



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS DE
DIFERENTES ZONAS APÍCOLAS DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO
UTILIZADOS EN LA EMPRESA APICARE - RIOBAMBA”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

JAIRO BENIGNO ANGULO VACA

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

La alegría del triunfo jamás podrá ser experimentada si no existiera la lucha que es la que determina la oportunidad de vencer.

A las personas más importantes de mi existencia, a los pilares de mi vida, razón de mi superación, por su amor, apoyo y comprensión, este trabajo de investigación lo dedico a: Dios y a mi amada madre Mercedes.

AGRADECIMIENTO

Con esta tesis quiero agradecerte a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado. A ti querida madre por brindarme tu apoyo incondicional, consejos, valores, y ejemplos de perseverancia. A mi Tutor y Colaborador de Tesis Doctora Susana Abdo y Bioquímico Fausto Contero por su esfuerzo y dedicación, quienes con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación han logrado que este anhelo llegue a ser felizmente culminado. A Mauricio y Elizabeth por su confianza y compañía. A mí amada Johana porque con amor ha permanecido junto a mí hasta cumplir otra etapa en mi vida.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS DE DIFERENTES ZONAS APÍCOLAS DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO UTILIZADOS EN LA EMPRESA APICARE - RIOBAMBA**”, de responsabilidad del señor egresado Jairo Benigno Angulo Vaca, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez
DECANO FAC. CIENCIAS

Dr. Francisco Portero
DIRECTOR ESCUELA
BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Dra. Susana Abdo
DIRECTOR DE TESIS

Bqf . Fausto Contero
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Jacinto Mera
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Tc. Carlos Rodríguez
DIRECTOR CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN

NOTA DE TESIS

Yo, **Jairo Benigno Angulo Vaca**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

JAIRO BENIGNO ANGULO VACA

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE CUADROS
ÍNDICE DE GRÁFICOS
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS
ÍNDICE DE ANEXOS
INTRODUCCIÓN

1	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	Radicales Libres.....	1
1.1.1	Generalidades.....	1
1.1.2	Definición.....	2
1.1.3	Causas.....	2
1.1.3.1	Factores Exógenos.....	2
1.1.3.2	Factores Endógenos.....	2
1.1.4	Clasificación.....	3
1.1.4.1	Radicales Libres Inorgánicos o Primarios.....	3
1.1.4.2	Radicales Libres Orgánicos o Secundarios.....	4
1.1.5	Efectos.....	4
1.2	Antioxidantes.....	5
1.2.1	Introducción.....	5
1.2.2	Definición.....	5
1.2.3	Clasificación.....	6
1.2.3.1	Antioxidantes Enzimáticos.....	6
1.2.3.2	Antioxidantes no Enzimáticos.....	6
1.2.4	Mecanismos de Acción.....	8
1.2.4.1	Interacción Directa con Especies Reactivas.....	8
1.2.4.2	Prevención de la Formación Enzimática de Especies Reactivas.....	10
1.2.4.3	Prevención de la Formación de Especies Reactivas Dependiente de Metales.....	10
1.2.4.4	Activación o Inducción de la Actividad de Enzimas Antioxidantes..	11
1.2.5	La relación entre Radicales Libres y Antioxidantes.....	11
1.3	Compuestos Fenólicos.....	11
1.3.1	Clasificación General.....	12

1.3.1.1	No Flavonoides.....	12
1.3.1.2	Flavonoides.....	12
1.4	Flavonoides.....	13
1.4.1	Actividad Antioxidante.....	14
1.4.2	Clasificación.....	14
1.4.2.1	Los Flavonoides 3-Hidroxiflavonoides.....	15
1.4.2.2	Los Flavonoides no Hidroxilados en la posición 3.....	15
1.5	Apicultura.....	16
1.5.1	Introducción.....	16
1.5.2	Definición.....	16
1.5.3	Historia.....	16
1.6	La Abeja de la Miel.....	17
1.6.1	División de trabajo	17
1.6.1.1	La Reina.....	17
1.6.1.2	El Zángano.....	18
1.6.1.3	Las Obreras.....	18
1.7	Propóleo.....	19
1.7.1	Generalidades.....	19
1.7.2	Concepto.....	19
1.7.3	Origen.....	20
1.7.4	Composición.....	20
1.7.5	Importancia.....	21
1.7.6	Países Productores.....	21
1.7.7	Porque las Abejas lo fabrican.....	21
1.7.8	Ventajas.....	22
1.7.9	Métodos de cosecha.....	23
1.7.9.1	Método Artesanal o Método de Raspado.....	23
1.7.9.2	Método Técnico.....	23
1.7.10	Propiedades Terapéuticas.....	24
1.7.11	Productos derivados del Propóleo.....	25
1.7.12	Control de la calidad.....	25
1.7.13	Toxicidad.....	26
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	27

