E. , 2015).

2.3.3 Ácidos cumáricos y acetofenona

En propóleos brasileños se logró obtener ácidos cumáricos con residuos prenilados y como metabolitos secundarios las acetofenonas (Ghisalberti E. , 2015).

En Santiago del Estero, Argentina se realizó un análisis de las características físico químicas del propóleo, se encontró que tenían gran cantidad de compuestos fenólicos y

flavonoides que son los responsables propiamente de la actividad antifúngica (ChaillouI, HerreraII, & MaidanaIII, 2004).

En Santiago de Chile se ha identificado más de 300 compuestos químicos entre los que destacan lignanos, terpenos y flavonoides. También la presencia de ácido ferúlico, quercetina y ácido caféico (Figura 3), que son los que proporcionan actividad antioxidante al propóleo (Peña, 2008).

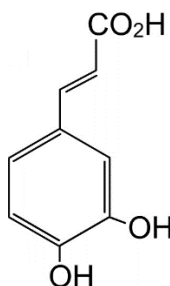


Figura 3.- *Ácido Caféico.*

El propóleo rojo de Brasil, que también puede ser encontrado en Cuba y México, está constituido por isoflavonoides. En los propóleos de las Islas Canarias se han encontrado como principales constituyentes los lignanos, terpenoides y azúcares como galactosa, maltosa, manosa, melobiosa, xilosa. Sin embargo, un propóleo crudo presenta un 50% de resina y bálsamo vegetal (donde están presentes los compuestos biológicamente activos), 35 % de ceras de abeja, algunas vegetales, 5% a 10% de aceites aromáticos, 5% de polen y otras sustancias como desechos orgánicos (Groot, 2013).

2.4 Actividad biológica de propóleos

Las actividades biológicas más ampliamente estudiadas y extensas son la actividad antibacteriana y antifúngica de propóleos, muchos autores han empleado propóleos de diferentes zonas geográficas ya que su composición química varía de acuerdo a las fuentes vegetales existentes en el lugar, (Kujumgiev, y otros, 1999) esta actividad antimicrobiana se le atribuye a los propóleos principalmente por la presencia de flavonoides, entre los que se encuentran pinocembrina, glangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato; la presencia de ésteres bencílicos principalmente del ácido p-cumárico y también por la presencia de mezclas de ésteres del ácido cafeico, entre otros (Cupull-Santana, Cortés-Rodríguez, Olazábal-Manso, & Hernández-Medina, 2013).

Existen diversos métodos para la determinación de la actividad antifúngica de productos naturales (extractos naturales y compuestos puros), entre los más comunes podemos mencionar los siguientes bio-autografía, difusión en disco, dilución en agar y pruebas de dilución, los resultados obtenidos dependen de la técnica que se ha utilizado (Scorzoni, y otros, 2007).

2.4.1 Métodos de difusión en agar

El método de difusión de disco en agar es fácil de realizar y de costo bajo. Se impregna el disco con la solución del extracto a analizar de concentración conocida y se pone en contacto con el medio inoculado, luego se mide el halo de inhibición (diámetro) formado alrededor del disco después de un cierto tiempo de incubación. Presentan ventajas como la posibilidad de probar hasta 6 extractos por placa y de usar pequeños volúmenes de las soluciones a analizar; se trata de una técnica previa solamente, no se debe utilizar para líquidos no polares y en aquellos que no se puedan difundir fácilmente en el agar (Scorzoni, y otros, 2007).

2.4.2 Métodos de bio-autografía

Este método es solamente cualitativo y se realiza sobre un cromatograma de tres maneras diferentes:

- Bioautografía directa, el microorganismo crece directamente sobre la placa de cromatografía de capa delgada.
- Bioautografía de contacto, el antifúngico que se encuentra en la placa de cromatografía delgada se transfiere a otra placa de agar en donde se encuentra inoculada el microorganismo, a través del contacto directo.
- Bioautografía de recubrimiento, donde se aplica directamente sobre la placa de cromatografía de capa delgada el medio de agar sembrado.

Esta técnica es altamente sensible, pero se limita a aquellos microorganismos que solamente crecen sobre la placa de cromatografía de capa delgada (Scorzoni, y otros, 2007).

2.4.3 Métodos de dilución

En este método los compuestos se mezclan con un medio de cultivo apropiado en el que se ha inoculado previamente la cepa fúngica, se puede realizar tanto en medios líquidos como en medios sólidos y así también se puede medir el crecimiento de los microorganismos de maneras diferentes (Scorzoni, y otros, 2007).

En el método de dilución en agar, se puede determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), que es la concentración más baja capaz de inhibir cualquier tipo de crecimiento fúngico visible (Scorzoni, y otros, 2007).

En el método de dilución líquida o en caldo, la turbidez y los indicadores redox son comúnmente utilizados, la medida de la turbidez se puede hacer visualmente o midiendo la densidad óptica a 405 nm, se debe tener en cuenta que algunas de las muestras no son completamente solubles por lo que podrían interferir en la lectura de la turbidez, para ello se recomienda hacer un control negativo que contiene extracto disuelto en medio blanco (Scorzoni, y otros, 2007).

El uso de la microdilución para determinar la CMI ha sido reconocido como el método estándar general para probar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (Scorzoni, y otros, 2007).

2.4.4 Otros métodos

Existen métodos como la citometría de flujo (FC), métodos colorimétricos o fluorescentes y métodos comerciales antimicóticos, para la determinación de la actividad antifúngica de los compuestos (Scorzoni, y otros, 2007).

La citometría de flujo es una técnica que sirve para determinar la susceptibilidad de algunos microorganismos, tiene ventajas como susceptibilidad y precisión en la obtención de resultados, así como también pruebas más rápidas, entre sus principales desventajas podemos mencionar los costos elevados del equipo de citometría de flujo, además de que se precisa de operadores expertos para obtener resultados óptimos (Scorzoni, y otros, 2007).

2.5 Usos en cosméticos de los propóleos

El propóleo es conocido por sus propiedades antiinflamatorias, bacteriostáticas, astringentes y antimicóticas. Dentro de la cosmética es usado para elaborar cremas, shampos, acondicionadores, bálsamos labiales y esmaltes (Groot, 2013).

Debido a la alta actividad antioxidante del propóleo, por sus componentes fenólicos que presenta una acción inhibidora sobre la peroxidación lipídica del ácido linoleico en el dodecil sulfato de sodio, es usado en la preparación de protectores solares ya que se ha demostrado su efectividad como fotoprotección de UVB y UVA de amplio espectro (Gregoris, Fabris, Bertellea, Grassato, & Stevanato, 2011).

En Corea debido a la propiedad antibacteriana de los propóleos es usado en la elaboración de lociones, crema corporal y para los ojos ya que les proporciona hidratación, revitalización, elasticidad de la piel (Sung & Suk, 1997).

2.6 Microorganismos: hongos y levaduras

2.6.1 *Candida albicans*

Es un hongo dimorfo ya que se comporta como una levadura capaz de producir filamentos. Como levadura crecen a temperatura ambiente en el huésped, y a temperatura ambiente como hifas. Pertenecen a la subdivisión Deuteromycotina y a la familia Saccharomycetacea.

En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, blanquecinas de 4 a 6 micras de tamaño, agrupadas formando colonias, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan dando la apariencia de filamentos, hifas o micelios. Para su desarrollo se usa agar sabouraud dextrosa, sus colonias crecen en 24 horas a 37°C (Mendoza, 2005).

2.6.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que

originarán las esporas asexuales o conidios. Presenta colonias de color blanco o amarillo, con esporas de color negro que crecen en un lapso de 3 a 7 días a 25°C, el medio de cultivo usado para su desarrollo es agar dextrosa o agar papa (PDA).

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, sus esporas pueden permanecer durante un largo tiempo suspendidas en el ambiente por lo que el hombre puede inhalar constantemente (Arbaca, 2000).

2.6.3 *Malassezia furfur*

Malassezia furfur es una especie dimórfica con evidente pleomorfismo, es una levadura que presenta células ovaladas y esféricas (Aspiroz, Moreno, & Rubio, 1997).

Pertenece a las levaduras que requieren una adición de ácidos grasos de cadena larga para su desarrollo, el agar usado para su crecimiento generalmente es agar Dixon o agar sabouraud adicionado con aceite de oliva. Sus colonias son opacas con un diámetro de 5 micras, sus células son ovoides y esféricas pudiendo llegar a formar filamentos miceliares, crecen de 4 a 7 días a 37°C (Giusiano, 2006).

2.7 Conservantes cosméticos

Para escoger el conservante adecuado en una formulación cosmética para protegerla de una posible proliferación microbiológica, es necesario conocer el tipo de formulación que se está desarrollando, ya sea capilar, corporal, etc (Vega Picón, 2015).

Cabe mencionar que ningún conservante cosmético por si solo es lo suficientemente eficaz para proteger al cosmético de la contaminación microbiológica desde el desarrollo hasta el tiempo de vida útil en manos del consumidor, por lo que en la mayoría de los casos se utilizan combinaciones de los conservantes (Vega Picón, 2015).

En el Ecuador existen regulaciones que ponen de manifiesto la necesidad de un control microbiológico de los productos cosméticos cuando salen al mercado, directrices que son dadas por la CAN (Comunidad Andina de Naciones) como es la Resolución 1482 de Límites de contenido microbiológico de productos cosméticos (CAN, 2012).

Tabla 2.- Límites de contenido microbiológico de productos cosméticos.

ÁREA DE APLICACIÓN	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD
Productos para uso infantil	a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 1×10^2 UFC/g o mL.
Productos para el área de los ojos	b. Ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en 1 g o mL.
Productos que entran en contacto con las membranas mucosas	c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o mL. d. Ausencia de <i>Coliformes totales</i> en 1 g o mL.
Demás productos cosméticos susceptibles de contaminación microbiológica	a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 1×10^3 UFC/g o mL. b. Ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en 1 g o mL. c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o mL. d. Ausencia de <i>Coliformes totales</i> en 1 g o mL.
Productos a ser utilizados en los órganos genitales externos	a. Ausencia total de <i>Candida albicans</i> .

Fuente: (CAN, 2012).

Existen además otras pruebas para evaluar la eficacia de un conservante como es el caso de la Evaluación de la protección antimicrobiana de un producto cosmético - Prueba de eficacia (Challenge test) de conservantes - Norma UNE-EN ISO 11930:2012, que se trata de una prueba de exposición para determinar el poder de un conservante, los microorganismos utilizados son *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, los cuales se inoculan en el producto cosmético para determinar su eficacia frente al conservante (ISO11930:2012, 2012).

2.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica que permite la separación de mezclas muy complejas. Una vez separados, identificados e incluso cuantificados los componentes de una muestra problema, el único dato del que se dispone es el tiempo de retención de los picos cromatográficos, pero esto no es suficiente para una identificación inequívoca de muestras que contienen múltiples componentes (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

La espectrometría de masas es capaz de identificar cualquier sustancia pura, pero no sin previa separación de los compuestos presentes en una muestra, debido a la complejidad del espectro obtenido por la superposición de los espectros particulares de cada compuesto (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

Por la unión de estas dos técnicas nace la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), que es una técnica analítica capaz de separar, cuantificar e identificar mezclas muy complejas de sustancias volátiles y semivolátiles (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002) (Hübschmann, 2015).

Debido a la alta complejidad de los componentes de los propóleos desde la década de 1980 se utilizó este método (CG/EM) para la caracterización química de muestras de

propóleos de diferente origen geográfico (Petkova Popova, Graikou, Chinou, & Stefanova Bankova, 2010).

2.8.1 Aplicaciones CG/EM

A continuación, se mencionan algunas aplicaciones de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

- En investigación para la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas volátiles.
- En la industria se utiliza para evaluar la pureza de los reactantes y productos de la reacción, así como también monitorizar la secuencia de la reacción.
- En la industria petrolera sirve para analizar los componentes de la gasolina (Stashenko & Martínez, 2012).
- Se utiliza además para evaluar la contaminación de aguas con plaguicidas, pesticidas.

CAPÍTULO III

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de muestras

Aunque existen varios métodos para la recolección de este material resinoso, las muestras de propóleos se recolectaron usando el método más sencillo y tradicional como es el raspado, que consiste en raspar con espátula o palanca todos los lugares de la colmena en donde las abejas han depositado los propóleos.

Las muestras de propóleos se recolectaron de colmenas de abejas de la especie *Apis mellifera*, de diferentes zonas geográficas del austro ecuatoriano y fueron identificadas como propóleos ecuatorianos (PE): PE-15, PE-16 y PE-18.

En la tabla 3 se encuentran detallados los datos de recolección correspondientes a las muestras de propóleos.

Tabla 3.- Datos de recolección de las muestras de propóleos.

Muestra	Apicultor	Fecha de recolección	Ubicación
PE-15	Patricio Morales	Octubre de 2016	Sayausí, Azuay
PE-16	Liliana Astudillo Álvarez	Octubre de 2016	Cojitambo, Cañar
PE-18	Naúm Zumba	10 de Noviembre de 2016	Octavio Cordero Palacios, Azuay

3.2 Preparación de extractos

Se obtuvieron de las muestras de propóleos PE-15 (70,75g), PE-16 (197,00g) y PE-18 (42,38g) y se realizó la extracción con metanol absoluto (Sigma Aldrich) por un proceso de maceración durante 7 días. El disolvente fue removido los días 3 y 5 con el objetivo de favorecer el proceso de extracción.

Los extractos metanólicos obtenidos se procesaron a través de papel filtro, combinados y llevados a sequedad a 40°C bajo presión reducida en un rotoevaporador Heidolph laborota 4001.

Tanto las muestras como los extractos secos de los propóleos fueron pesados en una balanza técnica OHAUS SPX2201.

Los extractos secos se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar debidamente etiquetados a una temperatura entre 6 - 8 °C, para su posterior análisis.

El cálculo del rendimiento para las 3 muestras de propóleos se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{P \times 100}{m}$$

Donde P es el peso del extracto seco (g) y m es el peso de la muestra (g)

3.3 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Para el desarrollo de la CCD se utilizaron placas de Sílica gel GF₂₅₄ (0,20 mm) con dimensiones de 20 x 10 cm. Estas se encontraban sobre un soporte de aluminio. Las muestras se aplicaron usando capilares de vidrio y se dejaron secar al ambiente las aplicaciones (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

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 (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

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 (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

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 una mezcla de vainillina en etanol (1%, m/v), ácido sulfúrico en etanol (50%, v/v) y calor. Después de rociar la placa con la ayuda de un nebulizador se calentó la misma en una plancha de calentamiento a una temperatura entre 105-110°C de 3 a 5 minutos, hasta que se modificó la apariencia de la misma (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

3.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Se disolvieron 10 mg del extracto de propóleos 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 (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

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 80°C por 2 min, incrementándose hasta 310°C con una relación de 3°C min⁻¹, seguido de un proceso isotérmico de 20 min. 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 (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

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 (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

3.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron 3 cepas fúngicas ATCC: *Aspergillus niger* (ATCC® 6275™), *Candida albicans* (ATCC® 10231™) y *Malassezia furfur* (ATCC® 14521™), suministradas por Microbiologics.

3.5.1 Viabilización de las cepas ATCC

Para la activación de las cepas ATCC, se siguió el método Microbiologics KWIK-STIK™ que se menciona en la tabla 4.

Tabla 4.- Método de Activación de las cepas ATCC.

Microorganismo	Cepa ATCC	Método de activación	Medio de cultivo
<i>Aspergillus niger</i>	6275	Microbiologics KWIK-STIK™	Agar Papa Dextrosa (PDA)
<i>Candida albicans</i>	10231	Microbiologics KWIK-STIK™	Agar Sabouraud Dextrosa (SDA)
<i>Malassezia furfur</i>	14521	Microbiologics KWIK-STIK™	Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) + Aceite de Oliva 10%

➤ **Método Microbiologics KWIK-STIK™:**

El dispositivo (hisopo) que contenía al microorganismo ATCC liofilizado y al líquido hidratante, se mezclaron hasta obtener una suspensión homogénea y se inocularon en el medio con el agar específico a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.

3.5.2 Preparación del inóculo fúngico

➤ **Levaduras:**

A partir de un cultivo de *Malassezia furfur* durante 7 días a 30°C y 3 días a 25°C para *Candida albicans*, se seleccionaron 4 a 5 colonias de cada una y se preparó una suspensión en solución salina estéril al 0,9% hasta alcanzar una concentración equivalente a 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL).

➤ **Hongo filamentoso:**

Desde un cultivo de *Aspergillus niger* a 25°C durante 7 días, se realizó el lavado de esporas en solución salina estéril 0,9%, se filtró usando gasa estéril y se realizó el

conteo de esporas en la cámara de Neubauer para obtener una suspensión con una concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL.

3.5.3 Control positivo

Para el desarrollo de esta técnica se usó como control positivo de inhibición itraconazol 10mg/mL.

3.5.4 Control negativo

Es aquel que contiene solo el inóculo fúngico de las cepas de *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.

3.5.5 Concentración Mínima Inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se empleó para determinar la menor concentración de cada uno de los extractos de propóleos que inhiben el crecimiento de los hongos objeto de estudio.

Para el desarrollo de esta prueba inicialmente se prepararon soluciones madre de los extractos de propóleos puros en DMSO a una concentración de 100mg/mL.

En la microplaca de 96 pocillos se colocó en las 6 primeras columnas el inóculo fúngico con las muestras de propóleos (PE-15 y PE-16), en las tres filas siguientes se añadió en control positivo y en las 3 últimas filas el control negativo (figura 4). Se procedió con el método de doble dilución (tabla 5).

Cabe indicar que para el extracto de propóleos PE-18 se utilizó otra microplaca con las mismas condiciones descritas anteriormente.

Se incubaron las microplacas a 25°C por 7 días para *Aspergillus niger*, a 25°C por 3 días para *Cándida albicans*, y a 30°C por 7 días para *Malassezia furfur*, realizando lecturas de las microplacas a una longitud de onda de 450 nm y 630 nm a las 0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 7 días para *Aspergillus niger* y *Malassezia furfur* y hasta las 72 horas para *Cándida albicans*.

Es importante mencionar que el procedimiento se realizó por triplicado para mayor precisión de los resultados.

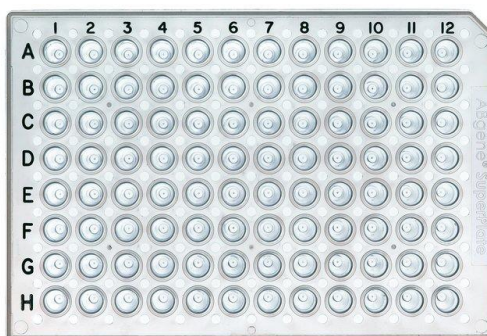


Figura 4.- Microplaca de 96 pocillos.

Tabla 5.- Concentración final de los extractos de propóleos en la microplaca

Concentración final de los extractos de propóleos PE-15, PE-16, PE-18	
A	25 mg/mL
B	12,5 mg/mL
C	6,25 mg/mL
D	3,125 mg/mL
E	1,562 mg/mL
F	0,781 mg/mL
G	0,390 mg/mL
H	0,195 mg/mL

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención y rendimiento de los extractos de propóleos

La extracción de los propóleos se hizo por maceración con recambio de solvente para permitir la máxima disolución de los metabolitos presentes en las muestras de propóleos. Se usó este método de extracción ya que no usa calor y por ende no modifica la composición química de los propóleos (Campo Fernández, 2008).

En la tabla 6 podemos observar el rendimiento obtenido en el proceso de extracción de las muestras de propóleos.

Tabla 6.- Rendimiento de los extractos secos de propóleos.

Muestras	Masa de propóleos (g)	Peso de extractos secos (g)	Rendimiento (%)
PE-15	70,75	20,68	29,23
PE-16	197,00	36,98	18,77
PE-18	42,38	12,85	30,32

Como se puede observar, los rendimientos de los extractos secos de propóleos varían entre 18,77 y 30,32%. Este porcentaje puede variar por factores como la flora circundante a las colmenas que pueden diferir de una zona a otra, la temporada de recolección, método de recolección empleado y el tipo de solvente utilizado para la extracción.

La variación de rendimiento entre estas tres muestras al utilizar el mismo procedimiento extractivo es un resultado habitual en propóleos y los aspectos antes mencionados justifican este comportamiento. La diferencia de rendimiento influye de forma determinante en los procesos de elaboración de extractos y formas terminadas, por lo tanto, es un aspecto importante a tener en cuenta en el proceso de elaboración de productos que contengan propóleos.

El rendimiento de los extractos obtenidos, se relaciona con los encontrados en otras muestras de propóleos (Cuesta Rubio, y otros, 2017), (Lima, y otros, 2009) mencionan un rendimiento entre 42,13 y 76,26% para propóleos argentinos de la provincia de San Juan extraídos con metanol.

4.2 Análisis de cromatografía en capa delgada (CCD)

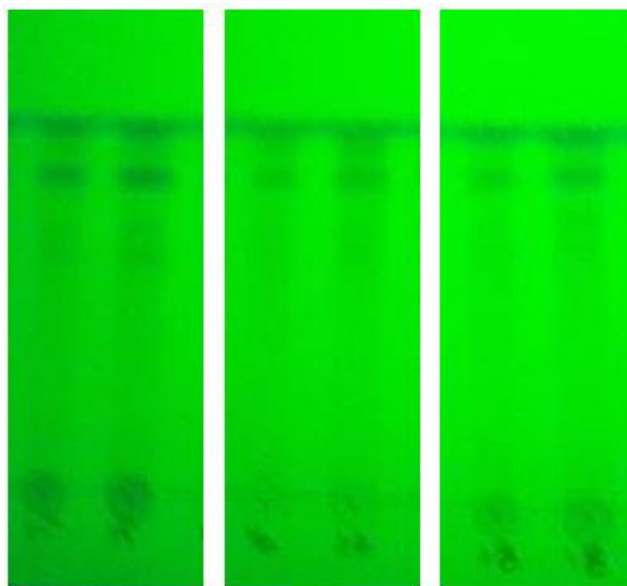
Los extractos metanólicos de los propóleos se sometieron a un estudio por CCD para obtener un análisis cualitativo preliminar de las muestras en estudio.

En la figura 5, se puede observar en las tres muestras de propóleos (PE-15, PE-16 y PE-18) un gran número de manchas al rociar las placas con la combinación de 1% de vainillina y 50% de ácido sulfúrico (ambas disueltas en etanol) y calor, empleando como fase móvil cloroformo:metanol (9:1). Se observaron manchas a lo largo de todo el cromatograma, lo que evidencia la presencia de compuestos de diversa polaridad. Se observaron además coloraciones rojizas y violáceas oscuras que sugieren la presencia de compuestos de naturaleza fenólica y triterpénica respectivamente (Campo Fernández, Cuesta Rubio, Márquez Hernández, Rosado Pérez, & Porto, 2008). Lo expresado anteriormente confirman que las 3 muestras de propóleos tienen un comportamiento bastante similar.



Figura 5.- Revelado cromatográfico con vainillina al 1% en etanol, ácido sulfúrico al 50 % en etanol y calor.

En las figuras 6 y 7 podemos observar los revelados con luz UV a 254nm y 365nm respectivamente, usando como fase móvil cloroformo:metanol (9:1). Se observaron manchas en el cromatograma con valores de Rf medios a altos lo que sugiere la presencia en su estructura de grupos cromóforos conjugados. En los revelados con luz UV a 365nm se observaron manchas de color azul y amarillo verdoso.

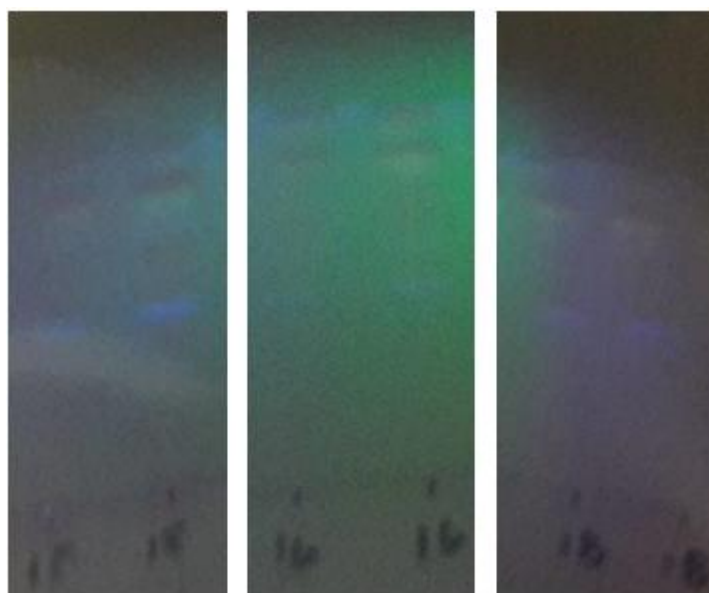


PE-15

PE-16

PE-17

Figura 6.- Revelado cromatográfico con luz UV a 254 nm.



PE-15

PE-16

PE-18

Figura 7.- Revelado cromatográfico con luz UV a 365 nm.

Wagner y Bladt sugiere una posible relación entre el color observado y la estructura química de los compuestos analizados (tabla 7) (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017).

Tabla 7.- *Relación entre el color y la posible estructura de los compuestos químicos.*

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 cafeico)
Amarillo anaranjado, amarillo verdoso	Flavonoles
Naranja, amarillo verdoso	Flavonas

Fuente: (Verdugo Torres & Tola Álvarez, 2017)

Lo expuesto en la tabla 7 ha sido corroborado ampliamente en varios estudios a nivel internacional. En zonas templadas los propóleos poseen como principales constituyentes compuestos fenólicos entre ellos tenemos a los flavonoides, ácidos cinámicos y derivados (Palomino G., García P., Jesús H., Rojano, & Durango R., 2009). Es así que en zonas templadas de América del Norte, Asia y Europa se encontraron constituyentes como los ácidos fenólicos y flavonoides (Marcucci, 1995). También en muestras de propóleos de Egipto y el este del Mediterráneo se identificaron ésteres del ácido cafeico (Christov, Bankova, Hegazi, Abd El Hady, & Popov S., 1998) (Bankova V., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, 2005) (Sahinler & Kaftanoglu, 2005). En muestras originarias de Nueva Zelanda se han identificado principalmente fenoles (Markham, Mitchell, Wilkins, Daldy, & Lu Y., 1996). Así como también en propóleos estudiados en México, Chile y Argentina se han identificado metabolitos como fenoles, triterpenos, flavonoides y cumarinas (Tolosa & Cañizares, 2002).

Las tres muestras estudiadas presentaron cromatogramas bastante similares por lo que se podría decir que su composición química es semejante, con la presencia de grupos cromóforos conjugados entre los que destacan ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas.

El resultado observado en la CCD también revela que a pesar de que las tres muestras recolectadas no son del mismo lugar, su composición química semejante se debería a que las muestras fueron obtenidas de zonas cercanas pertenecientes a la región del austro ecuatoriano en donde existe una flora bastante similar.

4.3 Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

En base a los resultados obtenidos de los posibles componentes presentes en las diferentes muestras de propóleos se realizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

En el cromatograma de la muestra de propóleos 15 (figura 8) se obtuvieron 44 picos, a los mismos que se les realizó el espectro de masas por impacto electrónico.

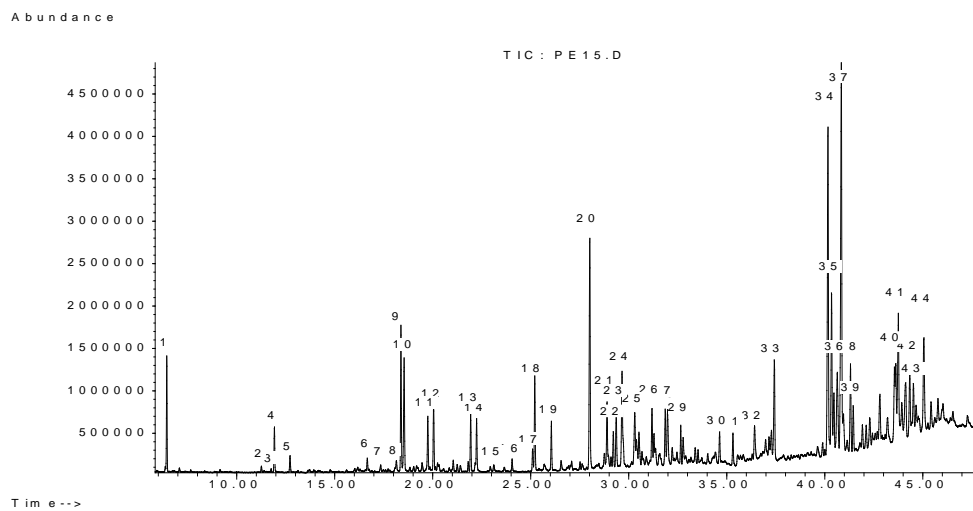


Figura 8.- Cromatograma gaseoso de la muestra PE-15.

Al realizar el análisis de cada uno de estos picos se obtuvieron 25 propuestas de compuestos químicos, el resto no fueron identificados, estas propuestas están detalladas en la tabla 8.

Tabla 8.- Compuestos identificados en el análisis de la muestra PE-15 por CG/EM.

No	Componente Químico	TR	% Relativo
1	Trimetilsilil éter de glicerol	6,434	2,17
2	Acido málico, tris-TMS	11,262	0,13
3	Butanal 2,3,4-tris(trimetilsilil)oxy-	11,758	0,08
4	Butane,1,2,3,4-tetrakis(trimetilsilil)oxy-	11,924	1,03
5	4-Hidrofeniletanol di-TMS	12,721	0,44
6	Xilitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-TMS	16,662	0,34
7	D-Xylopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-TMS	17,346	0,20
8	Acido benzoico, 3,4, -bis [(trimetilsilil)oxy]-, éster Trimetilsilil	18,148	0,24
9	D-Fructosa,1,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	18,381	3,52
10	D-Fructosa,1,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	18,541	3,09
11	Myo-inositol,5-deoxy-1,2,3,4,6-penyakis-O-TMS	19,749	1,36
12	D-galactosa,2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	20,048	1,68
13	Glucosa, pentakis-O-TMS	21,936	1,38
14	Ácido hexanodecanoico, TMS	22,241	1,42
15	Acido cinámico, 4-methoxy--(trimetilsiloxy)-, éster Trimetilsilil	23,114	0,24
16	Trimetilsilil ,4-bis(trimetilsilil) cinamato	24,052	0,34
17	9,12-ácido octadecenoico (Z,Z)- éster trimetilsilil	25,097	0,60
18	Ácido oleico, éster Trimetilsilil	25,205	2,38
19	No identificado	26,052	1,27
20	No identificado	28,012	6,78
21	Ácido eicosanoico, éster Trimetilsilil	28,894	1,67
22	No identificado	29,212	0,95
23	No identificado	29,363	1,74
24	Isómero de 23	29,657	2,94

25	No identificado	30,306	1,85
26	No identificado	31,187	1,49
27	Ácido docosanoico, éster trimetilsilil	31,862	1,67
28	No identificado	31,978	2,10
29	No identificado	32,653	0,96
30	Ácido tetracosanoico, éster trimetilsilil	34,634	0,94
31	No identificado	35,314	0,86
32	No identificado	36,417	1,46
33	No identificado	37,427	3,41
34	No identificado	40,163	10,48
35	No identificado	40,348	4,71
36	No identificado	40,638	3,37
37	Lupan-20(29)-en-3-ona	40,843	12,93
38	No identificado	41,311	2,59
39	Silane, (9,19-cyclo-9-beta-lanost-24-en-3-beta-yloxy)trimetil	41,456	1,33
40	No identificado	43,554	2,17
41	No identificado	43,756	3,98
42	No identificado	44,339	2,29
43	No identificado	44,522	1,51
44	No identificado	45,058	3,90

La figura 8 y la tabla 8 muestran que hasta los 21,9 minutos se detectaron algunos azúcares, ácidos carboxílicos (ácido málico y benzoico) y varios polioles. Estos compuestos obtenidos forman parte de la composición química de los propóleos y van a depender de varias características como: sitio de recolección, materiales empleados, vegetación (Ozcan, 1999).

El porcentaje relativo que estos componentes presentaron es el 15,66% del total de la muestra. Desde los 22 minutos hasta los 45 minutos se pudieron identificar varios ácidos carboxílicos como son el ácido cinámico, octadecenoico, docosanoico, eicosanoico, tetracosanoico, oleico, éteres derivados de la glicerina, triterpenos y otros componentes que no logaron ser identificados. La presencia de estos ácidos carboxílicos, así como la de terpenoides corresponden a la mayoría de componentes característicos de los propóleos (Peña, 2008).

En el cromatograma de la muestra de propóleos 16 (figura 9) se obtuvieron 37 picos, a los mismos se les realizó el espectro de masas por impacto electrónico.

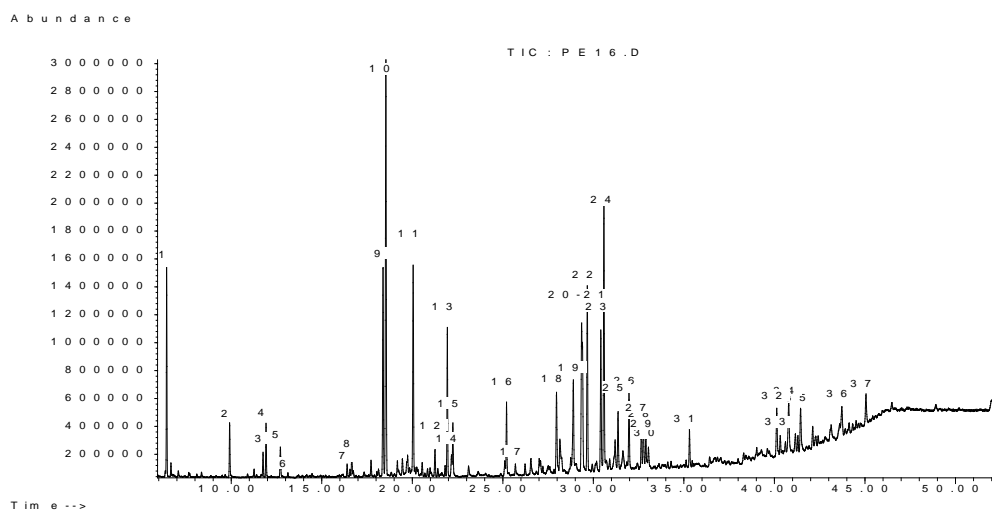


Figura 9.- Cromatograma gaseoso de la muestra PE-16.

En cuanto al cromatograma gaseoso de la muestra de propóleos 16 se obtuvo 23 propuestas de compuestos químicos y otras 14 que no pudieron ser identificadas (tabla 9).

Tabla 9.- *Compuestos identificados en el análisis de la muestra PE-16 por CG/EM.*

No	Componente Químico	TR	% Relativo
1	Trimetilsilil éter de glicerol	6,433	4,69
2	No identificado	9,914	1,50
3	Butanal 2,3,4-tris(trimetilsilil)oxy-	11,757	0,67
4	Butane,1,2,3,4-tetrakis(trimetilsilil)oxy-	11,920	1,49
5	4-Hidrofeniletanol di-TMS	12,716	0,92
6	2,3,4-TRIHIDROXYBUTYRIC ACID TETRA TMS	13,128	0,15
7	Xilitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-TMS	16,399	0,39
8	Isómero de 7.	16,660	0,67
9	D-Fructosa,1,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	18,384	6,37
10	D-Fructosa,1,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	18,539	13,97
11	D-galactosa,2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	20,047	6,40
12	Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS-, epi-	21,255	0,90
13	Glucosa, pentakis-O-TMS	21,935	4,47
14	Ácido D-glucónico, 2,4,5,6-pentakis-O-TMS-, éster trimetilsilil	22,165	0,65
15	Ácido hexanodecanoico, éster trimetilsilil	22,240	1,41
16	Ácido Oleico, éster trimetilsilil	25,203	2,02
17	Ácido octadecanoico - éster trimetilsilil	25,692	0,34
18	No identificado	27,963	3,15
19	Ácido eicosanoico, éster trimetilsilil	28,894	3,27
20	No identificado	29,351	3,74
21	No identificado	29,394	4,05
22	Isómero de 20	29,669	6,20
23	No identificado	30,413	4,44

24	Isómero de 23	30,582	8,44
25	No identificado	31,366	1,96
26	No identificado	31,970	2,47
27	Compuesto relacionado al heptadecylglycerol	32,649	1,43
28	No identificado	32,760	1,41
29	alfa-D-Glucopiranosido, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS-beta-D-fructofuranosyl, 2,3,4,6-tetrakis O-TMS	32,895	0,87
30	Azúcar	33,043	0,52
31	Relacionado con 27	35,309	1,19
32	No identificado	40,129	2,00
33	No identificado	40,322	0,65
34	No identificado	40,792	2,40
35	No identificado	41,444	1,85
36	No identificado	43,721	1,53
37	No identificado	45,060	1,41

La figura 9 y la tabla 9 muestran que hasta los 21,9 minutos se detectaron algunos azúcares como glucosa, galactosa, fructosa y varios polifenoles, que han sido mencionados en la literatura citada en el marco teórico porque forman parte de la composición química de los propóleos (Palomino, Martínez, García, Gil, & Durango, 2010).

Estos componentes presentaron un porcentaje relativo de 42,59 % del total de la muestra analizada. Los componentes fenólicos obtenidos son los responsables de la actividad antifúngica de los propóleos (ChaillouI, HerreraII, & MaidanaIII, 2004).

A partir de los 22 minutos y hasta los 32 minutos se identificaron ácidos carboxílicos como son ácido oleico, octadecanoico, eicosanoico y ésteres de glicerina.

Estos ácidos carboxílicos presentes son los responsables de la actividad antioxidante del propóleo (Peña, 2008).

En el análisis de la cromatografía gaseosa de la muestra de propóleos PE-18 (Figura 10) se obtuvieron 32 picos, a los mismos se les realizó el espectro de masas por impacto electrónico.

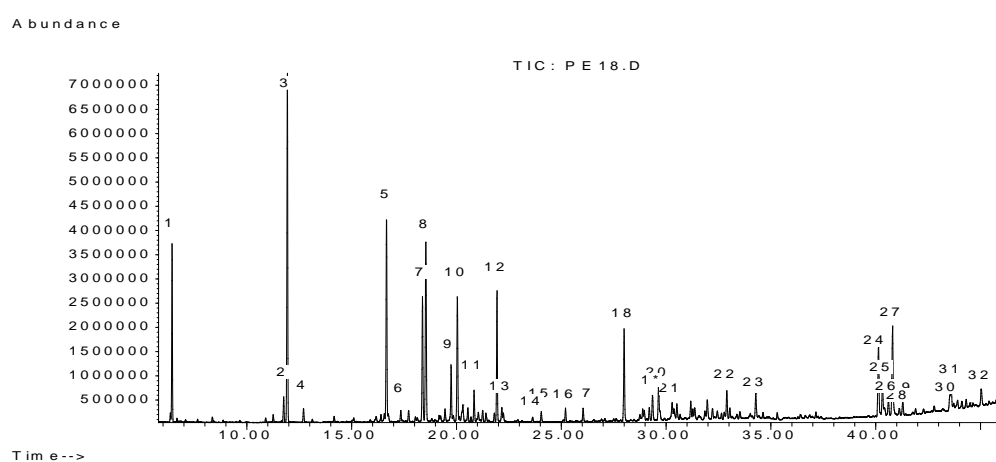


Figura 10.- Cromatograma gaseoso de la muestra PE-18.

En el cromatograma gaseoso de la muestra de propóleos 18 se obtuvo 20 propuestas de compuestos químicos y otras 12 que no pudieron ser identificadas (tabla 10).

Tabla 10.- *Compuestos identificados en el análisis de la muestra PE-18 por CG/EM.*

No	Componente Químico	TR	% Relativo
1	Trimetilsilil éter de glicerol	6,434	6,49
2	Butanal 2,3,4-tris(trimetilsilil)oxy-	11,757	1,11
3	Butane,1,2,3,4-tetrakis(éster trimetilsilil)oxy-	11,933	15,43
4	2,3,4-trihydroxybutyric acido tetra TMS	12,706	0,65
5	Xilitol, 1,2,4,5-pentakis-O-TMS	16,665	9,60
6	D-Xilosa, tetrakis(trimetilsilil)	17,343	0,47
7	D-Fructosa, 1,4,5,6-pentakis-O-TMS	18,380	5,83
8	D-Fructosa, 1,4,5,6-pentakis-O-TMS (Isómero de 4)	18,537	9,79
9	Myo-inositol,5-deoxy-1,2,3,4,6-pentakis-O-TMS	19,745	2,95
10	D-galactosa,2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	20,043	6,24
11	D-Manitol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS	20,838	1,55
12	Glucosa, pentakis-O-TMS	21,934	5,94
13	Ácido D-glucónico, 2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS	22,165	0,75
14	Myo-inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS	23,637	0,24
15	Trimetilsilil ,4-bis(éster trimetilsilil) cinamato	24,044	0,47
16	Ácido oleico, TMS	25,198	0,58
17	No identificado	26,038	0,71
18	No identificado	28,000	5,03
19	Ácido Eicosanoico, éster trimetilsilil	29,349	1,53
20	No identificado	29,644	2,26
21	No identificado	31,176	0,94
22	alpha-D-Glucopiranósido, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS isómero de 20	32,895	1,53
23	Isómero de 22 o compuesto relacionado.	34,277	1,52

24	No identificado	40,137	4,35
25	No identificado	40,322	1,96
26	No identificado	40,612	1,15
27	Lup-20(29)-en-one	40,808	5,72
28	No identificado	41,125	0,41
29	No identificado	41,292	0,90
30	No identificado	43,540	0,92
31	No identificado	43,598	1,59
32	No identificado	45,037	1,38

Al realizar el análisis de los componentes obtenidos de la muestra de propóleos 18 por cromatografía gaseosa que podemos observar en la figura 10 y tabla 10, su composición similar a las otras dos muestras de propóleos PE-14 y PE-16. Alrededor del minuto 21 se logró obtener azúcares, derivados del glicerol y algunos compuestos fenólicos. Estos compuestos químicos obtenidos corresponden a un porcentaje relativo 66,5 % del total de la muestra.

Desde los 22 minutos hasta los 45 minutos se pudieron identificar varios ácidos carboxílicos como son el ácido eicosanoico, oleico, éteres derivados de la glicerina, triterpenos y otros componentes que no logaron ser identificados.

4.4 Análisis de concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se utilizó inicialmente la media aritmética (promedio) como medida de tendencia central entre las absorbancias medidas en los días 0, 1, 2, 3 y 7 para cada concentración en mg/mL aplicada, a longitudes de onda de 450 nm y 630 nm, para cada uno de los propóleos

PE-15, PE-16, PE-18 y para cada tipo de hongo analizado *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. En la tabla 11, 12, 13 se muestran los resultados de los promedios de las absorbancias (Promedio DO) medidas con el espectrofotómetro.

Tabla 11.- Absorbancias a 450nm y 630nm para *Aspergillus niger*.

	Concentración de propóleos		Absorbancia - DO _{450nm}							Absorbancia - DO _{630nm}						
	[mg/mL]	%	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 7	CP	Promedio DO	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 7	CP	Promedio DO
DO - P15	25	100	2,78 2	2,17 9	2,22 2	2,20 4	2,30 8	2,3 38	2,339	1,78 8	1,42 9	1,39 1	1,40 5	1,44 8	2,1 47	1,492
	12,5	50	2,37 0	1,38 8	0,71 3	1,01 8	1,08 3	2,2 34	1,314	1,58 6	0,78 5	0,48 6	0,46 1	0,49 6	2,0 35	0,763
	6,25	25	1,56 6	1,02 0	0,69 3	0,66 8	0,71 5	2,2 32	0,932	1,31 4	0,71 2	0,39 6	0,36 4	0,38 7	2,0 35	0,635
	3,125	12,5	0,94 5	0,58 4	0,42 7	0,40 6	0,44 3	2,2 78	0,561	0,97 1	0,49 2	0,26 2	0,25 8	0,27 6	2,0 59	0,452
	1,562	6,25	0,74 0	0,47 1	0,30 5	0,27 9	0,27 5	2,4 35	0,414	0,71 8	0,35 9	0,20 0	0,19 4	0,19 9	2,0 76	0,334
	0,781	3,12	0,47 3	0,33 7	0,22 1	0,21 1	0,21 7	2,3 05	0,292	0,48 4	0,26 6	0,17 7	0,17 3	0,17 6	1,9 82	0,255
	0,39	1,56	0,37 4	0,24 5	0,19 3	0,17 1	0,17 5	2,2 78	0,232	0,36 9	0,19 7	0,16 0	0,15 6	0,15 9	2,0 60	0,208
	0,195	0,78	0,25 5	0,20 2	0,16 5	0,15 0	0,15 4	2,2 40	0,185	0,25 0	0,15 2	0,14 2	0,14 1	0,14 5	2,0 32	0,166
DO - P16	25	100	2,88 4	2,32 1	2,29 3	2,19 6	2,25 9	2,3 38	2,391	1,76 8	1,44 4	1,36 5	1,36 4	1,38 7	2,1 47	1,465
	12,5	50	1,58 4	1,19 8	1,14 2	1,19 6	1,19 7	2,2 34	1,263	1,32 9	1,06 5	0,94 0	0,92 6	0,94 1	2,0 35	1,040
	6,25	25	1,07 7	0,84 1	0,76 0	0,79 3	0,78 2	2,2 32	0,851	0,94 0	0,72 0	0,63 3	0,64 6	0,60 8	2,0 35	0,709
	3,125	12,5	0,67 0	0,50 3	0,55 5	0,51 6	0,52 7	2,2 78	0,554	0,68 0	0,45 4	0,41 8	0,42 7	0,43 4	2,0 59	0,483
	1,562	6,24	0,58 8	0,41 4	0,40 9	0,39 7	0,40 1	2,4 35	0,441	0,64 8	0,36 3	0,32 6	0,33 3	0,33 6	2,0 76	0,401
	0,781	3,12	0,51 4	0,32 0	0,27 9	0,26 9	0,27 5	2,3 05	0,332	0,50 1	0,26 2	0,22 4	0,23 1	0,23 3	1,9 82	0,290
	0,39	1,56	0,33 6	0,25 7	0,21 6	0,19 8	0,20 1	2,2 78	0,242	0,32 0	0,20 2	0,17 5	0,18 1	0,18 1	2,0 60	0,212
	0,195	0,78	0,25 8	0,21 9	0,18 3	0,17 4	0,17 7	2,2 40	0,202	0,24 2	0,16 9	0,15 4	0,16 3	0,16 6	2,0 32	0,179

DO - P18	25	100	3,49 6	2,09 7	1,86 2	1,92 7	1,92 6	2,3 46	2,262	2,39 4	1,55 2	1,19 8	1,24 5	1,27 3	2,1 23	1,532
	12,5	50	2,59 9	1,96 0	1,83 1	2,00 3	2,00 0	2,3 54	2,079	1,94 4	1,49 4	1,26 0	1,33 4	1,35 4	2,1 24	1,477
	6,25	25	2,34 5	1,43 3	1,24 7	1,22 0	1,22 7	2,3 53	1,494	1,51 4	0,84 4	0,68 2	0,67 9	0,67 9	2,1 39	0,879
	3,125	12,5	1,31 4	0,75 6	0,66 0	0,65 6	0,66 4	2,4 03	0,810	1,17 9	0,59 1	0,49 9	0,50 1	0,50 1	2,1 37	0,654
	1,562	6,24 8	1,38 3	0,76 5	0,57 5	0,56 7	0,56 1	2,4 85	0,770	1,21 1	0,58 8	0,44 7	0,44 6	0,44 3	2,1 41	0,627
	0,781	3,12 4	0,71 2	0,51 7	0,41 1	0,41 2	0,41 8	2,4 26	0,494	0,72 3	0,46 7	0,37 1	0,37 4	0,37 3	2,1 32	0,462
	0,39	1,56	0,50 8	0,37 0	0,29 3	0,29 4	0,29 6	2,4 15	0,352	0,52 2	0,32 0	0,24 7	0,25 5	0,25 4	2,1 30	0,320
	0,195	0,78	0,36 9	0,28 0	0,21 7	0,21 4	0,21 7	2,4 33	0,259	0,37 0	0,23 1	0,18 2	0,19 4	0,19 5	2,1 26	0,234

Tabla 12.- Absorbancias a 450nm y 630nm para *Candida albicans*.

Concentración de propóleos		Absorbancia - DO _{450nm}							Absorbancia - DO _{630nm}					
[mg/mL]	%	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	CP	Promedio DO	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	CP	Promedio DO	
DO - P15	25	100	2,925	1,944	1,961	1,975	2,339	2,201	1,939	1,245	1,240	1,239	2,247	1,416
	12,5	50	2,521	1,538	1,214	1,117	2,376	1,598	1,395	0,929	0,665	0,610	2,185	0,900
	6,25	25	1,949	1,391	0,983	0,856	2,314	1,295	1,575	1,018	0,657	0,563	2,163	0,953
	3,125	12,5	1,457	0,822	0,458	0,406	2,320	0,786	1,308	0,665	0,313	0,290	2,159	0,644
	1,562	6,25	1,103	0,511	0,334	0,317	2,312	0,566	1,029	0,426	0,259	0,251	2,157	0,491
	0,781	3,12	0,809	0,385	0,278	0,259	2,328	0,433	0,769	0,325	0,230	0,219	2,169	0,386
	0,39	1,56	0,526	0,293	0,234	0,220	2,263	0,318	0,501	0,255	0,201	0,198	2,113	0,289
	0,195	0,78	0,362	0,272	0,229	0,205	2,224	0,267	0,333	0,251	0,210	0,204	2,116	0,250
DO - P16	25	100	2,987	2,173	2,109	2,094	2,339	2,341	2,335	1,366	1,316	1,310	2,247	1,582
	12,5	50	2,736	1,852	1,771	1,736	2,376	2,024	2,062	1,374	1,323	1,310	2,185	1,517
	6,25	25	2,368	1,679	1,600	1,563	2,314	1,802	1,946	1,297	1,219	1,204	2,163	1,417
	3,125	12,5	1,534	0,779	0,678	0,661	2,320	0,913	1,421	0,691	0,601	0,585	2,159	0,824
	1,562	6,248	1,328	0,606	0,516	0,499	2,312	0,737	1,255	0,505	0,438	0,430	2,157	0,657
	0,781	3,124	1,055	0,432	0,369	0,351	2,328	0,552	1,021	0,368	0,323	0,319	2,169	0,508
	0,39	1,56	0,761	0,344	0,291	0,280	2,263	0,419	0,733	0,317	0,263	0,260	2,113	0,393
	0,195	0,78	0,562	0,311	0,259	0,245	2,224	0,344	0,556	0,276	0,238	0,235	2,116	0,326
DO - P18	25	100	3,496	3,198	3,114	3,086	2,347	3,223	2,417	1,596	1,518	1,506	2,167	1,759
	12,5	50	3,243	2,864	2,741	2,731	2,355	2,895	2,236	1,690	1,601	1,595	2,157	1,780

	6,25	25	2,459	1,249	1,038	0,994	2,355	1,435	1,906	0,899	0,686	0,662	2,164	1,038
	3,125	12,5	2,088	0,999	0,733	0,701	2,419	1,131	1,751	0,802	0,560	0,536	2,151	0,912
	1,562	6,248	1,684	0,805	0,551	0,525	2,441	0,891	1,534	0,690	0,444	0,425	2,250	0,773
	0,781	3,124	1,288	0,623	0,386	0,355	2,444	0,663	1,254	0,552	0,320	0,304	2,157	0,607
	0,39	1,56	0,937	0,495	0,300	0,281	2,431	0,503	0,966	0,450	0,267	0,255	2,153	0,484
	0,195	0,78	0,647	0,398	0,288	0,272	2,452	0,401	0,650	0,366	0,268	0,260	2,157	0,386

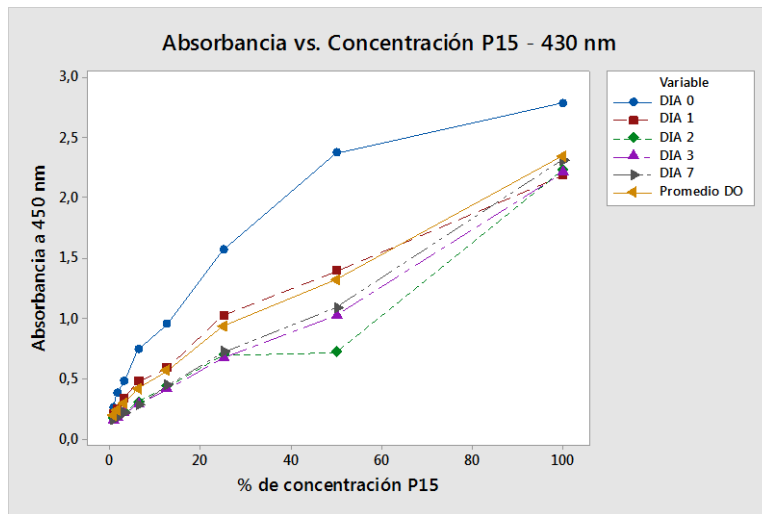
Tabla 13.- Absorbancias a 450nm y 630nm para *Malassezia furfur*.