2.1	Lugar de Investigación.....	27
2.2	Muestras, Materiales, Equipos y Reactivos.....	27
2.2.1	Muestras.....	27
2.2.2	Materiales.....	30
2.2.3	Equipos.....	30
2.2.4	Reactivos.....	31
2.3	Técnicas y Métodos.....	31
2.3.1	Determinación de los Parámetros de Calidad del propóleo.....	31
2.3.1.1	Características Organolépticas (Sensoriales).....	32
2.3.1.2	Contenido de Cera.....	32
2.3.1.3	Porcentaje de Impurezas Mecánicas.....	32
2.3.1.4	Compuestos Fenólicos.....	32
2.3.1.5	Índice de Oxidación.....	32
2.3.1.6	Flavonoides (Cualitativa).....	32
2.3.1.7	Índice de Yodo.....	32
2.3.2	Control de calidad del Propóleo como Drogas Secas.....	32
2.3.2.1	Humedad.....	32
2.3.2.2	Cenizas Totales (Método de Incineración en Mufla).....	32
2.3.2.3	Cenizas Solubles en Agua.....	32
2.3.2.4	Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.....	32
2.3.3	Elaboración de los extractos etanólicos.....	33
2.3.4	Control de calidad de los extractos etanólicos.....	33
2.3.4.1	Requisitos Organolépticos de los extractos etanólicos.....	33
2.3.4.2	pH.....	33
2.3.4.3	Índice de Refracción.....	33
2.3.4.4	Densidad Relativa.....	33
2.3.4.5	Sólidos Totales.....	33
2.3.4.6	Tamizaje Fitoquímico.....	33
2.3.5	Evaluación de la Actividad Antioxidante Total (AAT).....	36
2.3.5.1	Análisis Cromatográfico del marcador químico para Flavonoides Totales expresados como porcentaje de Quercetina (TLC).....	36
2.3.5.2	Cuantificación de Flavonoides Totales (Método del AlCl ₃).....	36
2.3.5.3	Cuantificación de Compuestos Fenólicos (Micrométodo de Folin-Ciocalteu).....	38
2.3.5.4	Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el Método Enzimático	

	de Inhibición de la Polifenoloxidasa.....	39
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
3.1	Determinación de los parámetros de calidad de las Muestras de Propóleo de las diferentes zonas apícolas.....	44
3.1.1	Características Organolépticas (Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77).	44
3.1.2	Especificaciones Físico-Químicas (Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77).....	46
3.2	Control de calidad de las Muestras de Propóleo como Drogas Secas.....	51
3.2.1	Determinación de Humedad.....	51
3.2.2	Determinación de Cenizas.....	51
3.3.	Control de Calidad de los Extractos Etanólicos.....	55
3.3.1	Determinación de los Requisitos Organolépticos de los Extractos Etanólicos.....	55
3.3.2	Determinación de los Parámetros Físicos.....	56
3.3.3	Tamizaje Fitoquímico.....	58
3.4	Evaluación de la Actividad Antioxidante Total (AAT).....	59
3.4.1	Cromatografía de Capa Fina (TLC) del Marcador Químico Flavonoides Totales expresado como presencia de Quercetina.....	59
3.4.2	Cuantificación de Flavonoides Totales (Método del AlCl ₃	60
3.4.3	Cuantificación de Compuestos Fenólicos (Micrométodo de Folin-Ciocalteu).....	61
3.4.4	Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el Método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidasa.....	63
3.4.4.1	Determinación de la Actividad Enzimática de la Polifenoloxidasa (PPO).....	63
3.4.4.2	Actividad Antioxidante Total.....	65
3.5	Análisis Estadístico.....	69
4	CONCLUSIONES.....	75
5	RECOMENDACIONES.....	76
6	RESUMEN.....	77
7	BIBLIOGRAFÍA.....	79
8	ANEXOS.....	89

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
°F	Grados Farenjay
μL	Microlitro
AAT	Actividad Antioxidante Total
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Ácido Gálico
CAT	Catalasa
CF	Compuestos Fenólicos
cm	Centímetros
EGA	Equivalentes de Ácido Gálico
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
g	Gramo
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
GSH	Tripéptido Glutación
GST	Glutación Sulfhidril Transferasa
HAT	Hidrogen atom transfer
IM	Impurezas Mecánicas
IO	Índice de Oxidación
IY	Índice de Yodo
mg	Miligramos
min.	Minutos
mL	Mililitro
Mol	Moles
MPO	Mieloperoxidasa
N	Normalidad
NAD	Nicotina Amino Dinucleótido
NADPH	Nicotina Amino Dinucleótido Fosfato Reducido
nm	Nanómetros
NOS	Óxido nítrico sintasa
pH	Potencial de Hidrógeno
RL	Radicales Libres
s	Segundo
SET	Single electron transfer
SOD	Superóxido Dismutasa
XO	Xantinaoxidasa