	Concentración de propóleos		Absorbancia - DO _{450nm}							Absorbancia - DO _{630nm}						
	[mg/mL]	%	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 7	CP	Promedio DO	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 7	CP	Promedio DO
DO - P15	25	100	1,99 2	1,47 0	1,46 1	1,47 7	1,53 1	1,8 40	1,586	1,36 2	0,90 3	0,88 1	0,88 3	0,91 9	1,5 35	0,990
	12,5	50	1,53 0	1,44 9	0,75 0	0,67 6	0,70 3	1,6 34	1,022	1,12 6	0,92 6	0,62 3	0,57 1	0,59 7	1,6 59	0,769
	6,25	25	1,22 6	1,32 2	0,60 9	0,54 4	0,54 6	1,6 10	0,849	0,99 7	0,69 0	0,59 6	0,51 4	0,50 0	1,4 86	0,659
	3,125	12,5	0,94 3	0,54 9	0,29 2	0,28 3	0,34 0	1,5 83	0,482	0,83 8	0,69 5	0,29 3	0,28 3	0,32 1	1,4 53	0,486
	1,562	6,25	0,32 7	0,33 2	0,21 2	0,21 1	0,25 0	1,5 94	0,267	0,65 0	0,41 5	0,23 6	0,23 1	0,27 6	1,4 37	0,362
	0,781	3,12	0,45 4	0,24 5	0,18 7	0,18 5	0,18 2	1,7 56	0,251	0,63 0	0,31 2	0,22 5	0,22 0	0,21 1	1,5 94	0,320
	0,39	1,56	0,33 3	0,18 2	0,14 5	0,14 9	0,14 1	1,5 63	0,190	0,44 7	0,24 3	0,18 1	0,18 2	0,16 4	1,4 64	0,244
	0,195	0,78	0,24 6	0,15 5	0,12 7	0,12 7	0,10 6	1,5 03	0,152	0,32 2	0,20 1	0,15 5	0,15 0	0,12 1	1,6 48	0,190
DO - P16	25	100	2,27 0	2,16 9	1,37 6	1,35 1	1,32 7	1,8 40	1,699	1,57 1	0,96 0	0,88 0	0,86 7	0,84 5	1,5 35	1,025
	12,5	50	1,76 6	1,27 1	1,19 3	1,17 1	1,15 3	1,6 34	1,311	1,37 9	0,94 0	0,86 9	0,85 4	0,83 5	1,6 59	0,976
	6,25	25	1,24 5	0,74 6	0,94 4	0,63 3	0,61 9	1,6 10	0,837	1,07 5	0,90 6	0,75 5	0,73 3	0,72 2	1,4 86	0,838
	3,125	12,5	0,99 2	0,73 8	0,63 4	0,63 3	0,61 2	1,5 83	0,722	0,90 6	0,65 7	0,53 8	0,52 7	0,51 0	1,4 53	0,628
	1,562	6,248	0,78 6	0,50 0	0,42 2	0,42 2	0,40 2	1,5 94	0,506	0,75 8	0,46 4	0,37 4	0,36 1	0,33 7	1,4 37	0,459
	0,781	3,124	0,85 4	0,37 0	0,30 0	0,30 1	0,27 4	1,7 56	0,420	0,84 5	0,34 4	0,26 6	0,25 8	0,23 0	1,5 94	0,389
	0,39	1,56	0,65 0	0,32 7	0,27 1	0,26 9	0,23 6	1,5 63	0,351	0,64 7	0,30 6	0,24 4	0,23 1	0,19 2	1,4 64	0,324
	0,195	0,78	0,50 2	0,27 3	0,23 7	0,23 4	0,20 1	1,5 03	0,289	0,50 2	0,25 0	0,20 6	0,19 6	0,15 9	1,6 48	0,263
DO - P18	25	100	2,33 4	2,17 6	2,06 3	2,01 1	2,09 0	2,1 35	2,135	1,64 7	1,11 6	1,05 0	1,04 5	1,03 4	1,1 78	1,178
	12,5	50	2,10 6	1,36 5	1,23 4	1,19 5	1,21 2	1,4 22	1,422	1,44 3	0,87 8	0,77 0	0,75 3	0,74 5	0,9 18	0,918

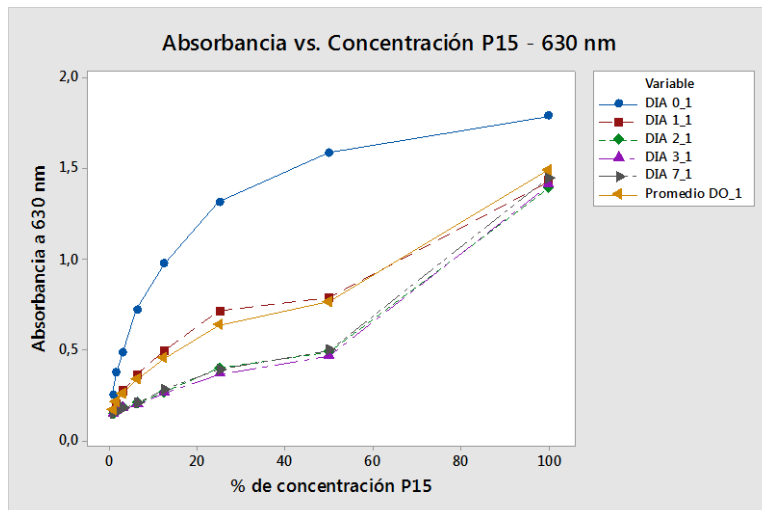
6,25	25	1,58 0	1,24 4	0,96 8	0,60 7	0,60 3	1,0 00	1,000	1,22 9	0,90 8	0,63 3	0,60 7	0,59 1	0,7 94	0,794
3,125	12,5	1,30 4	0,61 9	0,43 6	0,42 5	0,41 4	0,6 40	0,640	1,11 1	0,76 5	0,50 2	0,48 7	0,46 4	0,6 66	0,666
1,562	6,248	1,04 1	0,47 3	0,30 7	0,30 3	0,29 8	0,4 84	0,484	0,96 5	0,62 7	0,37 9	0,36 9	0,35 6	0,5 39	0,539
0,781	3,124	0,78 9	0,33 9	0,21 7	0,22 0	0,21 5	0,3 56	0,356	0,77 9	0,47 1	0,27 8	0,27 5	0,26 2	0,4 13	0,413
0,39	1,56	0,56 8	0,23 3	0,15 8	0,15 2	0,13 9	0,2 50	0,250	0,89 1	0,32 1	0,20 8	0,20 0	0,17 8	0,3 60	0,360
0,195	0,78	0,40 4	0,21 6	0,16 8	0,13 2	0,11 3	0,2 07	0,207	0,63 5	0,25 5	0,18 3	0,20 6	0,18 6	0,2 93	0,293

Las tablas 11 a 13 muestran también las absorbancias para el control positivo de inhibición (CP) mismo que también es resultado del promedio entre las absorbancias de los CP medidos para cada día, para cada tipo de propóleo y para cada tipo de hongo analizado.

Por otra parte, las figuras 11, 12, 13 muestran los gráficos de dispersión de las absorbancias a longitudes de onda de 450 nm y 630 nm respecto al porcentaje de concentración de propóleos PE-15, PE-16 y PE-18, respectivamente, actuando en el hongo *Aspergillus niger*.

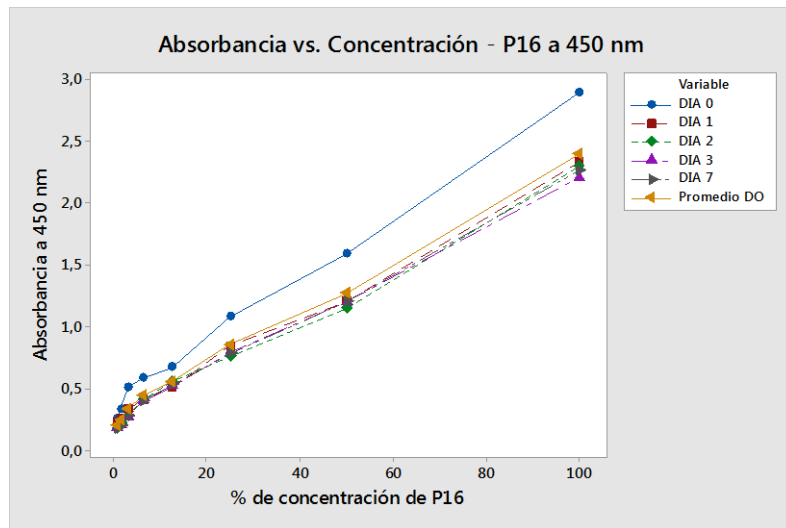


(i)

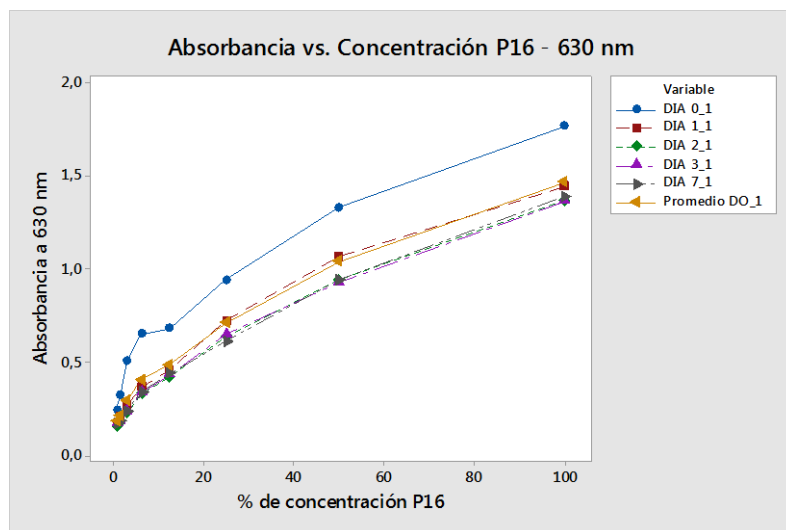


(ii)

Figura 11.- Absorbancias vs. Concentración de PE-15 a (i) 450nm y (ii) 630nm para *Aspergillus niger*.

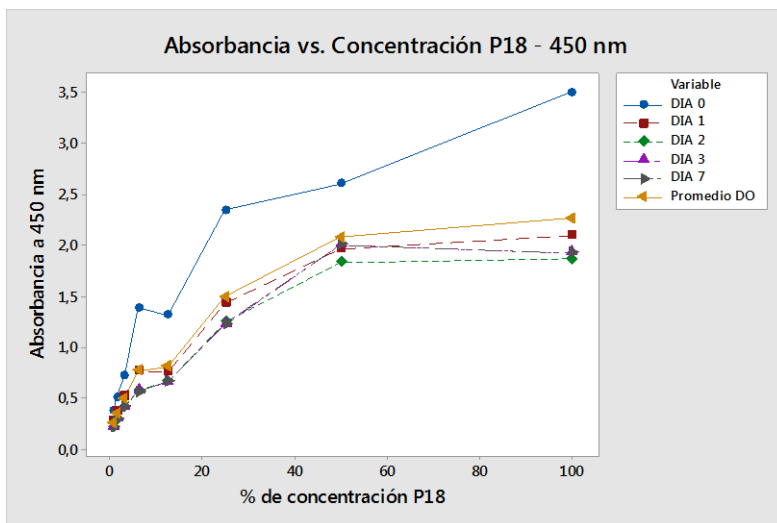


(i)

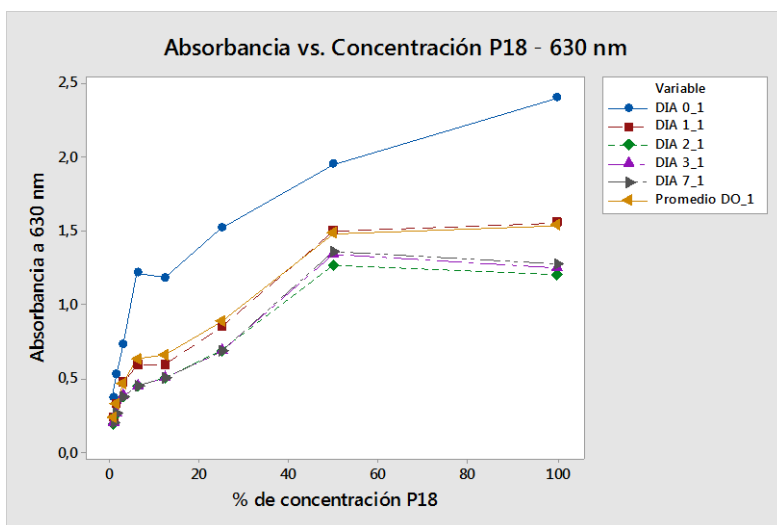


(ii)

Figura 12.- Absorbancias vs. Concentración de PE-16 a (i) 450nm y (ii) 630nm para *Aspergillus niger*.



(i)



(ii)

Figura 13.- Absorbancias vs. Concentración de PE-18 a (i) 450nm y (ii) 630nm para *Aspergillus niger*.

Como se observa en las figuras 11, 12, 13, la curva de las absorbancias promedio (curva tomate) muestra la tendencia de inhibición de los propóleos sobre el hongo

Aspergillus niger, por lo que se justifica la utilización de este valor para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Este resultado se obtuvo de igual manera para los hongos *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.

Con los valores promedio de absorbancias del CP y absorbancias promedio de los días en los que se midieron las DO, la CMI se determinó utilizando estos resultados y considerando el siguiente criterio:

- Si la absorbancia promedio DO son cercanas o iguales a las absorbancias del control positivo CP, se consideró que la concentración de propóleos actúa inhibiendo el crecimiento de los hongos; para lo cual se calculó la diferencia entre estos valores.
- Seguido se calculó la relación de estas absorbancias en porcentaje. Los valores cercanos a cero indican que las absorbancias son similares y existe inhibición del crecimiento del hongo. Valores por encima del 80% se consideró que no existe inhibición, tal como lo indica Malbran (2012), en su artículo “Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución” en donde menciona que “el punto final de la CMI corresponderá a la concentración en la que haya más del 80% de reducción del crecimiento comparado con el control”.

$$\%reduccion = 1 - \frac{Absorbancia\ control\ positivo - Absorbancia\ promedio\ medida}{Absorbancia\ control\ positivo} \times 100$$

$$\%reduccion = 1 - \frac{DO_CP - DO_promedio}{DO_CP} \times 100$$

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 14, 16, 17.

Hongo: *Aspergillus niger*

Tabla 14.- CMI de cada propóleos para *Aspergillus niger* a 450nm y 630nm.

	Concentración		DO _{450nm}				DO _{630nm}			
	[mg/mL]	%	CP	Promedio DO	CP-DO	CMI	CP	Promedio DO	CP-DO	CM I
DO - P15	25	100	2,338	2,339	-0,001	100%	2,147	1,492	0,654	70%
	12,5	50	2,234	1,314	0,919	59%	2,035	0,763	1,273	37%
	6,25	25	2,232	0,932	1,300	42%	2,035	0,635	1,401	31%
	3,125	12,5	2,278	0,561	1,717	25%	2,059	0,452	1,607	22%
	1,562	6,25	2,435	0,414	2,021	17%	2,076	0,334	1,742	16%
	0,781	3,12	2,305	0,292	2,014	13%	1,982	0,255	1,727	13%
	0,39	1,56	2,278	0,232	2,046	10%	2,060	0,208	1,852	10%
	0,195	0,78	2,240	0,185	2,055	8%	2,032	0,166	1,866	8%
DO - P16	25	100	2,338	2,391	-0,053	102%	2,147	1,465	0,681	68%
	12,5	50	2,234	1,263	0,970	57%	2,035	1,040	0,995	51%
	6,25	25	2,232	0,851	1,381	38%	2,035	0,709	1,326	35%
	3,125	12,5	2,278	0,554	1,724	24%	2,059	0,483	1,576	23%
	1,562	6,25	2,435	0,441	1,995	18%	2,076	0,401	1,675	19%
	0,781	3,12	2,305	0,332	1,973	14%	1,982	0,290	1,692	15%
	0,39	1,56	2,278	0,242	2,036	11%	2,060	0,212	1,849	10%
	0,195	0,78	2,240	0,202	2,038	9%	2,032	0,179	1,853	9%
DO - P18	25	100	2,346	2,262	0,085	96%	2,123	1,532	0,590	72%
	12,5	50	2,354	2,079	0,275	88%	2,124	1,477	0,647	70%
	6,25	25	2,353	1,494	0,859	64%	2,139	0,879	1,260	41%
	3,125	12,5	2,403	0,810	1,593	34%	2,137	0,654	1,483	31%
	1,562	6,24	2,485	0,770	1,714	31%	2,141	0,627	1,514	29%

	0,781	3,12 4	2,42 6	0,494	1,932	20%	2,13 2	0,462	1,670	22%
	0,39	1,56	2,41 5	0,352	2,063	15%	2,13 0	0,320	1,810	15%
	0,195	0,78	2,43 3	0,259	2,174	11%	2,12 6	0,234	1,892	11%

Como se puede apreciar en la tabla 14, la CMI utilizando el PE-15 es de 25mg/mL (100%) para el hongo *Aspergillus niger*. Esto indica el límite de concentración mínima de PE-15 que se requiere para que empiece a inhibir el crecimiento del hongo.

La CMI utilizando el PE-16 es de 25 mg/mL (100%) y con el PE-18 es de 12,5 mg/mL (50%).

En la figura 14 se muestra la relación existente entre el porcentaje de reducción de las absorbancias frente al porcentaje de concentración de los propóleos, en donde se observa que el punto final de inhibición ocurre entre los valores que se encuentran dentro del recuadro de color verde en la figura 14.

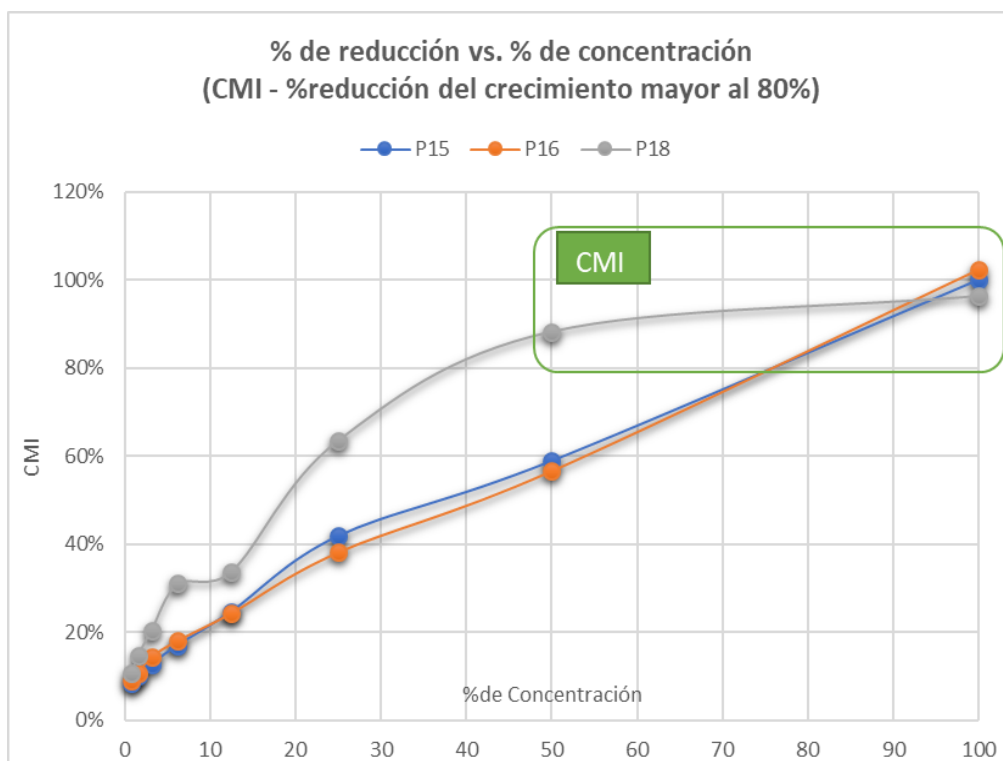


Figura 14.- Determinación de la CMI para el hongo *Aspergillus niger*.

En las tablas 15, 16, se muestran las CMI de los propóleos para los hongos *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.

Hongo: *Candida albicans*

Tabla 15.- CMI de cada propóleo para *Candida albicans* a 450nm y 630nm.

	Concentración		DO _{450nm}				DO _{630nm}			
	[mg/mL]	%	CP	Promedio DO	CP-DO	CMI	CP	Promedio DO	CP-DO	CMI
DO - P15	25	100	2,33 9	2,201	0,137	94%	2,24 7	1,416	0,831	63%
	12,5	50	2,37 6	1,598	0,779	67%	2,18 5	0,900	1,286	41%
	6,25	25	2,31 4	1,295	1,020	56%	2,16 3	0,953	1,210	44%
	3,125	12,5	2,32 0	0,786	1,535	34%	2,15 9	0,644	1,515	30%

	1,562	6,25	2,31 2	0,566	1,746	24%	2,15 7	0,491	1,666	23%
	0,781	3,12	2,32 8	0,433	1,895	19%	2,16 9	0,386	1,784	18%
	0,39	1,56	2,26 3	0,318	1,945	14%	2,11 3	0,289	1,824	14%
	0,195	0,78	2,22 4	0,267	1,957	12%	2,11 6	0,250	1,866	12%
DO - P16	25	100	2,33 9	2,341	-0,002	100 %	2,24 7	1,582	0,665	70%
	12,5	50	2,37 6	2,024	0,352	85%	2,18 5	1,517	0,668	69%
	6,25	25	2,31 4	1,802	0,512	78%	2,16 3	1,417	0,747	65%
	3,125	12,5	2,32 0	0,913	1,407	39%	2,15 9	0,824	1,335	38%
	1,562	6,24 8	2,31 2	0,737	1,575	32%	2,15 7	0,657	1,500	30%
	0,781	3,12 4	2,32 8	0,552	1,776	24%	2,16 9	0,508	1,661	23%
	0,39	1,56	2,26 3	0,419	1,845	19%	2,11 3	0,393	1,720	19%
	0,195	0,78	2,22 4	0,344	1,879	15%	2,11 6	0,326	1,790	15%
DO - P18	25	100	2,34 7	3,223	-0,876	137 %	2,16 7	1,759	0,408	81%
	12,5	50	2,35 5	2,895	-0,540	123 %	2,15 7	1,780	0,376	83%
	6,25	25	2,35 5	1,435	0,920	61%	2,16 4	1,038	1,126	48%
	3,125	12,5	2,41 9	1,131	1,289	47%	2,15 1	0,912	1,239	42%
	1,562	6,24 8	2,44 1	0,891	1,550	36%	2,25 0	0,773	1,477	34%
	0,781	3,12 4	2,44 4	0,663	1,781	27%	2,15 7	0,607	1,550	28%
	0,39	1,56	2,43 1	0,503	1,928	21%	2,15 3	0,484	1,669	22%
	0,195	0,78	2,45 2	0,401	2,051	16%	2,15 7	0,386	1,771	18%

La CMI utilizando el PE-15 para inhibir el crecimiento del hongo *Candida albicans* es de 25 mg/mL (100%), para el PE-16 es de 12,5 mg/mL (50%) y para el PE-18 es de 12,5 mg/mL (50%).

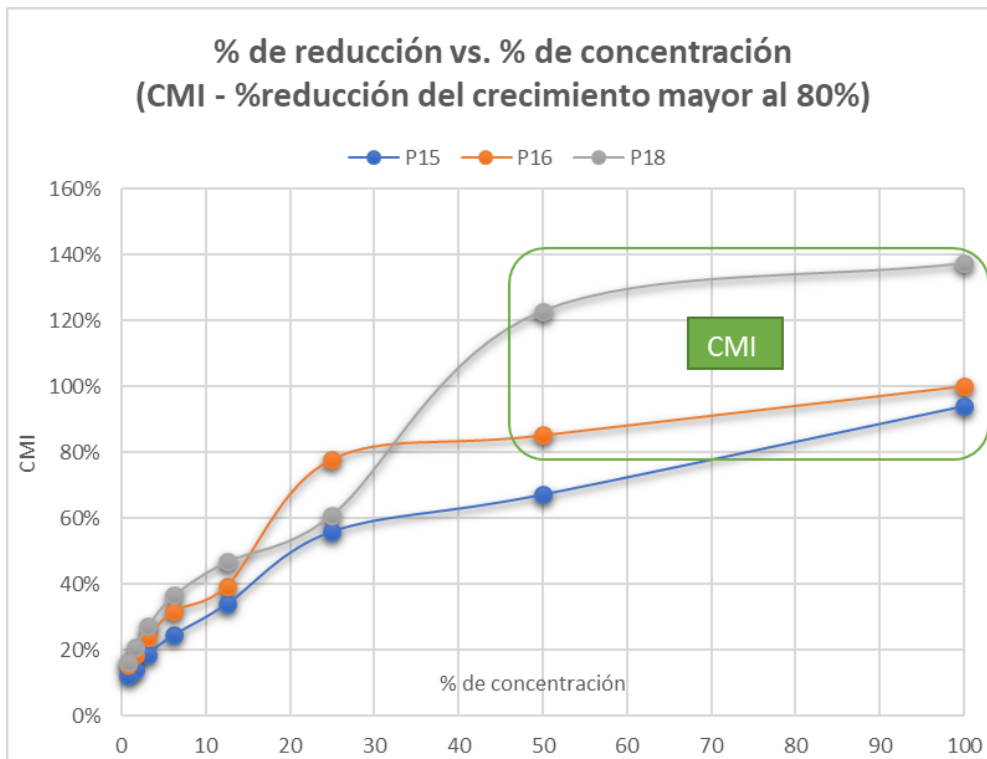


Figura 15.- Determinación de la CMI para el hongo *Candida albicans*.

Hongo: *Malassezia furfur*

Tabla 16.- CMI de cada propóleo para *Malassezia furfur* a 450nm y 630nm.

	Concentración		DO _{450nm}				DO _{630nm}			
	[mg/mL]	%	CP	Promedio DO	CP-DO	CIM	CP	Promedio DO	CP-DO	CIM
DO - P15	25	100	1,840	1,586	0,254	86%	1,535	0,990	0,546	64%
	12,5	50	1,634	1,022	0,612	63%	1,659	0,769	0,890	46%
	6,25	25	1,610	0,849	0,761	53%	1,486	0,659	0,826	44%
	3,125	12,5	1,583	0,482	1,102	30%	1,453	0,486	0,967	33%
	1,562	6,25	1,594	0,267	1,328	17%	1,437	0,362	1,075	25%
	0,781	3,12	1,756	0,251	1,506	14%	1,594	0,320	1,275	20%
	0,39	1,56	1,563	0,190	1,373	12%	1,464	0,244	1,221	17%
	0,195	0,78	1,503	0,152	1,350	10%	1,648	0,190	1,458	12%
DO - P16	25	100	1,840	1,699	0,141	92%	1,535	1,025	0,511	67%
	12,5	50	1,634	1,311	0,323	80%	1,659	0,976	0,683	59%
	6,25	25	1,610	0,837	0,773	52%	1,486	0,838	0,648	56%
	3,125	12,5	1,583	0,722	0,862	46%	1,453	0,628	0,825	43%
	1,562	6,248	1,594	0,506	1,088	32%	1,437	0,459	0,978	32%
	0,781	3,124	1,756	0,420	1,336	24%	1,594	0,389	1,206	24%
	0,39	1,56	1,563	0,351	1,213	22%	1,464	0,324	1,140	22%
	0,195	0,78	1,503	0,289	1,213	19%	1,648	0,263	1,385	16%
DO - P18	25	100	2,135	2,135	0,000	100%	1,178	1,178	0,000	100%
	12,5	50	1,422	1,422	0,000	100%	0,918	0,918	0,000	100%
	6,25	25	1,000	1,000	0,000	100%	0,794	0,794	0,000	100%
	3,125	12,5	0,640	0,640	0,000	100%	0,666	0,666	0,000	100%
	1,562	6,248	0,484	0,484	0,000	100%	0,539	0,539	0,000	100%
	0,781	3,124	0,356	0,356	0,000	100%	0,413	0,413	0,000	100%
	0,39	1,56	0,250	0,250	0,000	100%	0,360	0,360	0,000	100%
	0,195	0,78	0,207	0,207	0,000	100%	0,293	0,293	0,000	100%

La CMI utilizando el PE-15 para inhibir el crecimiento del hongo *Malassezia furfur* es de 25 mg/mL (100%). Para el PE-16 es de 12,5 mg/mL (50%) y para el PE-18, se considera que la CMI está por debajo del 0,195 mg/mL.

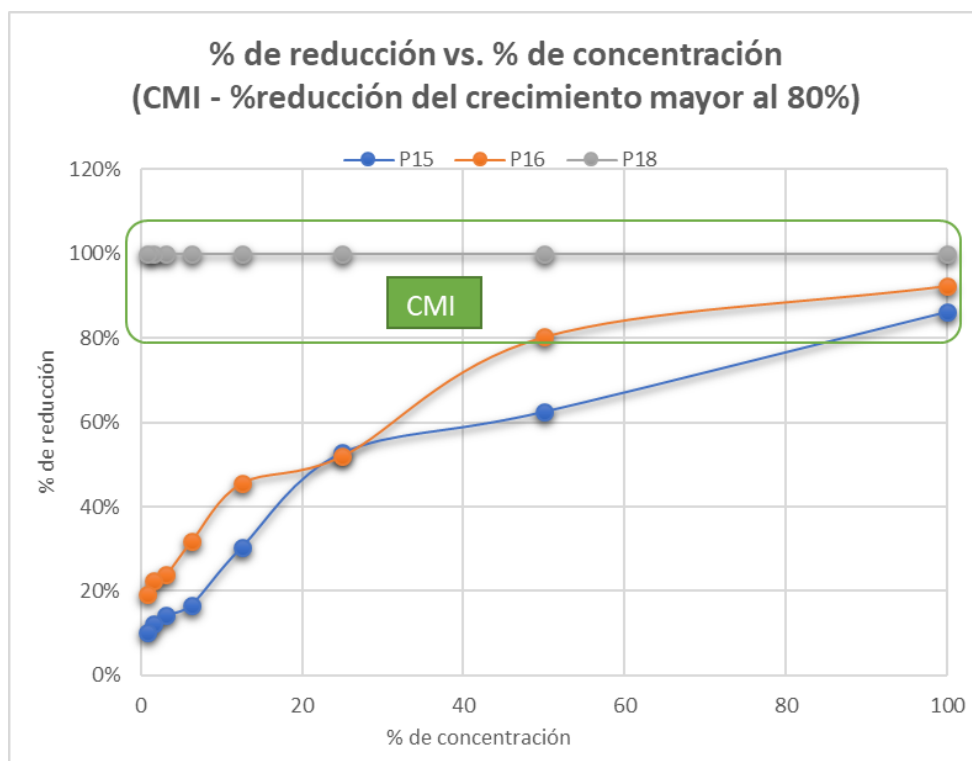


Figura 16.- Determinación de la CMI para el hongo *Malassezia furfur*.

Los resultados obtenidos de las CMI utilizando los propóleos PE-15, PE-16 y PE-18 para inhibir el crecimiento de cada tipo de hongo analizado, se resume en la tabla 17.

Tabla 17.- CMI para cada hongo por tipo de propóleos

Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL) - CMI			
	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. furfur</i>
P15	25	25	25
P16	25	12,5	12,5
P18	12,5	12,5	0,195

4.5 Relación existente entre la composición química de los extractos de propóleos y la concentración mínima inhibitoria

Para encontrar la relación existente entre la composición química de los propóleos y la concentración mínima inhibitoria de los propóleos frente a los hongos analizados, fue necesario en primer instancia separar el porcentaje de polioles, diterpenos y triterpenos que cada tipo de propóleos tienen a partir de la cromatografía de gases, tabla 18, para luego realizar una gráfica de línea ajustada a partir de una regresión lineal utilizando Minitab 18.

Tabla 18.- *Composición Química de los Propóleos.*

PROPÓLEOS	Cromatografía de gases		
	Composición Química de los Propóleos		
	% POLIOLES	% DITERPENOS	% TRITERPENOS
P15	15,660	53,630	30,700
P16	42,590	42,140	15,260
P18	66,800	14,810	18,380

Tabla 19.- *Composición Química de los Propóleos y CMI.*

PROPÓLEOS	Cromatografía de gases			CMI		
	Composición Química de los Propóleos			[mg/mL]		
	% POLIOLES	% DITERPENOS	% TRITERPENOS	A. niger	C. albicans	M. furfur
P15	15,660	53,630	30,700	25	25	25
P16	42,590	42,140	15,260	25	12,5	12,5
P18	66,800	14,810	18,380	12,5	12,5	0,195

Los resultados de los parámetros de la regresión lineal efectuada se muestran en la tabla 20.

Tabla 20.- Resultados de la regresión lineal realizada en Minitab 18.

	A. niger		C. albicans		M. furfur	
	<i>P</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>	<i>R</i> ²
% POLIOLES	0,353	72,30	0,314	77,61	0,017	99,93
% DITERPENOS	0,186	91,70	0,481	53,04	0,150	94,54
% TRITERPENOS	0,789	10,58	0,122	96,35	0,453	57,38

p = probabilidad, *R*² = coeficiente de regresión lineal (%)

4.5.1 Relación entre el porcentaje de polioles, diterpenos y triterpenos frente a la CMI para *Aspergillus niger*

La figura 17, muestra que no hay una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de polioles de los propóleos 15, 16 y 18 (variable de respuesta) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) (predictor), debido a que la probabilidad obtenida a partir de un análisis de regresión lineal es de $p = 0,353$ siendo mayor que el nivel de significancia de 0,05. Sin embargo, el coeficiente de correlación (R^2) obtenido es del 72,3% entre la variación del por ciento de polioles y la CMI.

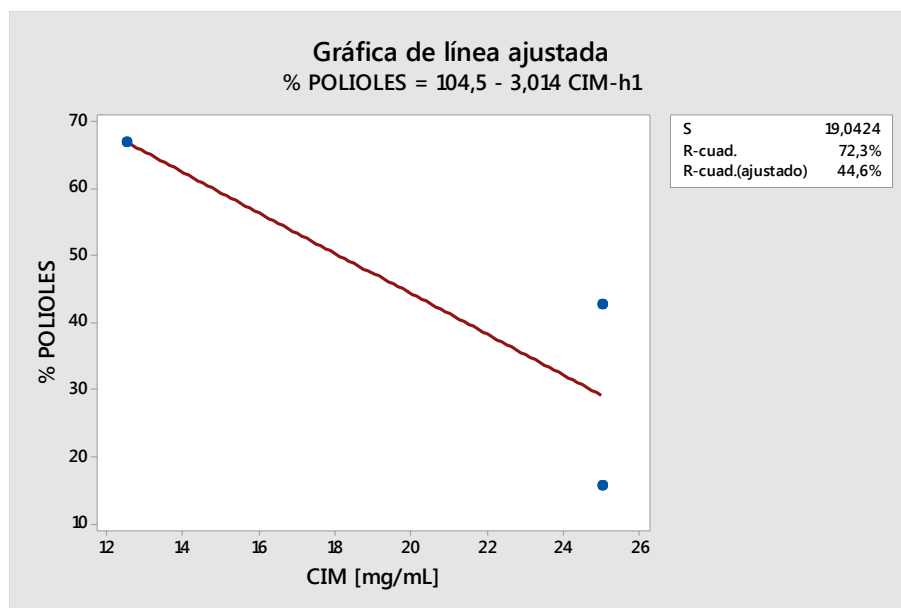


Figura 17.- Relación entre el % de polioles y la CMI para *Aspergillus niger*.

Esto permite concluir que cuanto mayor sea el porcentaje de polioles que contengan los propóleos, menor será la CMI. En este sentido, el PE-18, que tiene mayor concentración de polioles es el que menor concentración requiere en mg/mL para inhibir el crecimiento de los hongos, conforme se muestra en la tabla 18.

Por otra parte, el análisis de diterpenos en los propóleos, figura 18, tampoco muestra una asociación estadísticamente significativa entre los porcentajes contenidos en los propóleos 15, 16 y 18 y la concentración mínima inhibitoria (CMI) debido a que la probabilidad obtenida es de $p = 0,186$. Sin embargo, el coeficiente de regresión (R^2) obtenido es del 91,7%, (valor cercano al 100%) lo que permite deducir que la relación entre el porcentaje de diterpenos y la CMI es directamente proporcional, como se aprecia en la figura 18.

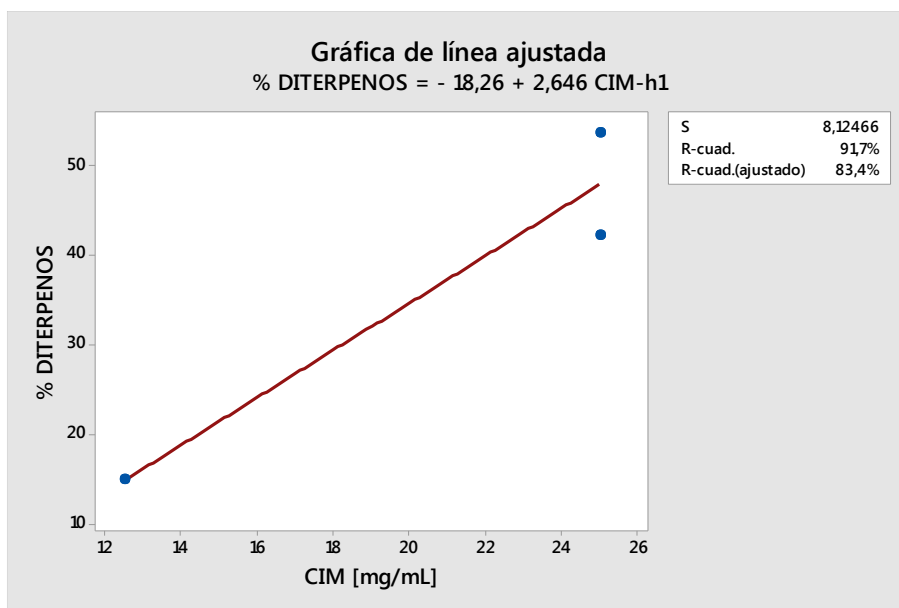


Figura 18.- Relación entre el % de diterpenos y la CMI para *Aspergillus niger*.

Finalmente, la figura 19, muestra el análisis de regresión entre el porcentaje de triterpenos contenidos en los propóleos 15, 16 y 18, donde tampoco existe una asociación estadísticamente significativa con la concentración mínima inhibitoria (CMI), ya que la probabilidad obtenida es mayor al nivel de significancia de $p = 0,789$.

El coeficiente de regresión (R^2) obtenido es del 10,58% por lo que no podemos afirmar que existe alguna relación entre la CMI y la cantidad de triterpenos que tengan los propóleos.

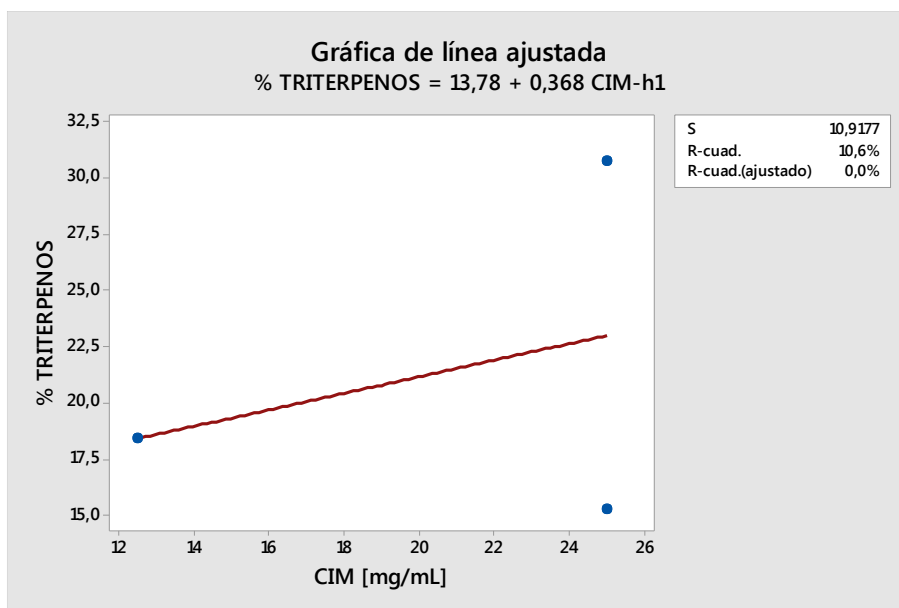
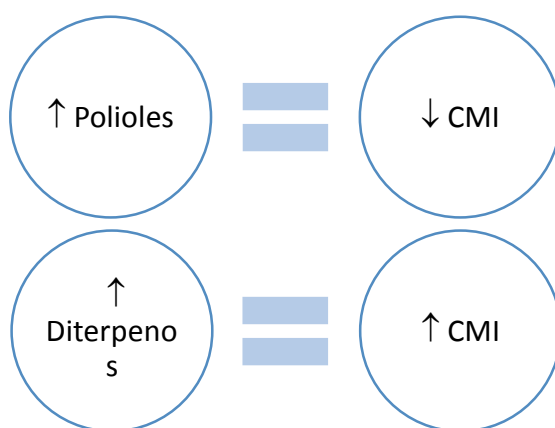


Figura 19,- Relación entre el % de triterpenos y la CMI para *Aspergillus niger*.

Considerando estos resultados se puede afirmar que cuanto mayor sea el porcentaje de polioles que presente la composición química de los propóleos, menor será la concentración mínima inhibitoria CMI que se requiera para inhibir el crecimiento de los hongos. Asimismo, cuanto mayor sea la CMI, mayor será la cantidad de diterpenos que contenga el propóleo.



4.5.2 Relación entre el porcentaje de polioles, diterpenos y triterpenos frente a la CMI para *Candida albicans* y *Malassezia furfur*

Las figuras 20 y 21, muestran las gráficas de línea ajustada del porcentaje de polioles de cada propóleo frente a los hongos *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.

Para el caso de la *Candida albicans*, no hay una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de polioles de los propóleos 15, 16 y 18 y la CMI, debido a que la probabilidad obtenida es 0,314 (ver tabla 21). Sin embargo, para la *Malassezia furfur*, sí existe una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de polioles y la CMI ya que la probabilidad obtenida es $p = 0,017$.

Los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos en ambos casos son 77,61% y 99,93% respectivamente, mostrando una fuerte relación entre estas variables, Al igual que con el hongo *Aspergillus niger*, el porcentaje de polioles y la CMI están relacionados inversamente, esto es, a mayor cantidad de polioles menor será la CMI.

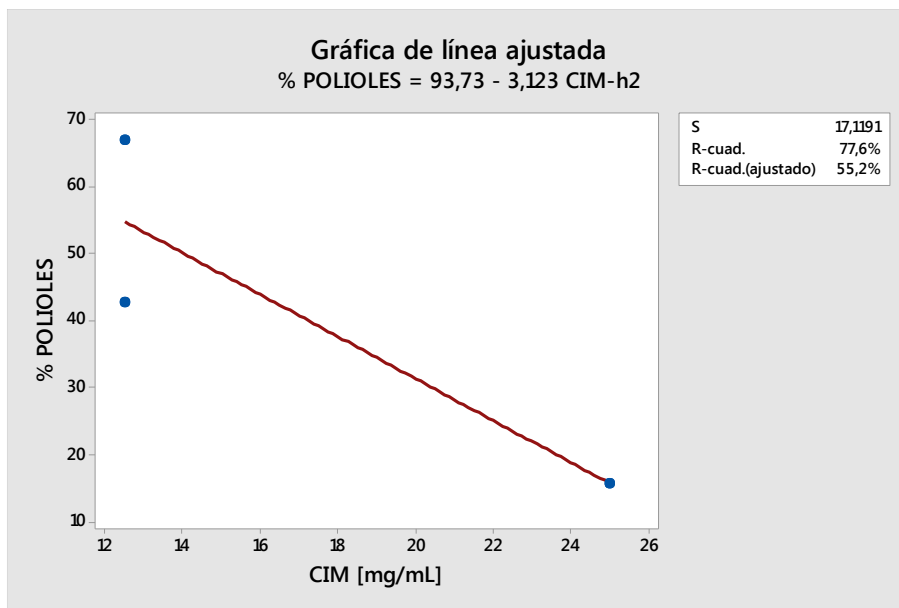


Figura 20.- Relación entre el % de polioles y la CMI para *Candida albicans*.

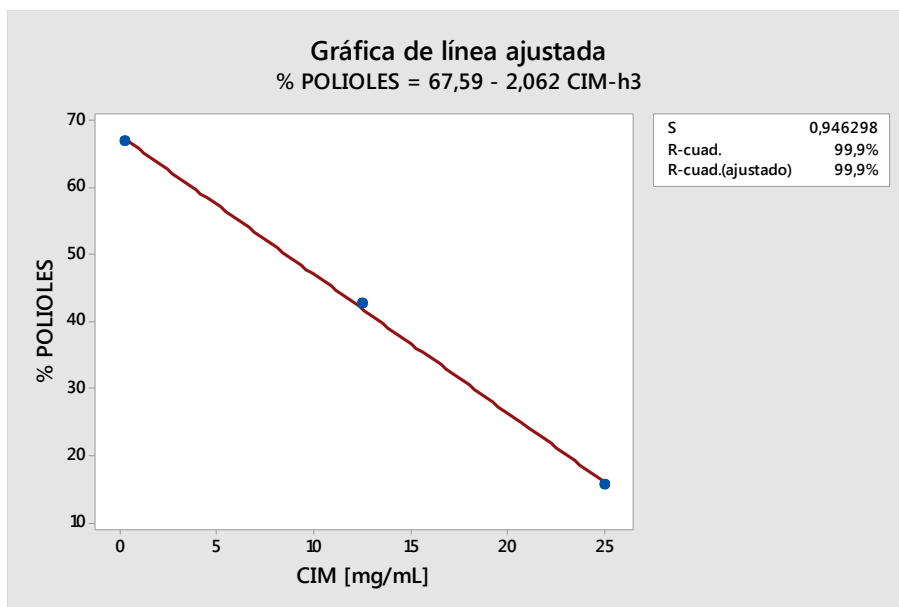


Figura 21.- Relación entre el % de polioles y la CMI para *Malassezia furfur*.

Las figuras 22 a 25, muestran las gráficas de línea ajustada para el porcentaje de diterpenos y triterpenos frente a la CMI para los hongos *Candida albicans* y *Malassezia furfur*,

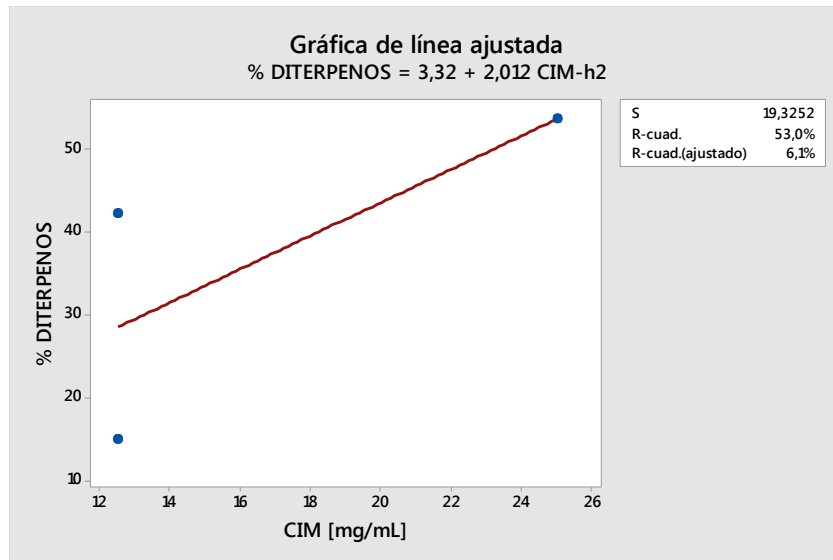


Figura 22.- Relación entre el % de diterpenos y la CMI para *Candida albicans*.

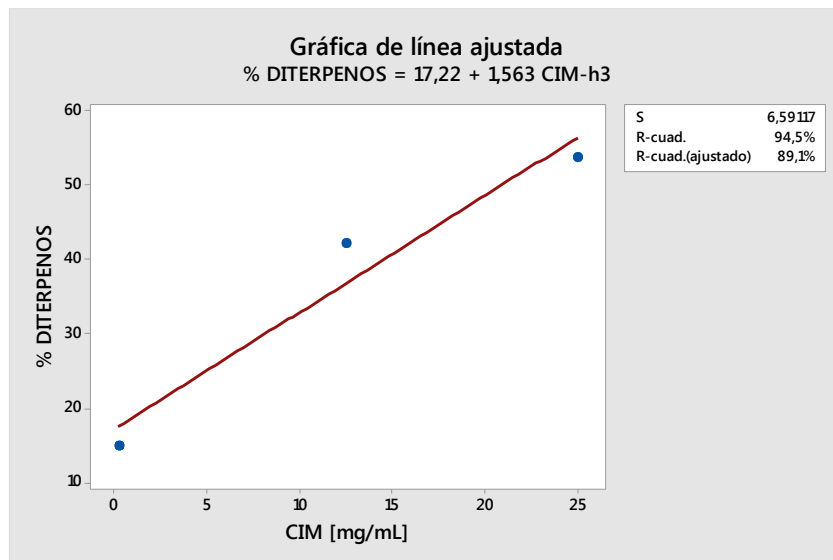


Figura 23.- Relación entre el % de diterpenos y la CMI para *Malassezia furfur*.

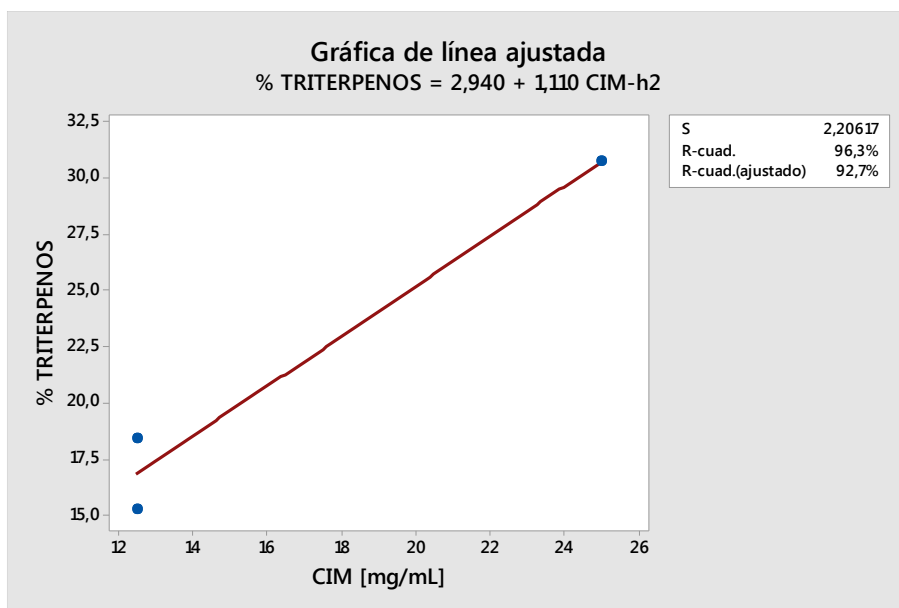


Figura 24.- Relación entre el % de triterpenos y la CMI para *Candida albicans*.