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Muestras de Propóleos analizados en la investigación, recogidas en las Provincias de Chimborazo y Guayas.....	28
TABLA No. 2	Técnicas para el Tamizaje Fitoquímico.....	34
TABLA No. 3	Esquema de reactivos para la Cuantificación de Flavonoides Totales por el Método del $AlCl_3$	37
TABLA No. 4	Ecuación de la recta obtenida para la Curva de Calibración del estándar de rutina para la Determinación del Contenido de Flavonoides Totales.....	38
TABLA No. 5	Esquema de reactivos para la Cuantificación de Compuestos Fenólicos por el Micrométodo de Folin-Ciocalteu.....	38
TABLA No. 6	Ecuación de la recta obtenida para la Curva de Calibración del Estándar de Ácido Gálico para la determinación del Contenido de Compuestos Fenólicos Totales.....	39
TABLA No. 7	Esquema para la elaboración del Búffer Acetato de Sodio/Ácido Acético a pH 7.....	40
TABLA No. 8	Esquema para el ensayo de la Capacidad Antioxidante.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Características Organolépticas Determinadas para las muestras de Propóleo en base a la Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77.....	45
CUADRO No. 2	Especificaciones Físico-Químicas determinadas en el Propóleo en base a la Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77 e IRAM 15.935-1: 2008.....	46
CUADRO No. 3	Resultados de la Determinación de Humedad de las muestras de Propóleo como Drogas Secas para las cuatro zonas Apícolas	52
CUADRO No. 4	Resultados de la Determinación de Cenizas Totales, solubles en Agua e Insolubles en HCl de las muestras de Propóleo como Drogas Secas.....	53
CUADRO No. 5	Resultados de la Determinación de los requisitos organolépticos de los Extractos Etanólicos de Propóleo de Cuatro Zonas Apícolas.....	55
CUADRO No. 6	Resultados de la Determinación de los Parámetros Físicos de los Extractos Etanólicos de Propóleo de Cuatro Zonas Apícolas	56
CUADRO No. 7	Resultados del Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Etanólicos de Propóleo de Cuatro Zonas Apícolas.....	58
CUADRO No. 8	Resultado de la Determinación de los Rf de las manchas obtenidas para cada Muestra de Propóleo de las Cuatro Zonas Apícolas en Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	59
CUADRO No. 9	Resultados de la Concentración de Flavonoides Totales Expresados en mg de Rutina/100 g de Muestra Determinados en los Extractos Etanólicos de Propóleo de las Cuatro Zonas Apícolas.....	60
CUADRO No. 10	Resultados de la Concentración de Compuestos Fenólicos Totales expresados en mg de Ácido Gálico/100 g De muestra determinados en los Extractos Etanólicos de Propóleo de cuatro Zonas Apícolas.....	62
CUADRO No. 11	Actividad enzimática (Abs/minuto) de la Polifenoloxidasa (PPO) medida para diferentes tiempos de congelación a -6 °C...	63
CUADRO No. 12	Resultados de la Determinación de la Actividad Antioxidante Total (AAT) expresada como porcentaje de Inhibición de la Polifenoloxidasa (PPO) encontrados para las Muestras de Propóleo de cuatro Zonas Apícolas en concentraciones de 10, 100 y 1 000 ppm.....	65
CUADRO No. 13	Prueba de Tukey HSD al 95 % para la Concentración de Flavonoides Totales de las Zonas Apícolas.....	69
CUADRO No. 14	Prueba de Tukey HSD al 95 % el Contenido de Compuestos Fenólicos Totales de las Cuatro Zonas Apícolas.....	70
CUADRO No. 15	Prueba de Tukey HSD al 95 % para la Actividad Antioxidante de la muestra a 10 ppm.....	71