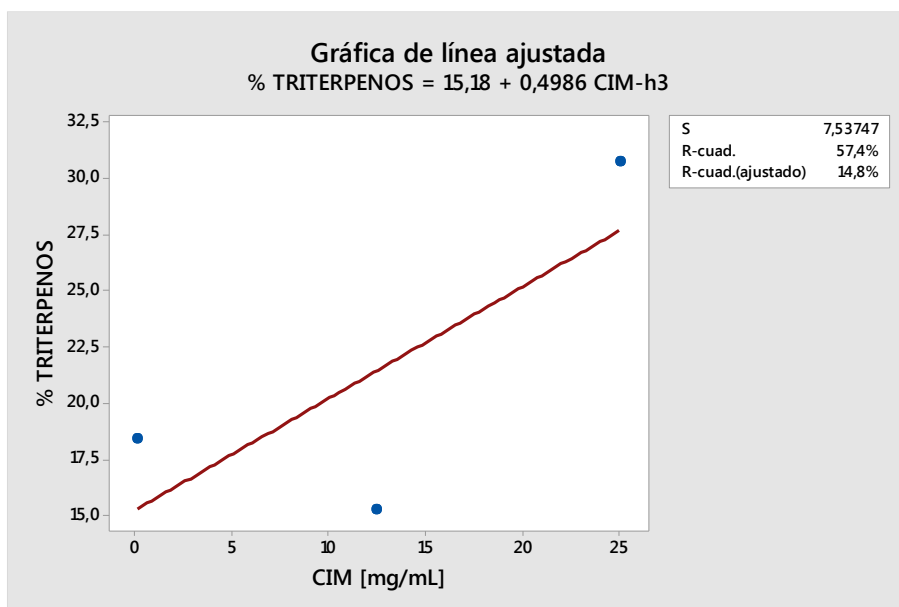


Figura 25.- Relación entre el % de triterpenos y la CMI para *Malassezia furfur*.

En todas las gráficas se aprecia que la relación entre la cantidad de diterpenos y triterpenos y la CMI es proporcional, tal cual ocurrió con *Aspergillus niger*.

Adicionalmente se hizo una prueba de ANOVA de un solo factor conjuntamente con la prueba de Tukey para obtener una comparación simultánea entre los propóleos 15, 16 y 18 para ver cuál de estos es el más efectivo para inhibir el crecimiento de los hongos.

La gráfica de intervalos, figura 26, muestra intervalos de confianza de 95% para cada media. Se observa que el propóleo 18 tiene la media más pequeña de CMI equivalente a 8,4 mg/mL con un intervalo de confianza entre 0,138 a 16,658 mg/mL, seguida del PE-16 con una media de 16,67 mg/mL; mientras que el PE-15 queda con una media alejada de 25 mg/mL.

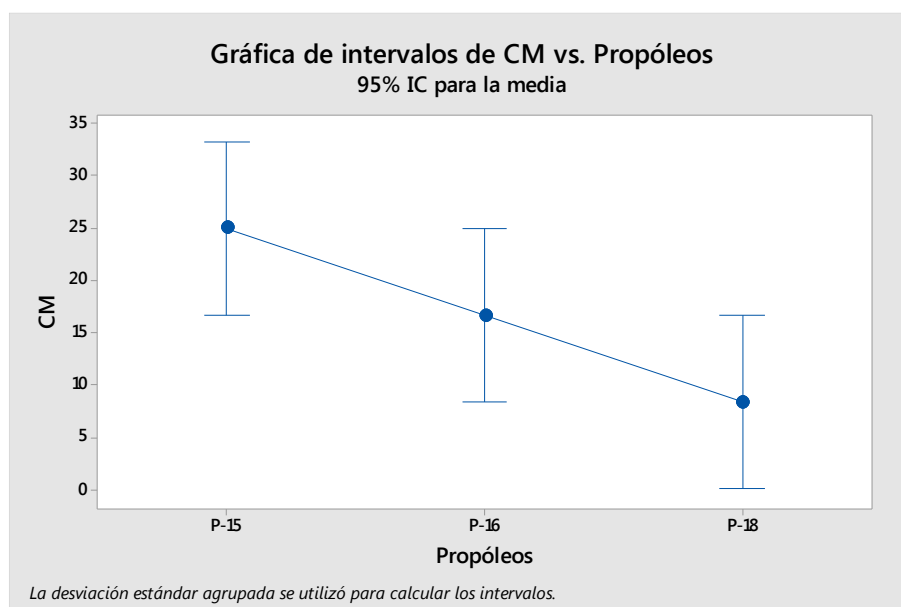


Figura 26.- Gráfica de intervalos de CMI vs. Propóleos.

Así también, en la figura 27, tomando como referencia la línea discontinua en cero, el intervalo P18 – P15, no contiene el cero, esto demuestra que las medias correspondientes son significativamente diferentes entre estos propóleos. Por su parte, los intervalos P16 – P15 y P18 – P16 no presentan diferencias significativas en las medias, pudiendo deducir que los propóleos de mejor actuación frente a los hongos son el PE-18 seguido del PE-16.

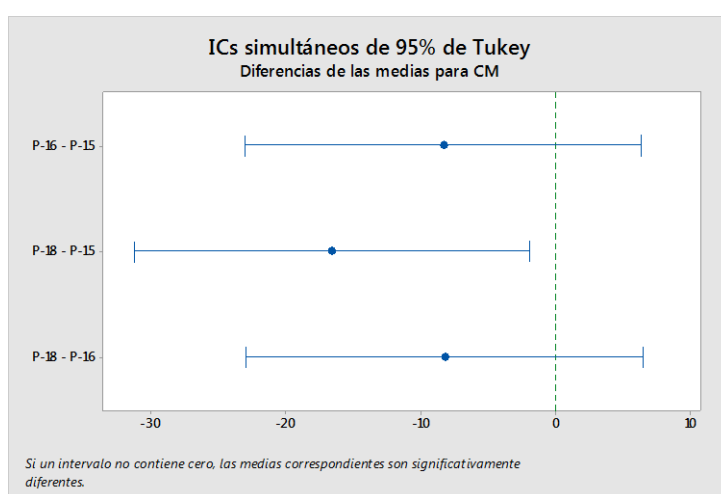


Figura 27.- ICs simultáneos de 95% de Tukey.

En este sentido, el orden de los propóleos analizados, ordenados de menor a mayor CMI para inhibir el crecimiento de los hongos se presenta en la tabla 21:

Tabla 21.- Orden de propóleos frente a la CMI.

	Propóleos	CMI promedio ¹	%POLIOLES	%TRITERPENOS	%DITERPENOS
1ro.	PE-18	8,4 mg/mL	66,8	18,3	14,81
2do.	PE-16	16,67 mg/mL	42,59	15,26	42,14
3ro.	PE-15	25 mg/mL	15,66	30,7	53,63

¹ Resultado estadístico arrojado por la prueba ANOVA.

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- ✓ En el estudio por CCD las tres muestras presentaron una composición química semejante, con la presencia de grupos cromóforos conjugados entre los que destacan ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas.
- ✓ En el análisis por CG-EM todas las muestras evidenciaron cromatogramas complejos con un total de 44 compuestos identificados para la muestra PE-15, 37 para la muestra PE-16 y 32 para la muestra PE-18 donde se incluyen azúcares, polioles, ácidos grasos, diterpenos y triterpenos como sus principales componentes, tal como lo mencionan en su artículo Chaillou, Herrera y Maidana (2004), indicando que los compuestos fenólicos y los flavonoides son los principales responsables de la actividad antifúngica de los propóleos.
- ✓ La cromatografía de gases realizada presenta la composición química de los propóleos PE-15, PE-16 y PE-18, misma que muestra los contenidos porcentuales de los compuestos químicos identificados como no identificados, siendo estos últimos de 10, 20, 30% en los propóleos 15, 16 y 18, respectivamente.
- ✓ Se pudo agrupar los compuestos químicos en tres grupos prioritarios para cada uno de los propóleos tomando en cuenta los tiempos de retención (TR) en el espectro de la cromatografía de gases, quedando de la siguiente manera: polioles, diterpenos y triterpenos,

- ✓ Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada tipo de hongo analizado con las diferentes concentraciones de propóleos PE-15, PE-16 y PE-18, obteniéndose los siguientes resultados:
 - La CMI para inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* fue de 25 mg/mL utilizando los propóleos PE-15 y PE-16; mientras que con el uso del propóleo PE-18 fue de 12,5 mg/mL, siendo esta última la menor CMI alcanzada.
 - La CMI para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* fue de 25 mg/mL utilizando el propóleo PE-15. Con los propóleos PE-16 y PE-18 fue de 12,5 mg/mL.
 - La CMI para inhibir el crecimiento de *Malassezia furfur* fue de 25 mg/mL utilizando el propóleo PE-15; con el PE-16 fue de 12,5 mg/mL; mientras que con el uso del propóleos PE-18 fue de 0,195 mg/mL.

- ✓ De los tres tipos de hongos analizados el *Aspergillus niger* necesita mayor concentración de propóleo para inhibir su crecimiento, seguido de la *Candida albicans* y finalmente de la *Malassezia furfur*.

- ✓ El análisis estadístico de la relación entre la composición química de los propóleos y la CMI, dió como resultado que la relación entre estos parámetros es inversamente proporcional respecto a la cantidad de polioles que contengan los propóleos; es decir, cuanto mayor sea la cantidad de polioles, menor será la concentración de propóleos (en mg/mL) que se necesite para inhibir el crecimiento del hongo.

- ✓ El propóleo PE-18 presentó la mejor eficacia para inhibir el crecimiento de los tres hongos analizados, seguido del propóleo PE-16. Mientras que el PE-15, es el que mayor cantidad de concentración necesita para inhibir el crecimiento de los hongos debido a su bajo contenido de polioles.

- ✓ El resultado de la prueba estadística ANOVA sugiere los siguientes valores como valores promedios para la CMI que se requiere para inhibir el crecimiento de los hongos.

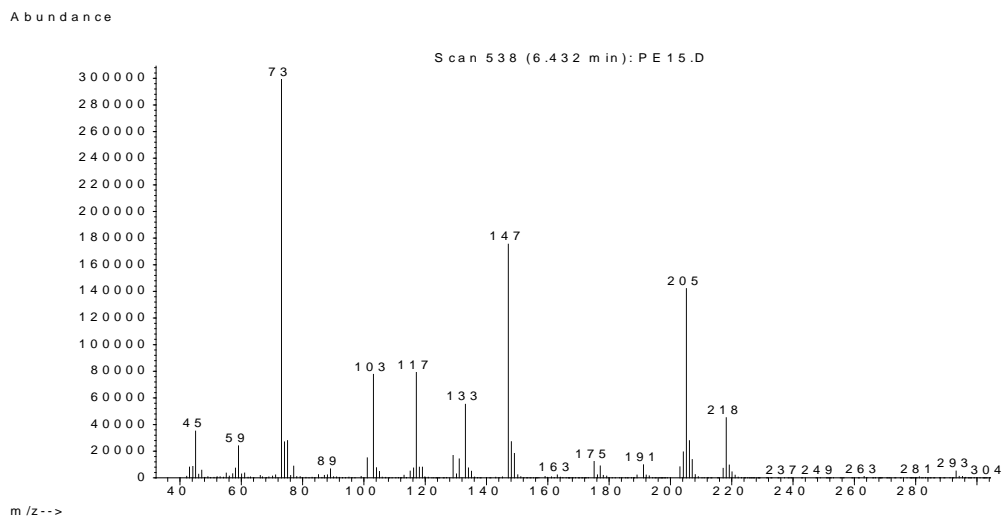
Propóleos	CMI promedio
PE-18	8,4 mg/mL
PE-16	16,67 mg/mL
PE-15	25 mg/mL

5.2 Recomendaciones

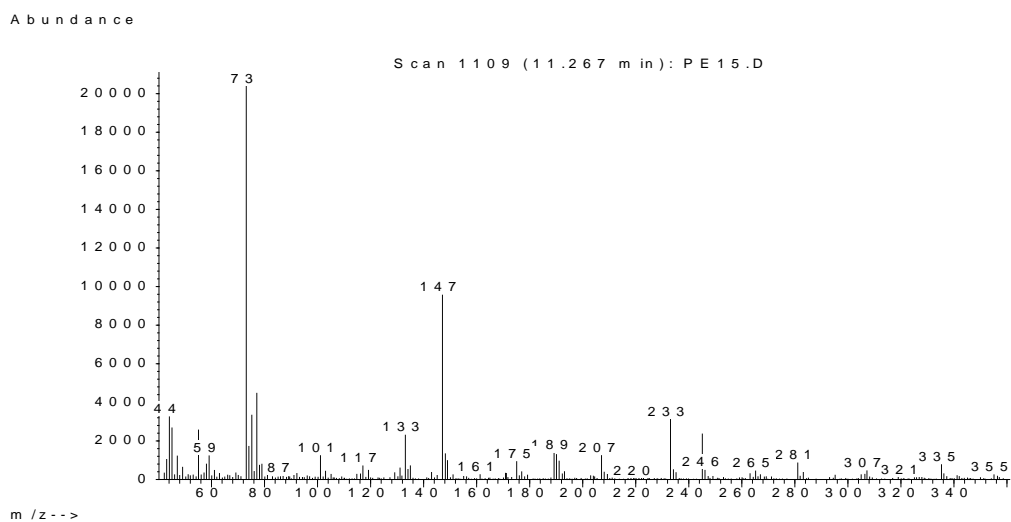
- ✓ Realizar otros estudios químicos que permitan caracterizar estructuralmente los compuestos no identificados,

ANEXOS

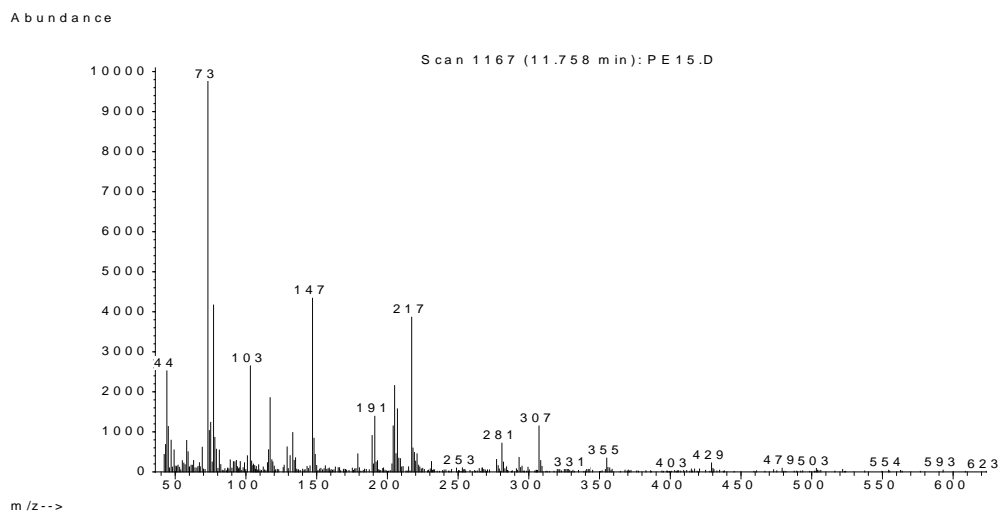
Anexo 1,- Espectro de masas del trimetilsilil éter de glicerol,



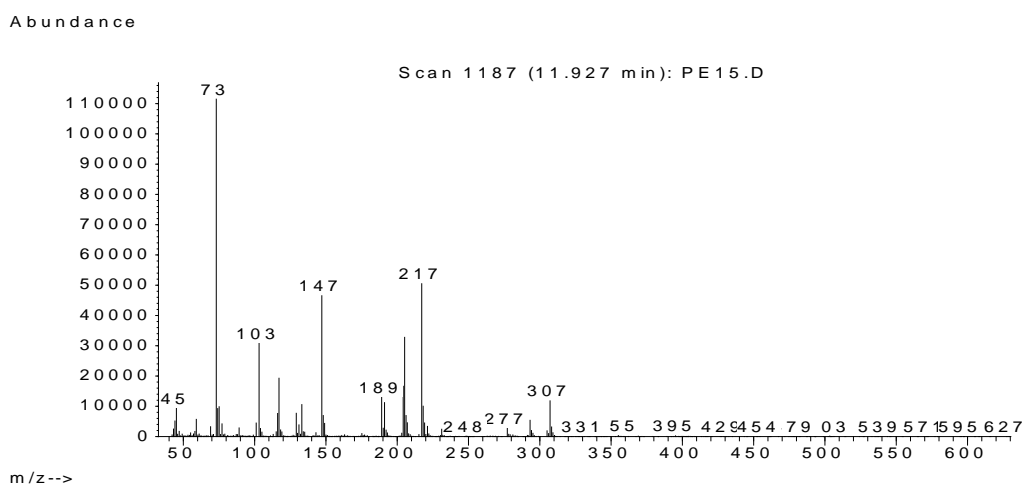
Anexo 2,- Espectro de masas del ácido málico, tris-TMS,



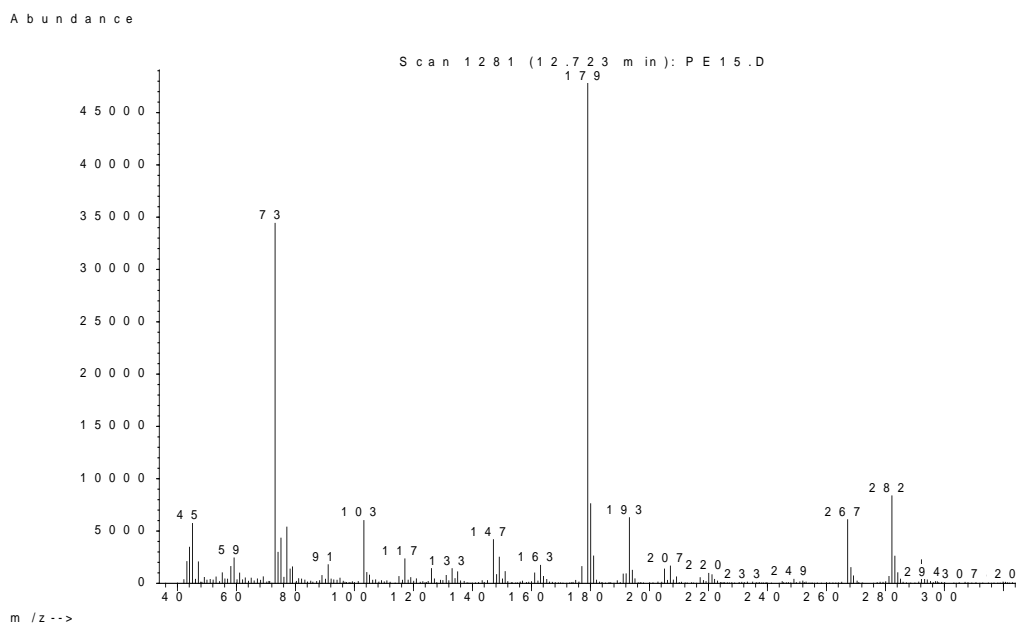
Anexo 3,- Espectro de masas del butanal 2,3,4-tris(trimetilsilil)oxy-



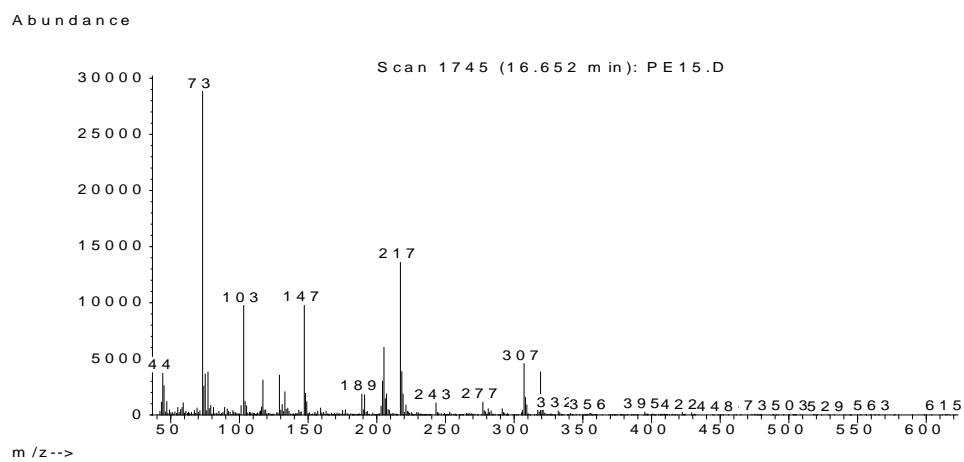
Anexo 4,- Espectro de masas del butane,1,2,3,4-tetrakis(trimetilsilil)oxy-



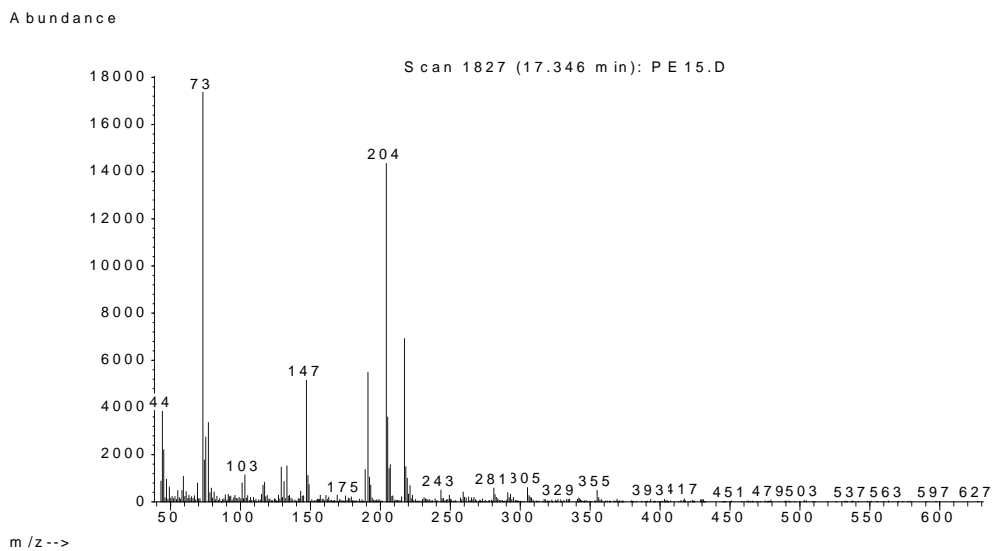
Anexo 5,- Espectro de masas del 4-hidrofeniletanol di-TMS,



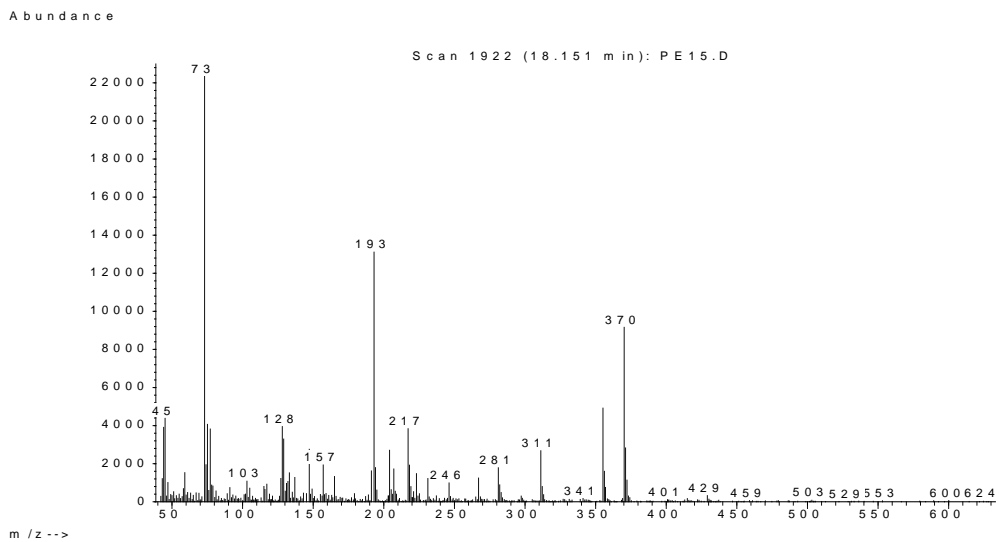
Anexo 6,- Espectro de masas del xilitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-TMS,



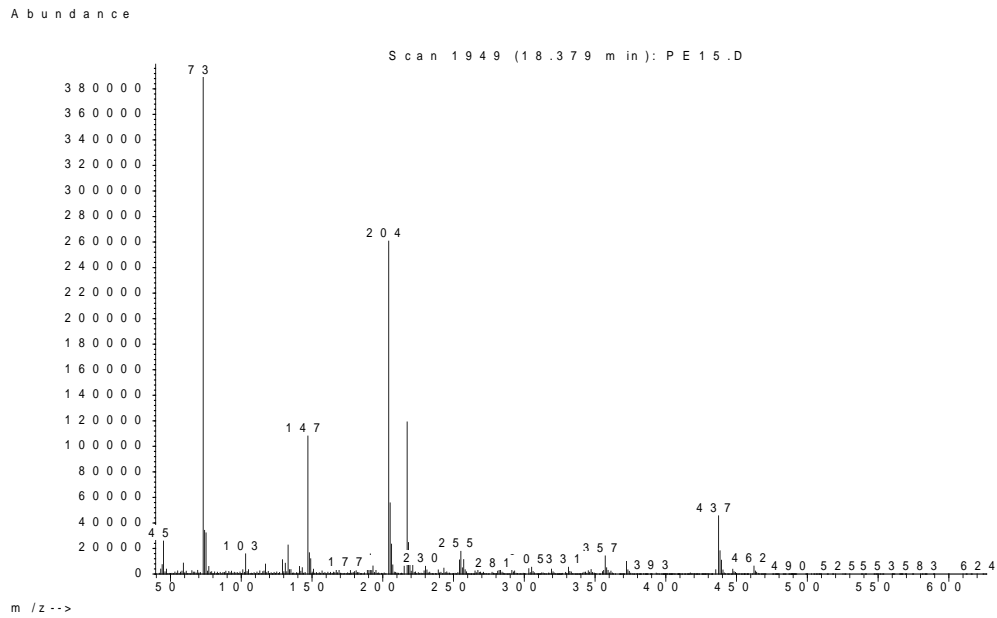
Anexo 7,- Espectro de masas del d-xylopiranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-TMS,



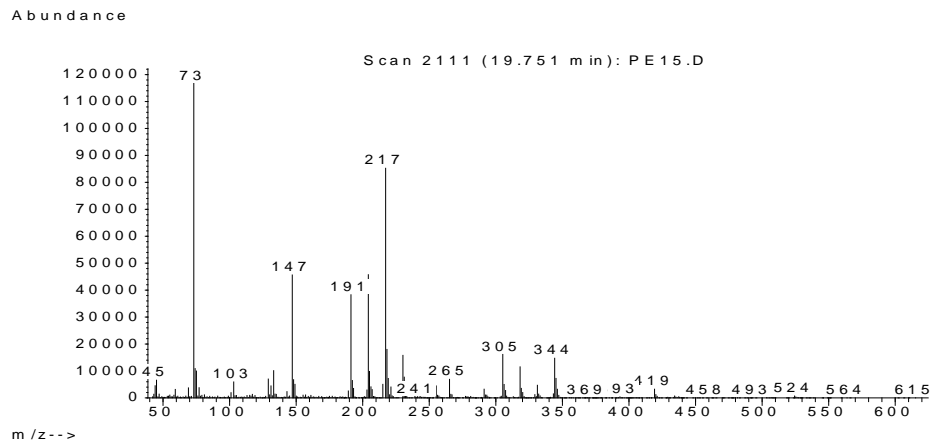
Anexo 8,- Espectro de masas del ácido benzoico, 3,4, -bis [(trimetilsilil)oxy]-, éster trimetilsilil,



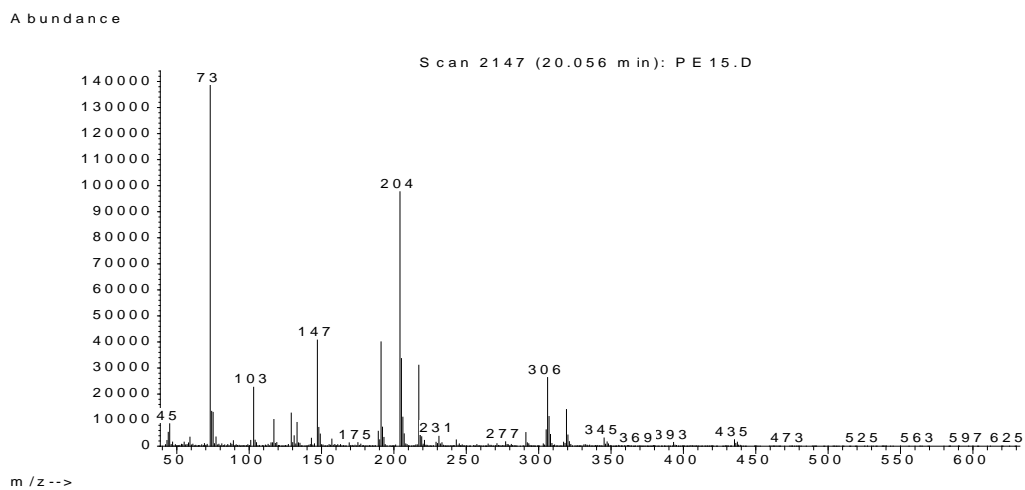
Anexo 9,- Espectro de masas del D-Fructosa,1,3,4,5,6-pentakis-O-TMS,



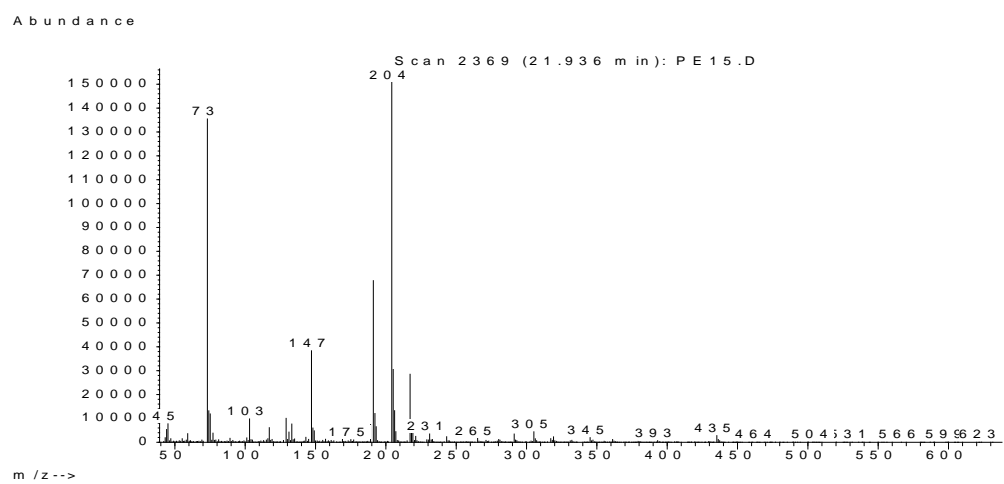
Anexo 10,- Espectro de masas del Myo-inositol,5-deoxy-1,2,3,4,6-penyakis-O-TMS,



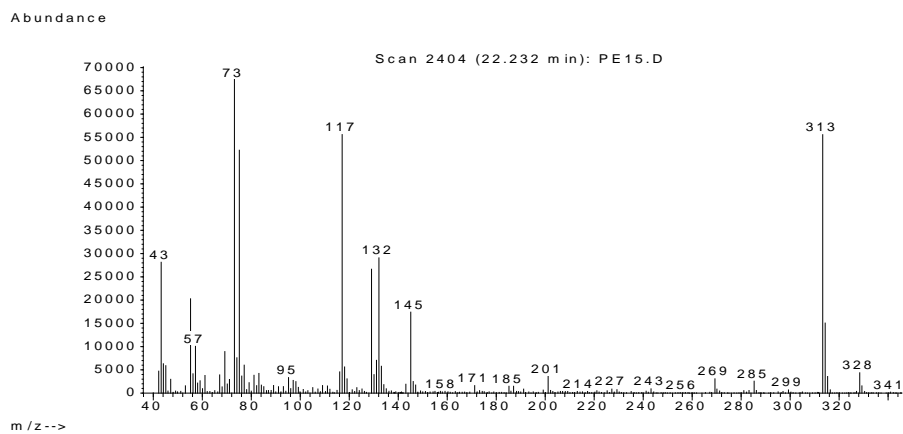
Anexo 11,- Espectro de masas del d-galactosa,2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS,



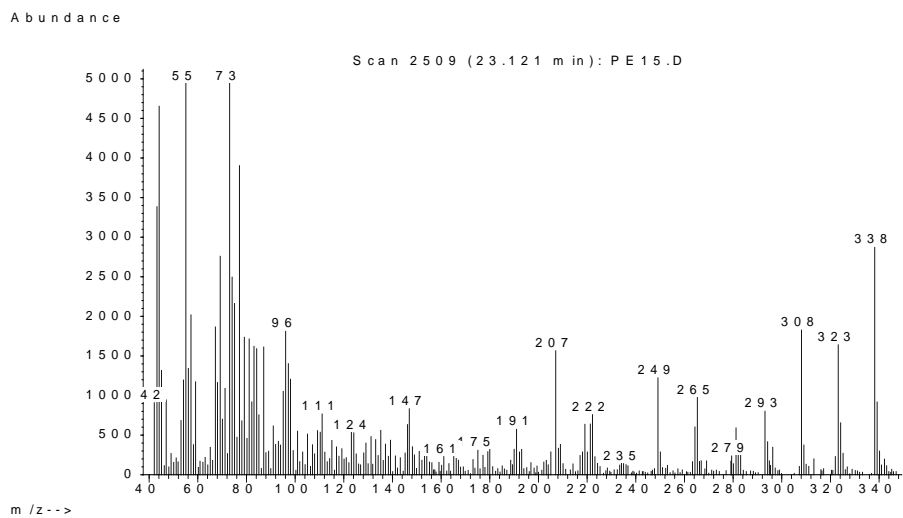
Anexo 12,- Espectro de masas del Glucosa, pentakis-O-TMS,



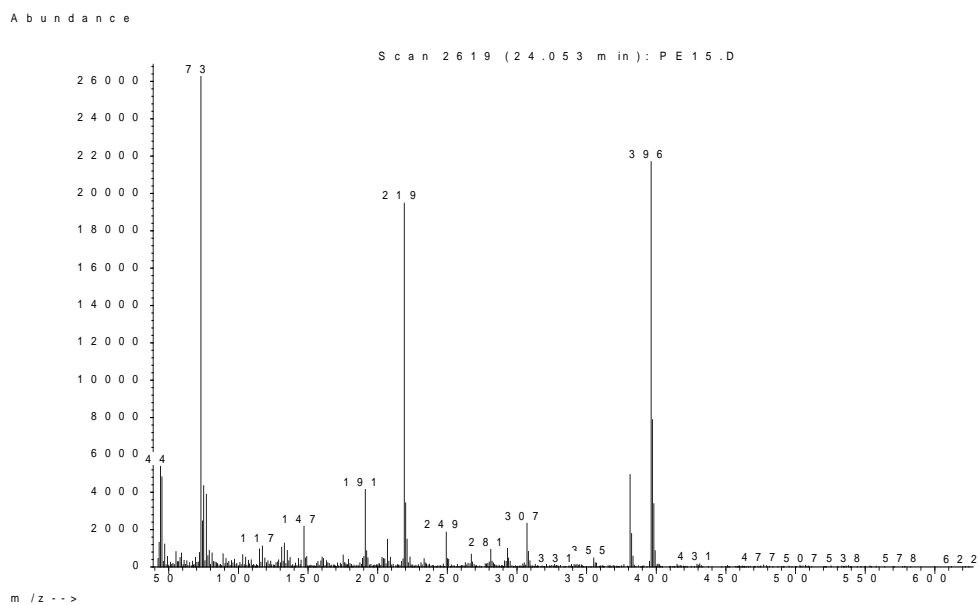
Anexo 13,- Espectro de masas del ácido hexanodecanoico, TMS,



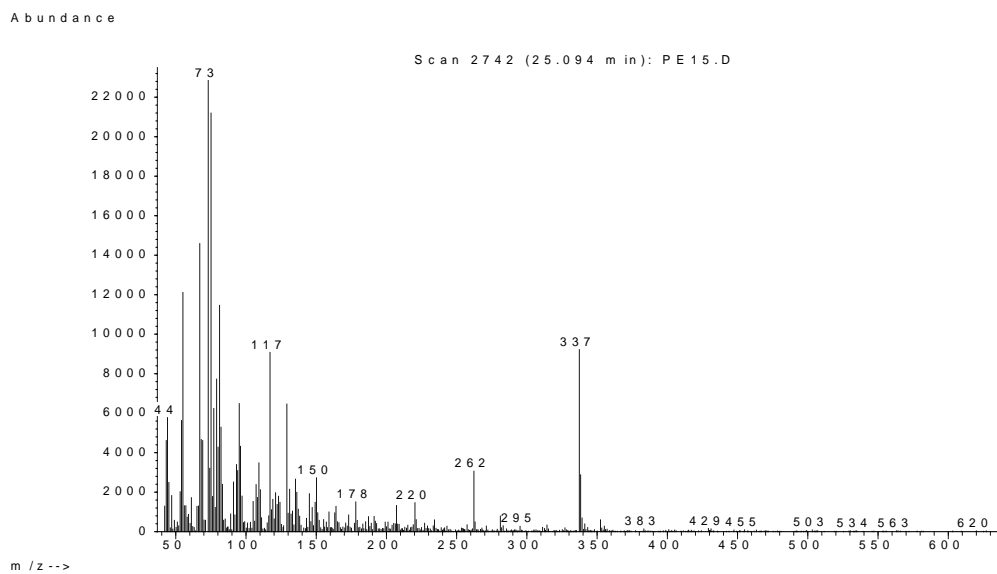
Anexo 14,- Espectro de masas del ácido cinámico, 4-methoxy--(trimetilsiloxy)-, éster Trimetilsilil,



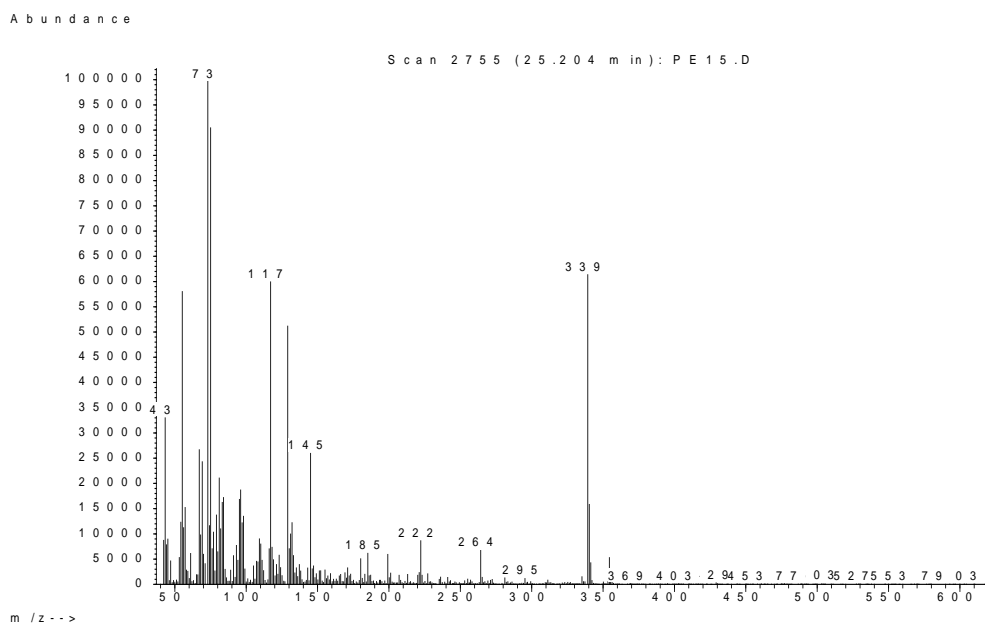
Anexo 15,- Espectro de masas del trimetilsilil ,4-bis(trimetilsilil) cinamato,



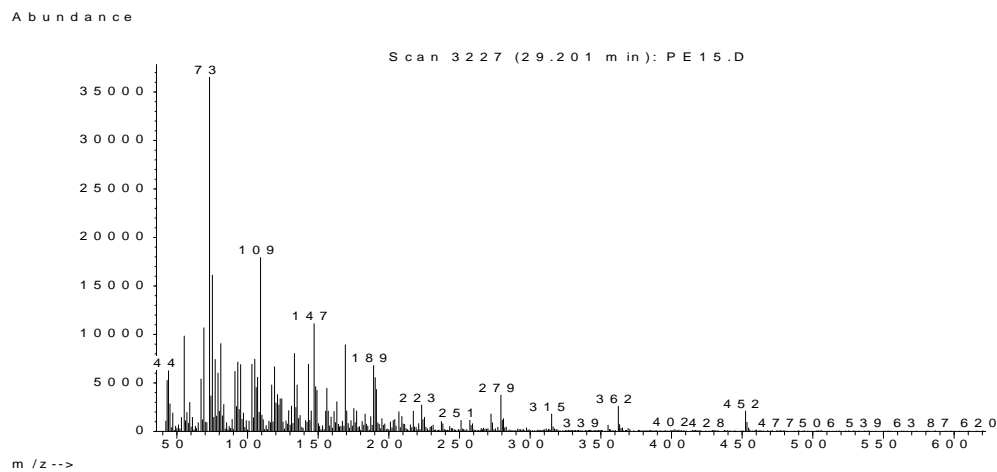
Anexo 16,- Espectro de masas del 9,12-ácido octadecenoico (Z,Z)- éster trimetilsilil,



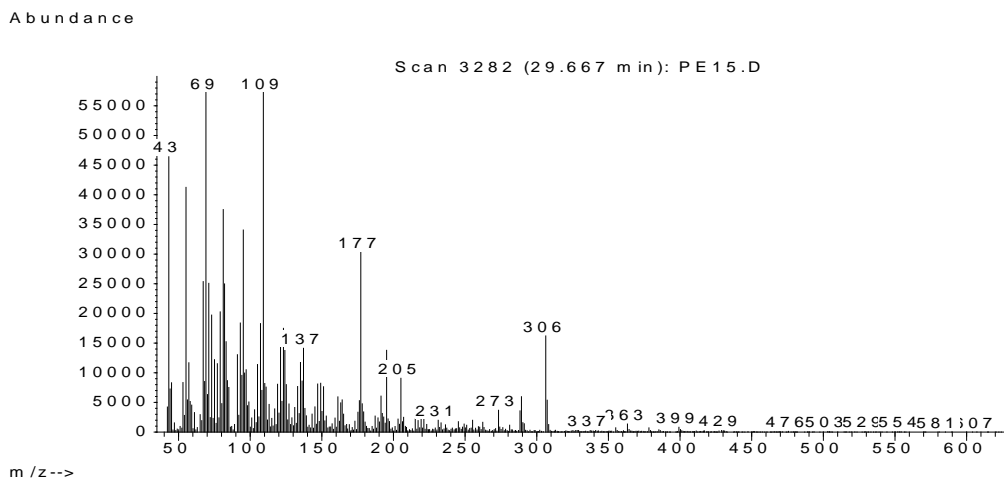
Anexo 17,- Espectro de masas del ácido oleico, éster Trimetilsilil,



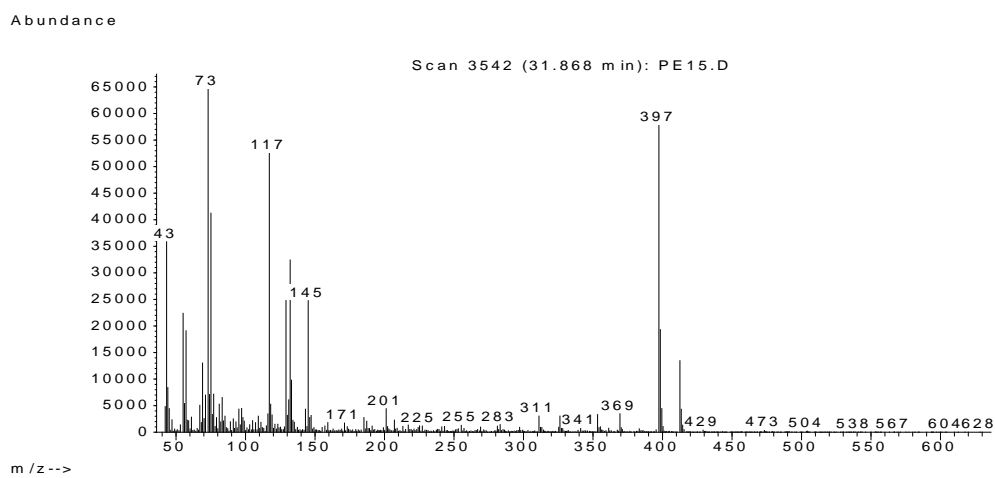
Anexo 18,- Espectro de masas del ácido eicosanoico, éster trimetilsilil,



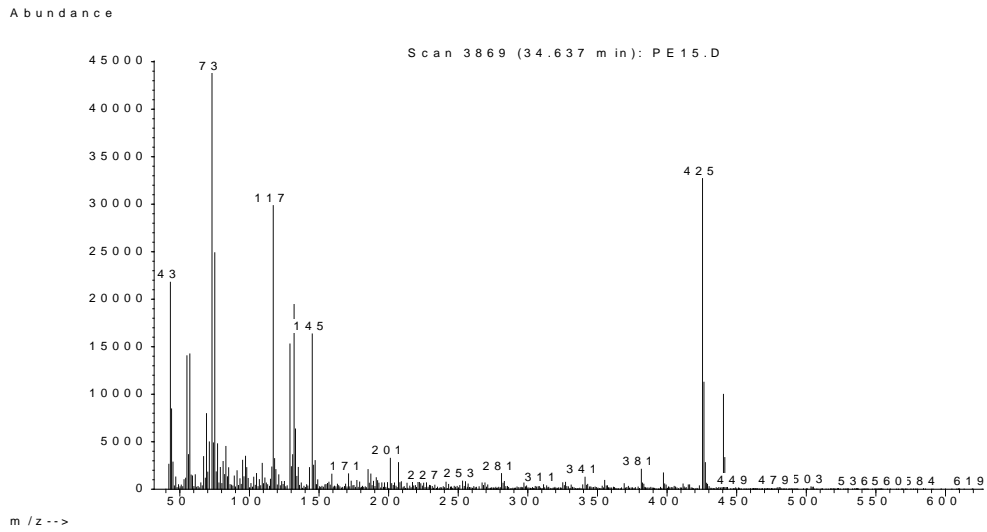
Anexo 19,- Espectro de masas del isómero 23,



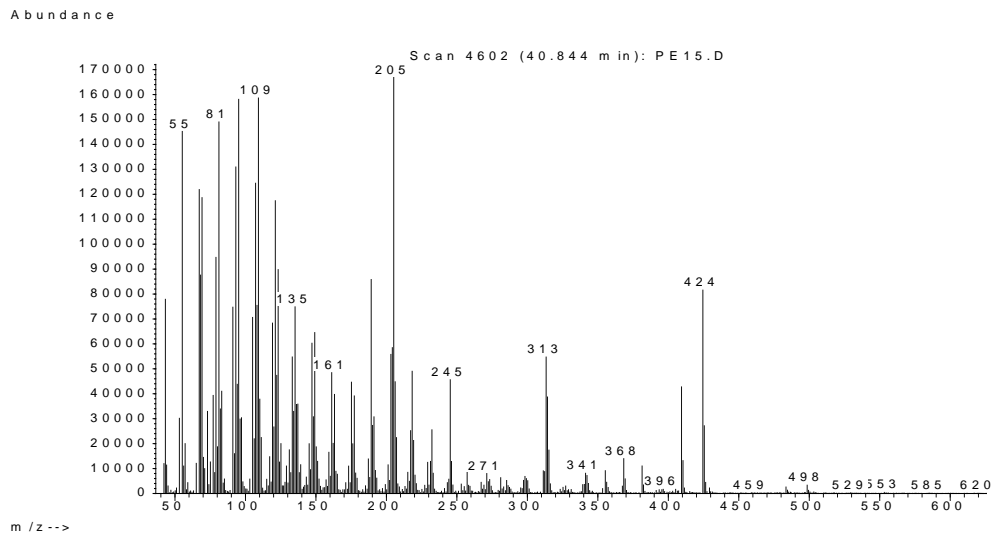
Anexo 20,- Espectro de masas del ácido docosanoico, éster trimetilsilil,



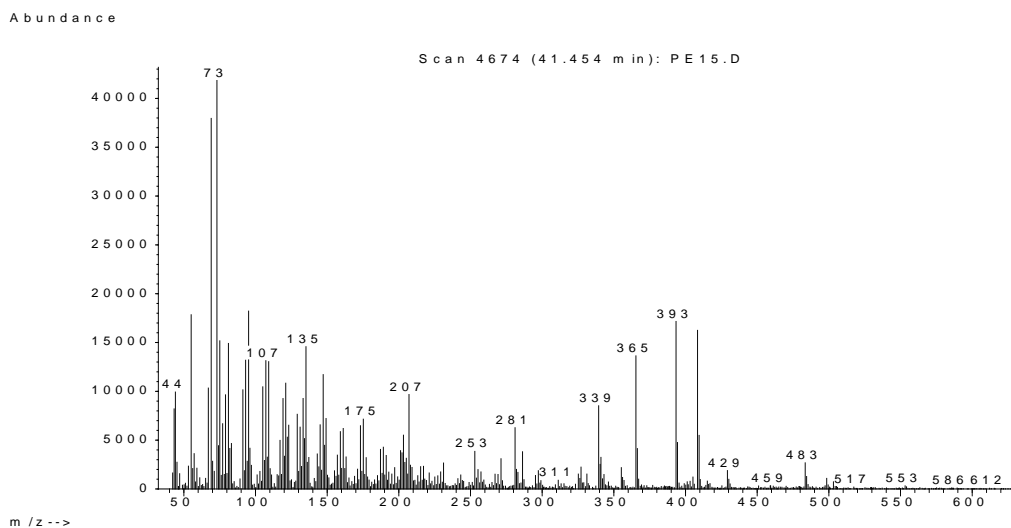
Anexo 21,- Espectro de masas del ácido tetracosanoico, éster trimetilsilil,



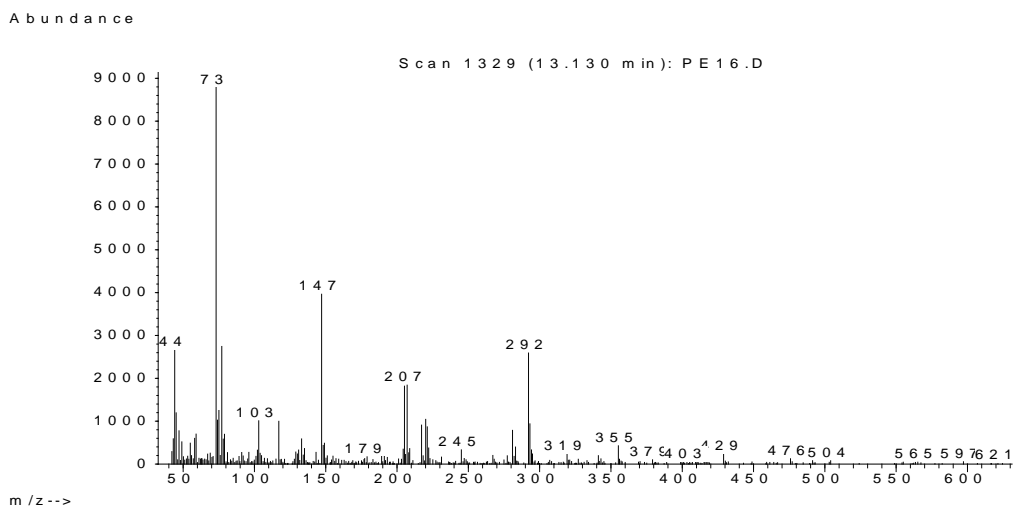
Anexo 22,- Espectro de masas del lupan-20(29)-en-3-ona,



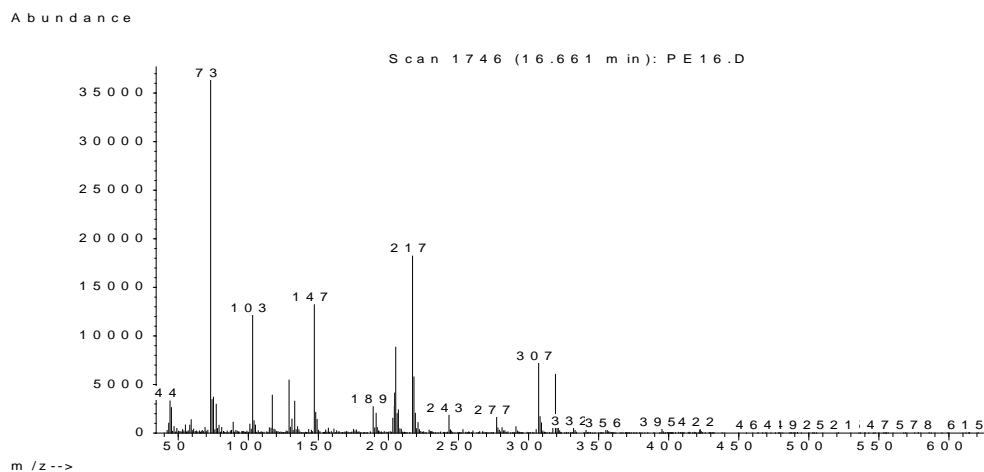
Anexo 23,- Espectro de masas del silane, (9,19-cyclo-9-beta-lanost-24-en-3-beta-yloxy)trimetil,



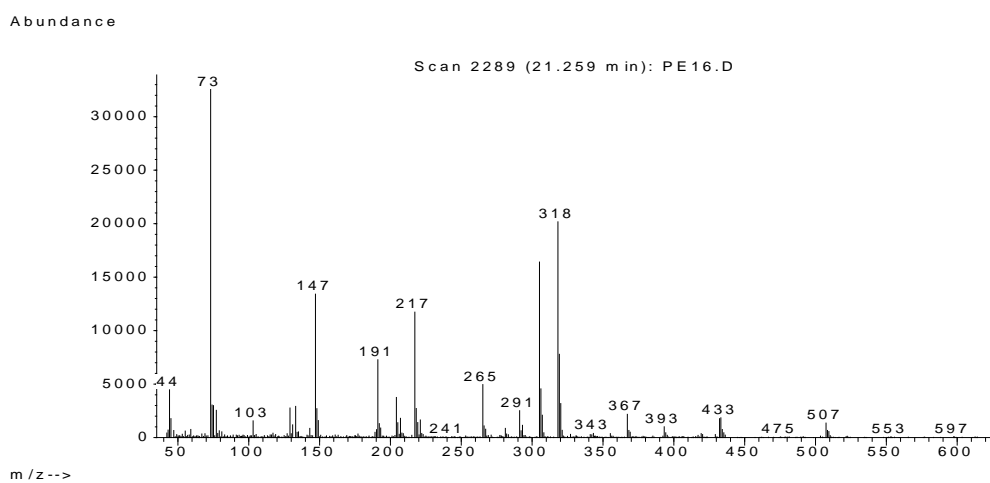
Anexo 24,- Espectro de masas del 2,3,4-trihydroxybutyric acid tetra TMS,



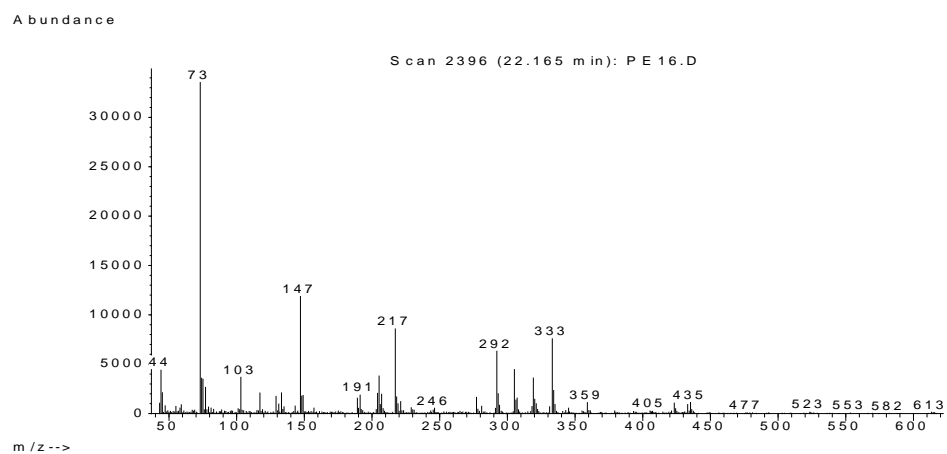
Anexo 25,- Espectro de masas del isómero de 7,



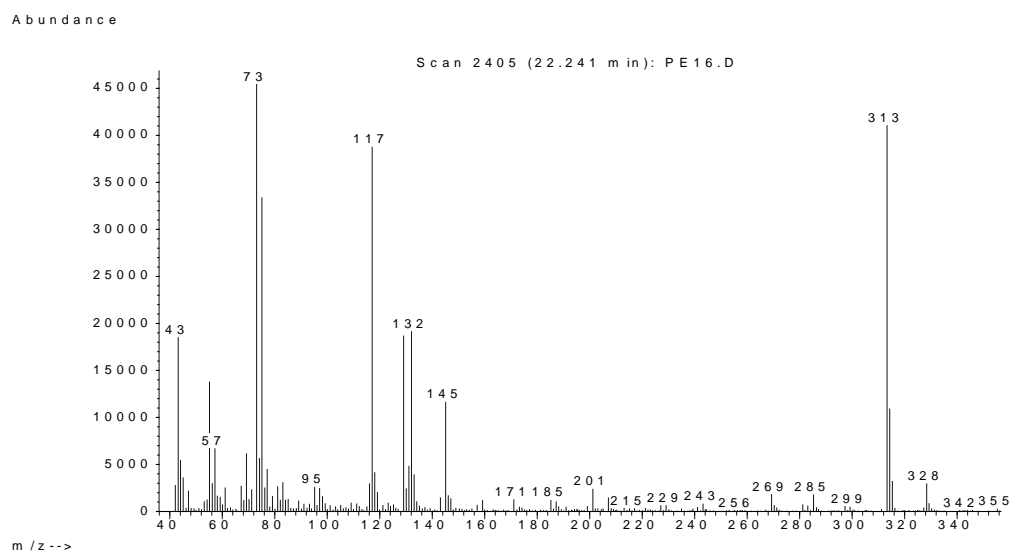
Anexo 26,- Espectro de masas del inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS-, epi-



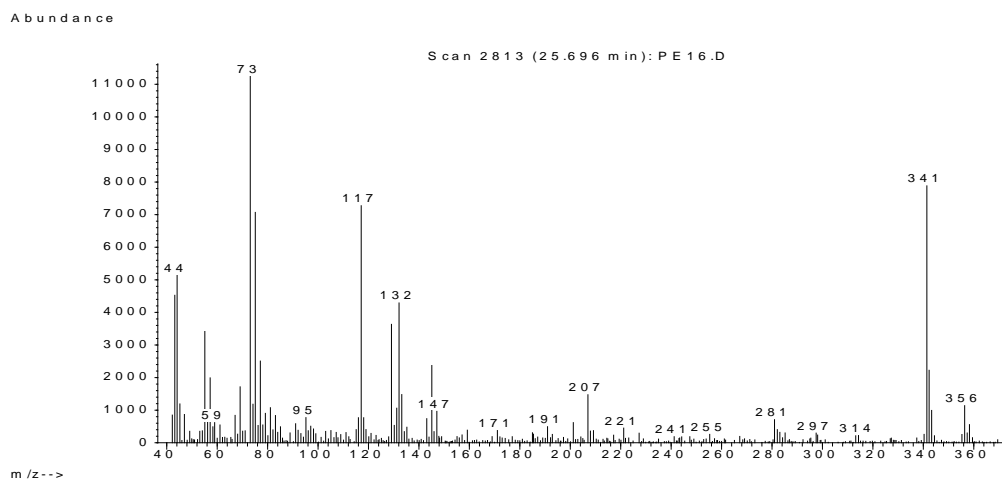
Anexo 27,- Espectro de masas del Ácido D-glucónico, 2,4,5,6-pentakis-O-TMS-, éster trimetilsilil,



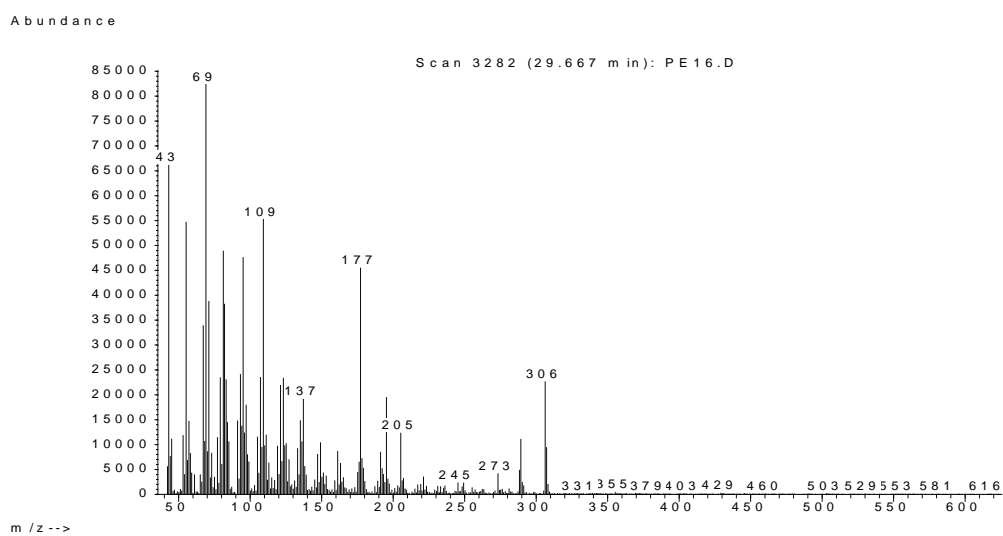
Anexo 28,- Espectro de masas del ácido hexanodecanoico, éster trimetilsilil,



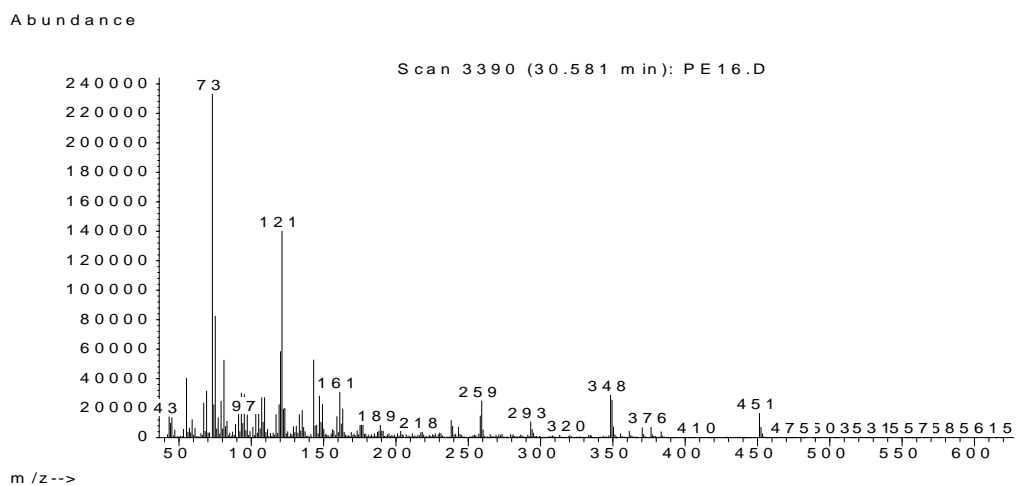
Anexo 29,- Espectro de masas del ácido octadecanoico - éster trimetilsilil,



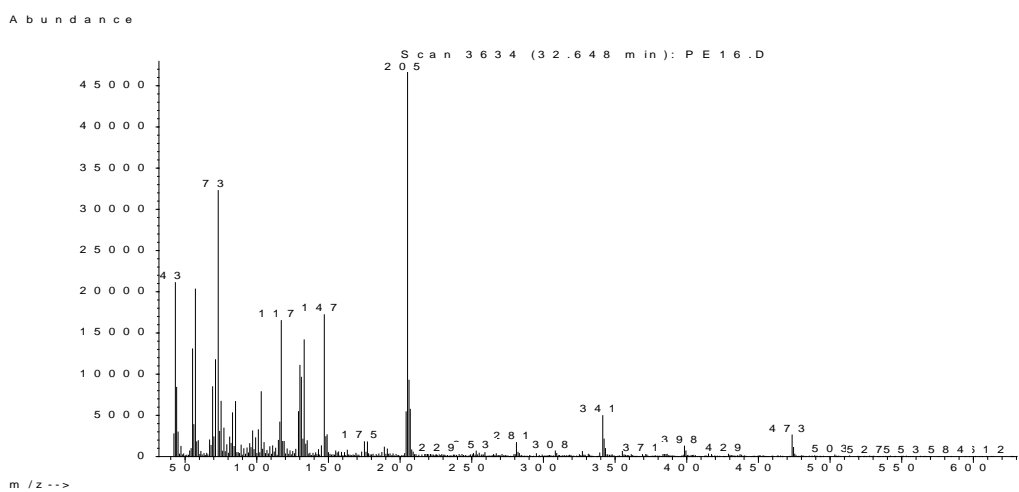
Anexo 30,- Espectro de masas del isómero de 20,



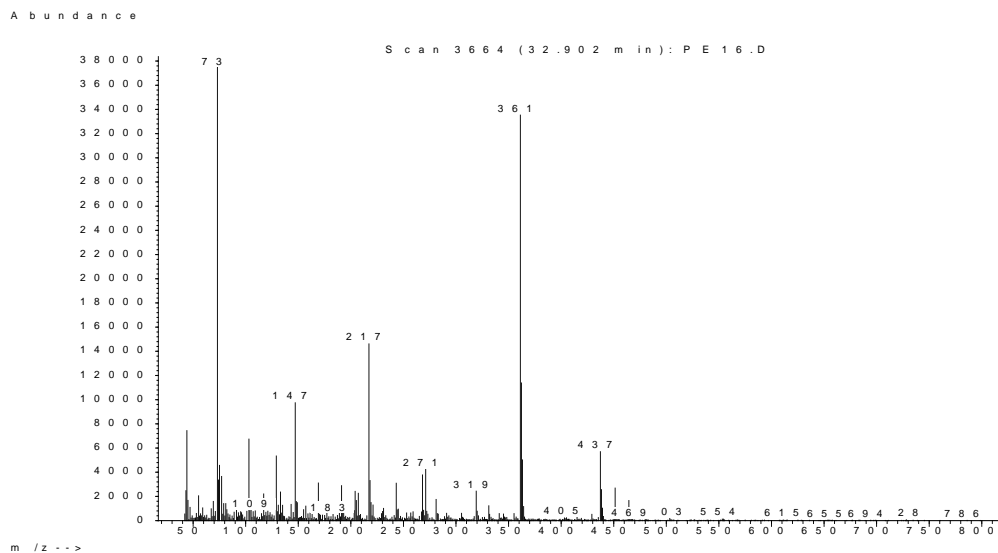
Anexo 31,- Espectro de masas del isómero de 23,



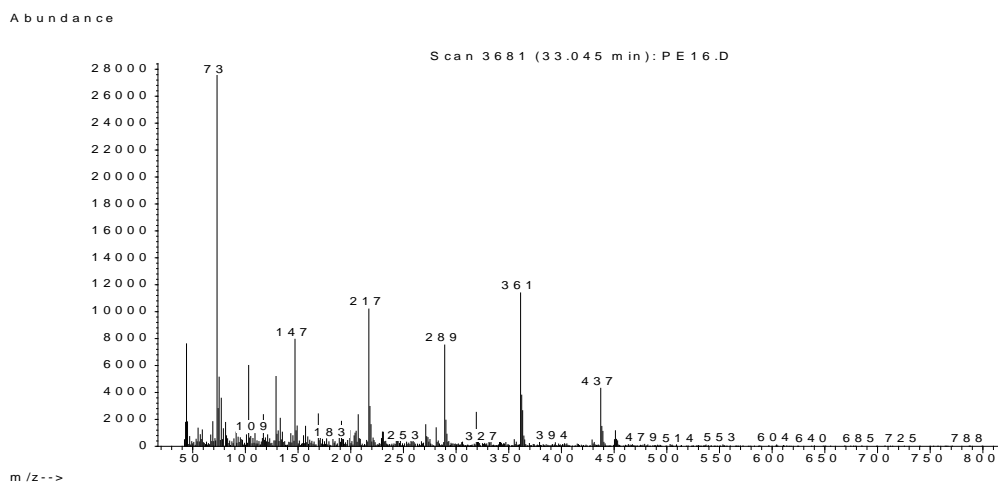
Anexo 32,- Espectro de masas del compuesto relacionado al heptadecylglycerol,



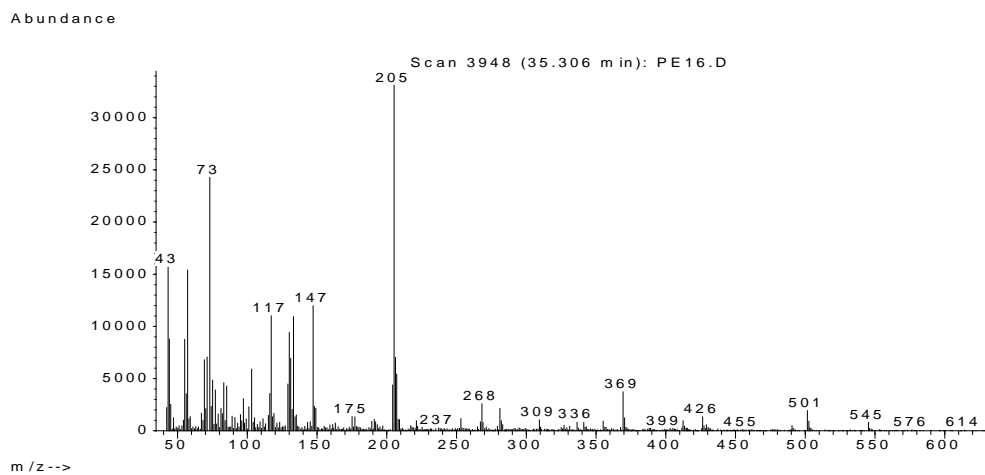
Anexo 33,- Espectro de masas del alfa-D-glucopiranosido, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS-beta-D-fructofuranosyl, 2,3,4,6-tetrakis O-TMS,



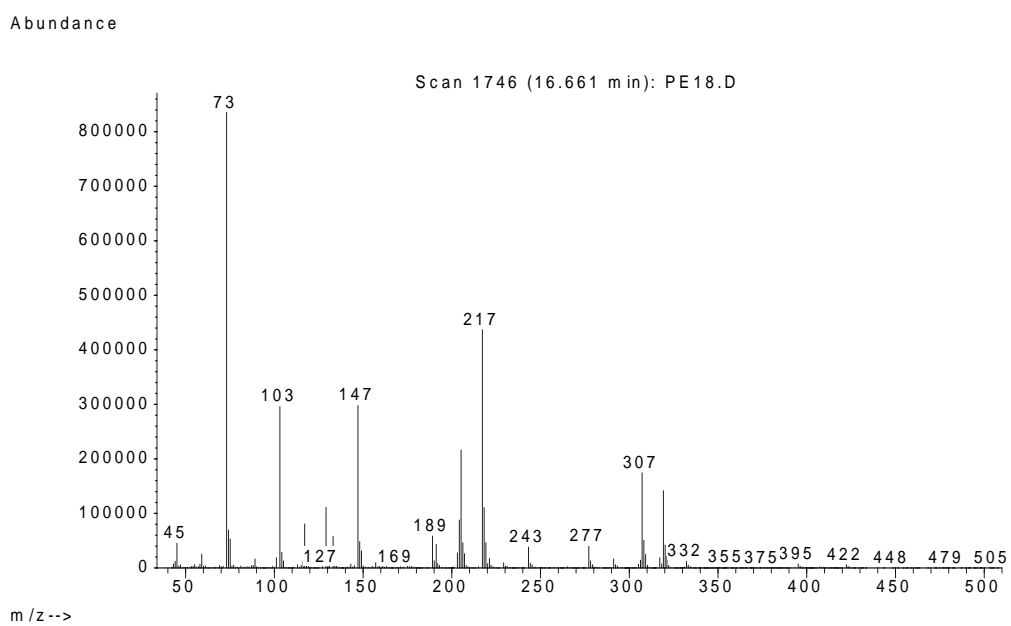
Anexo 34,- Espectro de masas del azúcar,



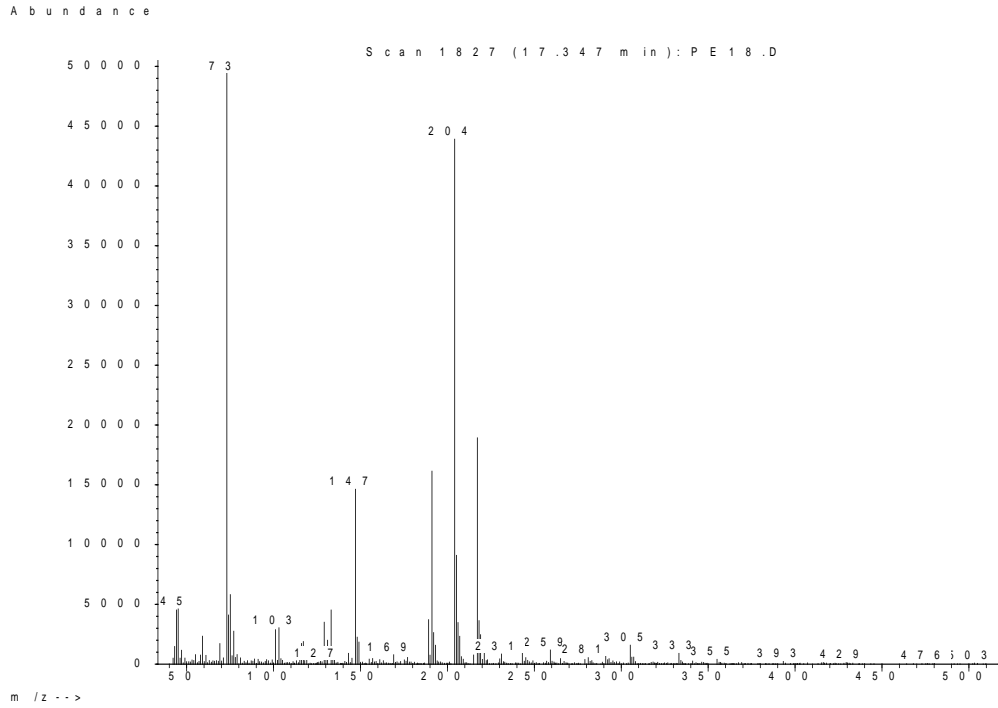
Anexo 35,- Espectro de masas relacionado con 27,



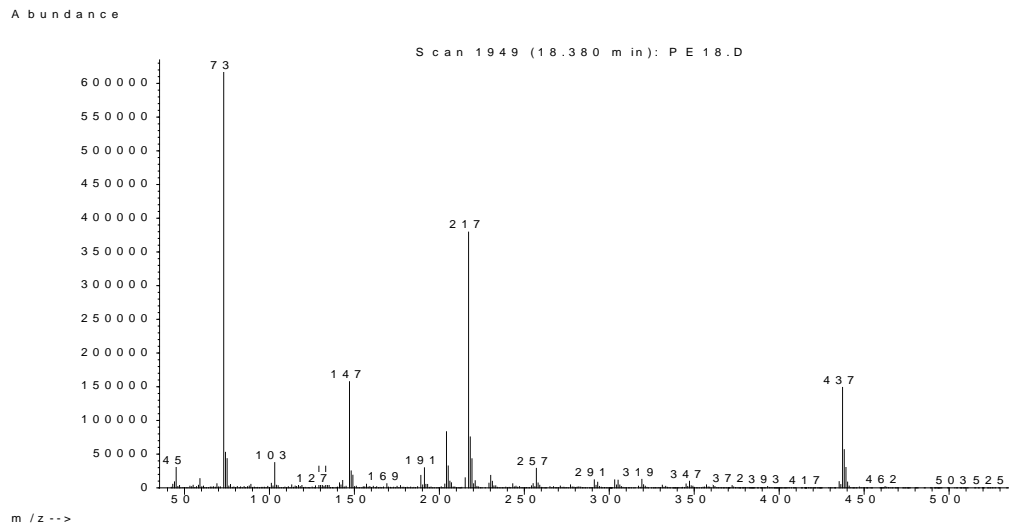
Anexo 36,- Espectro de masas del xilitol, 1,2,4,5-pentakis-O-TMS,



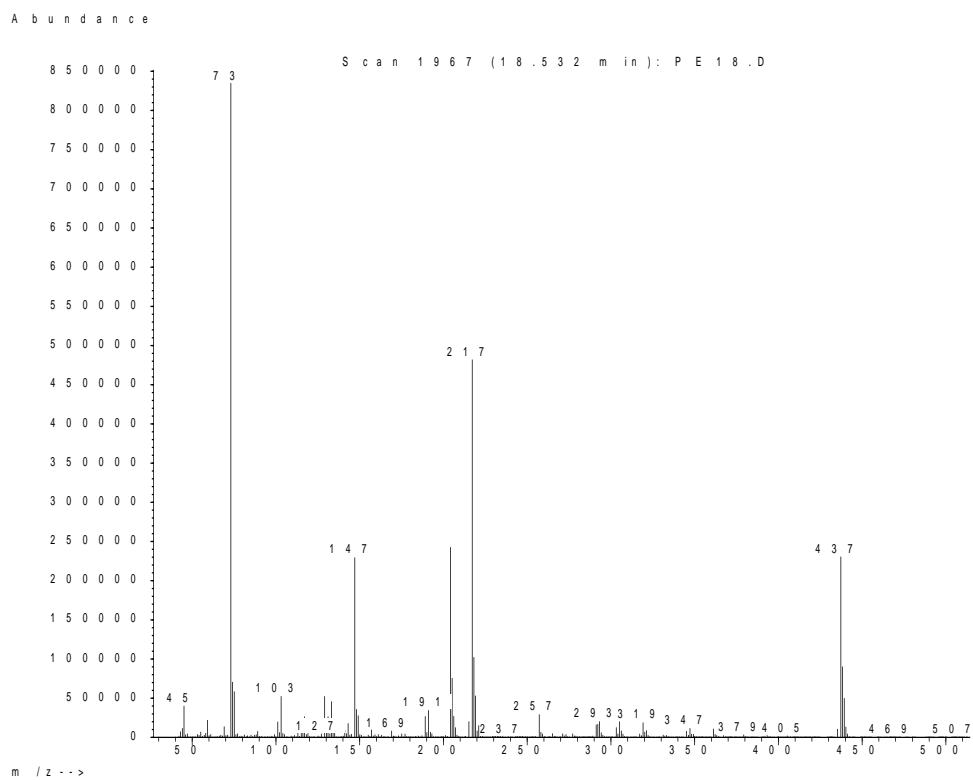
Anexo 37,- Espectro de masas del D-xilosa, tetrakis(trimetilsilil),



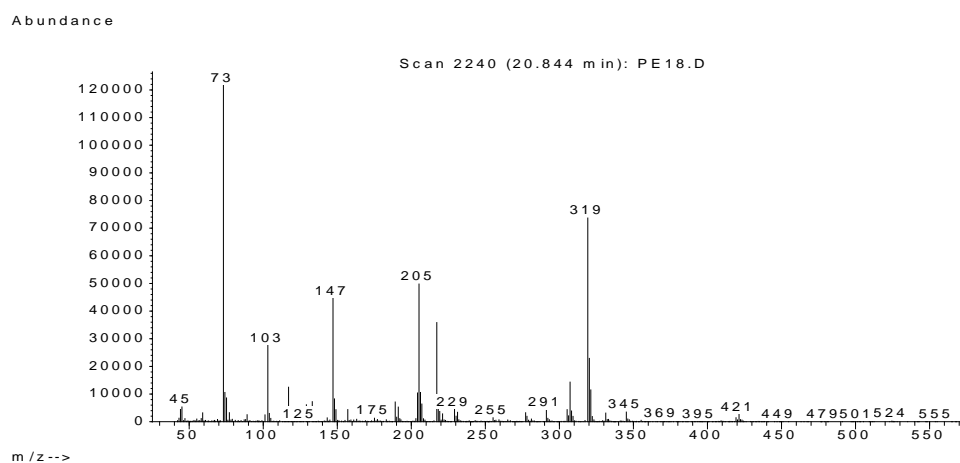
Anexo 38,- Espectro de masas del D-fructosa, 1,4,5,6-pentakis-O-TMS,



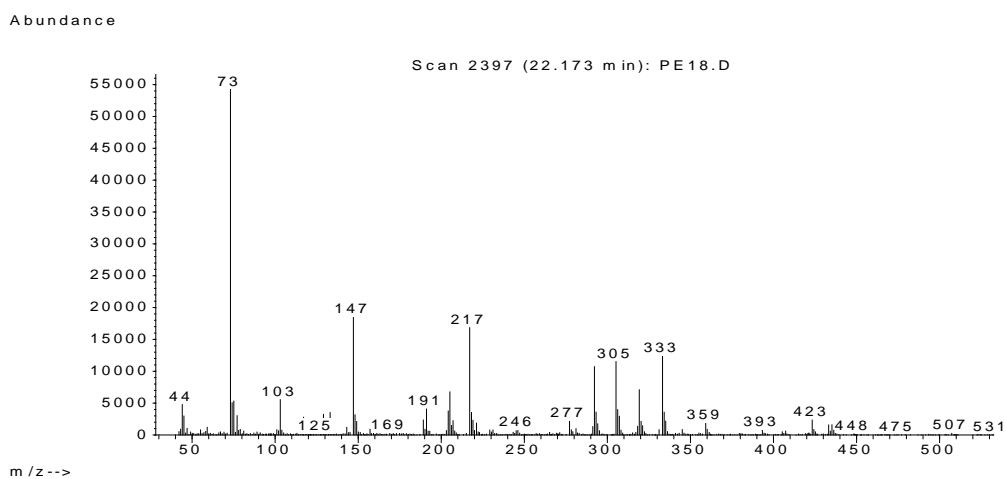
Anexo 39,- Espectro de masas del D-fructosa,1,4,5,6-pentakis-O-TMS (Isómero de 4)



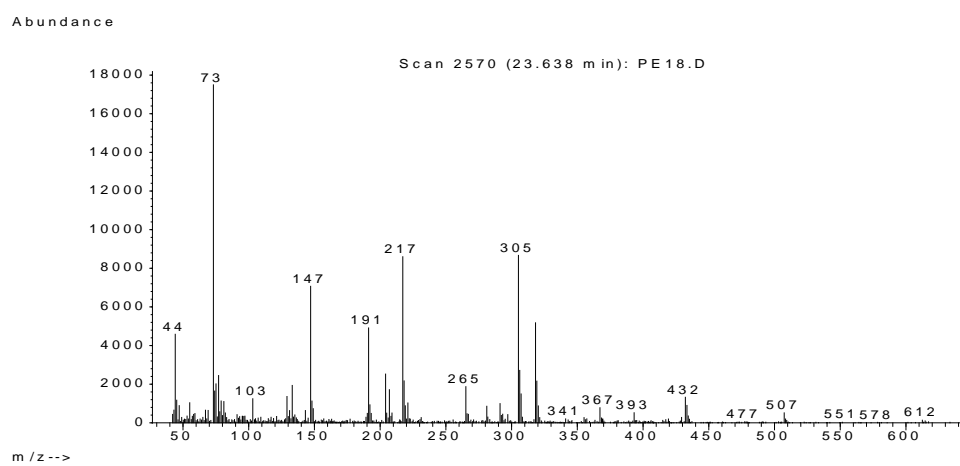
Anexo 40,- Espectro de masas del D-manitol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS,



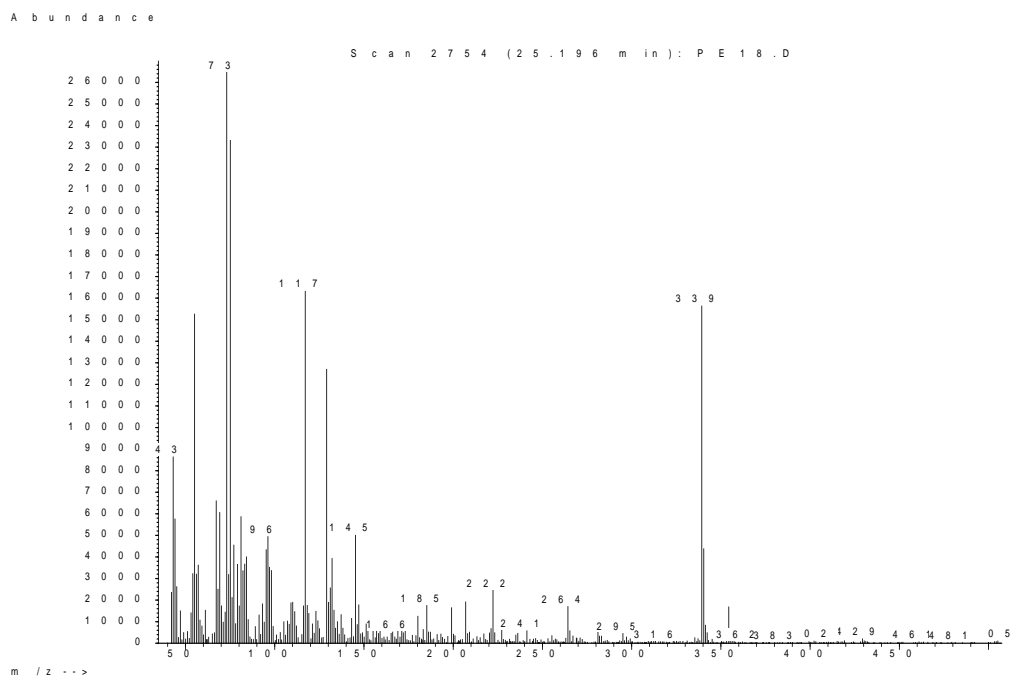
Anexo 41,- Espectro de masas del ácido D-glucónico, 2,3,4,5,6-pentakis-O-TMS,



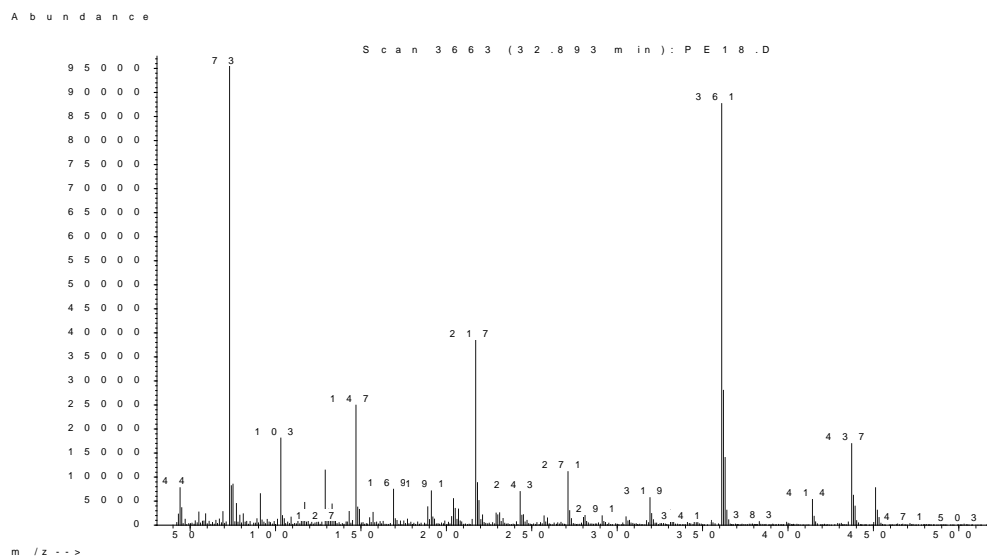
Anexo 42,- Espectro de masas del myo-inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS,



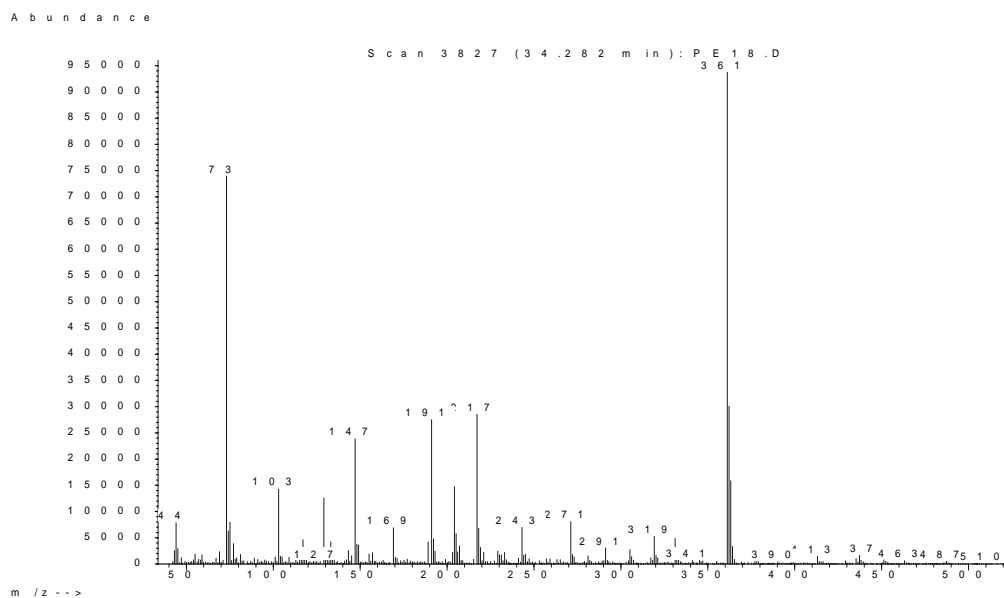
Anexo 43,- Espectro de masas del ácido oleico, TMS,



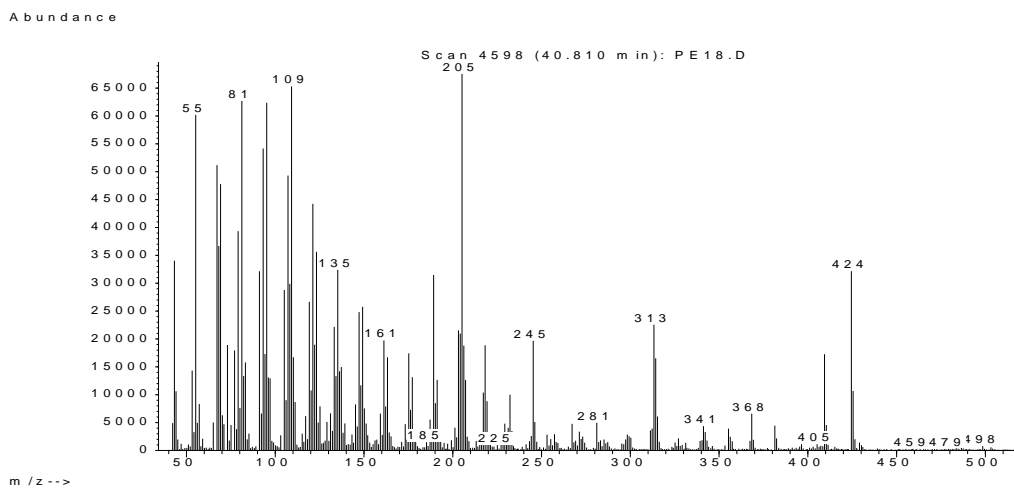
Anexo 44,- Espectro de masas del alpha-D-glucopiranosido, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS isómero de 20,



Anexo 45,- Espectro de masas del isómero de 22 o compuesto relacionado,



Anexo 46,- Espectro de masas del lup-20(29)-en-one,



BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez M., S, (2010), Caracterización organoléptica y físico-química de propóleos del departamento de la Libertad, Perú, *The Biologist (Lima)*, 34-40,
- Arbaca, L, (2000), Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial, *Revista Iberoamericana de Micología*, 79-84,
- Asís, M, (2013), El oro púrpura de las abejas, *Revista Médica Electrónica, Portales Médicos*, 1-6,
- Aspiroz, C., Moreno, L., & Rubio, C, (1997), Taxonomía de *Malassezia furfur*, *Revista Iberoamericana de Micología*, 147-149,
- Bankova, V, (2005), Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *Journal of Ethnopharmacology*, 114-117,
- Bankova, V., Castro, S., & Marcucci, M, (2000), Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie* 31, 3-15,
- Banskota, A., Tezuka , Y., & Kadota, S, (2001), Recent progress in pharmacological research of propolis, *Phytotherapy Research*, 561-571,
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Alvarez, A., & Rodríguez, E, (2004), Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino, *Acta Farm, Bonaerense*, 369-72,
- Cabrera, J, (2007), *La Apicultura en el Ecuador: Antecedentes Históricos*, Quito,
- Campo Fernández, M, (2008), *Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos*, La Habana,
- Campo Fernández, M., Cuesta Rubio, O., Márquez Hernández, I., Rosado Pérez, A., & Porto, R, M, (2008), Análisis Cualitativo de Propóleos Cubanos por

- Cromatografía en Capa Delgada, *Latin American Journal of Pharmacy*, 380-386,
- CAN, (2012), Resolución 1482,- Límites de Contenido Microbiológico para Productos Cosméticos, 1-2,
- ChaillouI, L., HerreraII, H., & MaidanaIII, J, (2004), Estudio del propoleos de Santiago del Estero, Argentina, *Food Science and Technology*, 11-15,
- Christov, R., Bankova, V., Hegazi, A., Abd El Hady, F., & Popov S, (1998), Chemical Composition of Egyptian Propolis, *Naturforschung*, 197-200,
- Cuesta Rubio, O., Campo Fernández, M., Márquez Hernández, I., Jaramillo Jaramillo, C, G., González, V, H., Montes De Oca Porte, R., , , , Rastrelli, L, (2017), Chemical profile and anti-leishmanial activity of three Ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi regions, *Fitoterapia*, 177-183,
- Cupull-Santana, R, D., Cortés-Rodríguez, R., Olazábal-Manso, E, E., & Hernández-Medina, C, A, (2013), Actividad antifúngica de propóleos obtenidos en tres provincias de Cuba sobre hongos contaminantes en cultivo de tejidos vegetales, *Acta Universitaria*, 3-9,
- da Silva Frozzaa, C, O., Celi Garcia, C, S., Gambato, G., Oliveira de Souza, M, D., Salvador, M., Moura, S., , , , Roesch-Ely, M, (2013), Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis, *Food and Chemical Toxicology*, 137-142,
- Falquez Chávez, J, C, (2014), *Factibilidad de la actividad de producir y comercializar miel de abeja en la ciudad de Guayaquil*, Guayaquil,
- Farré, R., Frasquet, I., & Sánchez, A, (2004), El própolis y la salud, *ARS Pharma*, 21-43,
- Ghisalberti, E, (2015), Propolis a review, *Bee World*, 59-84,

- Giusiano, G, (2006), Malassezia, *Revista Argentina de Micología*, 41-48,
- Gregoris, E., Fabris, S., Bertellea, M., Grassato, L., & Stevanato, R, (2011), Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties, *International Journal of Pharmaceutics*, 97-101,
- Groot, A, (2013), Propolis: A Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects, *American Contact Dermatitis Society*, 263-282,
- Gutiérrez Bouzán, M, C., & Droguet, M, (2002), La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor, *Boletín Intexter*, 35-41,
- Hübschmann, H,-J, (2015), *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons,
- ISO11930:2012, (2012), *Pruebas de eficacia de conservantes - Challenge Test*,
- Kline & Company, (2008), *Specialty Active and Active Delivery Systems for Personal*, Estados Unidos: Klinegroup,
- König, B, (2015), Plant Sources of Propolis, *Bee World*, 136-139,
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S, (1999), Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *Journal of Ethnopharmacology*, 235-240,
- Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N., , , , Feresin, G, (2009), Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina), *Agricultural and Food Chemistry*, 2691-2698,
- Londoño Orozco, A., Penieres Carrillo, J, G., García Tovar, C, G., Carrillo M., L., Leonor, Q, M., García Vázquez, S, E., , , Cruz Sánchez, T, n, (2008), Estudio

- de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México, *Tecnología en Marcha*, 49-55,
- Lotfy, M, (2006), Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22-31,
- Lozina, L., Boehringer, S., D'Aquino, M., & Acosta, O, (2006), Eficacia del Propóleos sobre *Malassezia pachydermatis*, Correlación de distintas Técnicas in Vitro, *Acta Farm, Bonaerense*, 560-563,
- Marcucci, M, (1995), Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 83-99,
- Markham, K., Mitchell, K., Wilkins, A., Daldy, J., & Lu Y, (1996), HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis, *Phytochemistry*, 205-211,
- Márquez Hernández, I., Cuesta Rubio, O., Campo Fernández, M., Rosado Pérez, 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, *Agricultural and Food Chemistry*, 4725-4730,
- Mendoza, M, (2005), Importancia de la identificación de levaduras, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* ,
- Nolkemper, S., Reichling, J., Heinz Sensch, K., & Schnitzler, P, (2010), Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts, *Phytomedicine*, 132-138,
- Ordóñez, F, (2005), *Métodos de Purificación del Propóleo para su posterior aplicación en sanidad animal*, Riobamba,
- Ota, C., Unterkircher, C., Vera, F., & Shimizu, M, (2001), Antifungal activity of propolis on different species, *MYCOSES*, 375-378,

- Ozcan, M, (1999), Antifungal properties of propolis, *Grasas y Aceites*, 395-398,
- Palomino G., L., García P., C., Jesús H., G., Rojano, B., & Durango R., D, (2009), Determinación del Contenido de Fenoles y Evaluación de la Actividad Antioxidante de Propóleos Recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia), *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 388-395,
- Palomino, L., Martínez, J., García, C., Gil, J., & Durango, D, (2010), Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia), *Revista Facultad Nacional de Agronomía* , 5373-5383,
- Peña, R, (2008), Propolis standardization: a chemical and biological review, *Ciencia e Investigación Agraria 2008*, 17-26,
- Petkova Popova, M., Graikou, K., Chinou, I., & Stefanova Bankova, V, (2010), GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece, *Agricultural and Food Chemistry*, 3167-3176,
- Sahinler, N., & Kaftanoglu, O, (2005), Natural product propolis: chemical composition, *Natural Product Research*, 183-188,
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C., Abbud Righi, A., & F, Salatino, M, L, (2011), Propolis research and the chemistry of plant products, *The Royal Society of Chemistry*, 925-936,
- Santos Pereira, A., Rodrigues, F., Silva Seixas, M., & de Aquino Neto, F, R, (2002), PRÓPOLIS: 100 ANOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS, *Quim, Nova*, 321-326,
- Scorzoni, L., Benaducci, T., Fusco Almeida, A, M., Siqueira Silva, D, H., da Silva Bolzan, V., & Soares Mendes, M, J, (2007), The use of standard methodology

- for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp, *Brazilian Journal of Microbiology*,
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M, (2010), Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees, *Apidologie*, 295-311,
- Stashenko, E., & Martínez, J, R, (2012), La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como herramienta de alta selectividad para caracterizar fósiles químicos en el petróleo, *Scientia Chromatographica*, 125-138,
- Sung, P., & Suk, W, (1997), THE USAGE AND COMPOSITION OF PROPOLIS ADDED COSMETICS IN KOREA, *Springer Science + Bussines Media* , 121-124,
- Tolosa, L., & Cañizares, E, (2002), Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche, *Ars Pharmaceutica*,
- Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de las Herreras, B., , , , Delporte, C, (2015), Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile, *Ethnopharmacology*, 37-44,
- Vega Picón, M, A, (2015), *Evaluación de la Eficacia del Aceite Esencial de Cúrcuma longa L, como conservante en una formulación cosmética orgánica*, Quito,
- Verdugo Torres, M, A., & Tola Álvarez, B, E, (2017), *Capacidad Antioxidante y Composición Química de Varios Extractos de Propóleos de la Zona Sur del Ecuador*, Cuenca,

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

UNIDAD DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS

Autores:

Andrea Del Rocío Buestán Orellana

María Luisa Torres Sigüenza

Dirigido por.

Osmany Cuesta Rubio, Ph. D

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE LA REGIÓN DEL AUSTRO ECUATORIANO

Los propóleos son sustancias resinosas o pegajosas elaborados principalmente por abejas de la especie *Apis mellifera* a partir de diferentes fuentes vegetales. La palabra propóleos proviene del griego pro que significa (defensa) y de *propolis* (ciudad), lo que se traduce en una sustancia en defensa de las colmenas.

En este trabajo de investigación se determinó la relación entre la composición química y actividad antifúngica de extractos de *propóleos* recolectados de la región del austro ecuatoriano para la identificación de los metabolitos responsables de esta actividad mediante métodos cromatográficos, espectroscópicos y ensayos in vitro, y de esta manera reemplazar en formulaciones cosméticas los ingredientes de origen sintético por aquellos de origen natural.

Se elaboraron extractos metanólicos por maceración, los mismos que fueron analizados por cromatografía en capa delgada (CCD) usando placas de Sílica gel GF254, como fase móvil una mezcla de cloroformo:metanol (9:1) y se realizaron dos tipos de revelado, físico y químico. Se empleó además la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) para la identificación y cuantificación relativa de los metabolitos presentes. Asimismo, la actividad antifúngica de los extractos obtenidos se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo frente a las cepas de *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*.

En el estudio por CCD las 3 muestras presentaron una composición química semejante, con la presencia de grupos cromóforos conjugados entre los que destacan ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas. En el análisis por CG/EM todas las muestras evidenciaron cromatogramas complejos con un total de 44 compuestos identificados para la muestra PE-15, 37 para la muestra PE-16 y 32 para la muestra PE-18 donde se incluyen azúcares, polioles, ácidos grasos, diterpenos y triterpenos como sus principales componentes. En el estudio de la CMI por microdilución en caldo se encontró que la CMI para inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* fue de 1,562 mg/ml para la muestra PE-15 y PE-16 y para PE-18 fue de 0,390 mg/ml; la CMI para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* fue de 0,781 mg/ml para la muestra PE-15, para PE-16 fue de 0,390 mg/ml y para PE-18 fue de 0,195 mg/ml; la CMI para inhibir el crecimiento de *Malassezia furfur* fue de 0,781 mg/ml usando la muestra PE-15, para PE-16 fue de 0,195 mg/ml y para PE-18 no se pudo determinar la CMI a la concentración empleada.

Palabras claves: propóleos, composición química, actividad antifúngica, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Malassezia furfur*.