CUADRO No. 16	Prueba de Tukey HSD al 95 % para la Actividad Antioxidante de la muestra a 100 ppm.....	72
CUADRO No. 17	Prueba de Tukey HSD al 95 % para la Actividad Antioxidante de la muestra a 1 000 ppm.....	73
CUADRO No. 18	Anova un Factor para el porcentaje de Cera de las Zonas Apícolas.....	94
CUADRO No. 19	Prueba de Tukey HSD al 95 % para el porcentaje de Cera de las Zonas Apícolas.....	94
CUADRO No. 20	Anova un Factor para el porcentaje de Impurezas Mecánicas de las Zonas Apícolas.....	95
CUADRO No. 21	Prueba de Tukey HSD al 95 % para el porcentaje de Impurezas Mecánicas de las Zonas Apícolas.....	95
CUADRO No. 22	Anova un Factor para el porcentaje de Compuestos Fenólicos de las Zonas Apícolas.....	96
CUADRO No. 23	Prueba de Tukey HSD al 95 % para el porcentaje de Compuestos Fenólicos de las Zonas Apícolas.....	96
CUADRO No. 24	Anova un Factor para el Índice de Oxidación de las Zonas Apícolas.....	97
CUADRO No. 25	Prueba de Tukey HSD al 95 % para el Índice de Oxidación de las Zonas Apícolas.....	97
CUADRO No. 26	Anova un Factor para el Índice del Yodo de las Zonas Apícolas	98
CUADRO No. 27	Prueba de Tukey HSD al 95 % para el Índice del Yodo de las Zonas Apícolas.....	98
CUADRO No. 28	Curva de Calibración para la Cuantificación de Flavonoides Totales usando rutina como patrón en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.....	99
CUADRO No. 29	Curva de Calibración para la Cuantificación De Compuestos Fenólicos Totales usando Ácido Gálico como patrón en concentraciones de 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 y 2 000 ppm..	100
CUADRO No. 30	Anova un Factor para la Concentración de Fenoles Totales de las Zonas Apícolas.....	101
CUADRO No. 31	Anova un Factor para la Concentración de Flavonoides Totales de las Zonas Apícolas.....	101
CUADRO No. 32	Anova un Factor para la Actividad Antioxidante de la Muestra a 10 ppm.....	102
CUADRO No. 33	Anova un Factor para la Actividad Antioxidante de la muestra a 100 ppm.....	102
CUADRO No. 34	Anova un Factor para la Actividad Antioxidante de la Muestra a 1 000 ppm.....	103
CUADRO No. 35	Tamizaje Fitoquímico realizado por Nuria, Y., en el Instituto de Farmacia y Alimentos.....	103

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Determinación del % de Cera presentes en Propóleos de las Cuatro Zonas Apícolas.....	47
GRÁFICO No. 2	Determinación del % de Impurezas Mecánicas presentes en Propóleos de las Cuatro Zonas Apícolas.....	48
GRÁFICO No. 3	Determinación del % de Compuestos Fenólicos presentes en Propóleos de las Cuatro Zonas Apícolas.....	49
GRÁFICO No. 4	Determinación del % de Índice del Yodo presentes en Propóleos de las Cuatro Zonas Apícolas.....	50
GRAFICO No. 5	Porcentaje de Humedad de las Cuatro Zonas Apícolas y el valor de referencia establecido por la USP #18 para Productos Naturales.....	52
GRAFICO No. 6	Porcentaje de Cenizas Totales, Cenizas Solubles en Agua y Cenizas Insolubles en HCl de Propóleos de las Cuatro Zonas Apícolas.....	54
GRAFICO No. 7	Parámetros Físicos de los extractos de Propóleos de las Cuatro Zonas Apícolas.....	56
GRAFICO No. 8	Concentración de Flavonoides Totales extraídos en los extractos etanólicos de Propóleo expresados en mg de rutina por 100 g de Muestra.....	60
GRAFICO No. 9	Concentración de Compuestos Fenólicos Totales extraídos en los extractos etanólicos de Propóleo expresados en mg de Ácido Gálico por 100 g de Muestra.....	62
GRAFICO No. 10	Curvas de la Actividad Enzimática de la Polifenoloxidas (PPO) medidas después de diferentes tiempos de congelación a -6 °C.....	64
GRAFICO No. 11	Actividad Antioxidante expresada por % de Inhibición de la Polifenoloxidas de los extractos etanólicos de Propóleo de cuatro Zonas Apícolas en concentración de 10 ppm.....	66
GRÁFICO No. 12	Actividad Antioxidante expresada por % de Inhibición de la Polifenoloxidas de los extractos etanólicos de Propóleo de cuatro Zonas Apícolas en concentración de 100 ppm.....	66
GRÁFICO No. 13	Actividad Antioxidante expresada por % de Inhibición de la Polifenoloxidas de los extractos etanólicos de Propóleo de cuatro Zonas Apícolas en concentración de 1 000 ppm.....	67
GRÁFICO No. 14	Curva de Absorbancia vs Concentración de rutina en Concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, para la Cuantificación de Flavonoides Totales.....	69
GRÁFICO No. 15	Curva de Absorbancia vs Concentración de Ácido Gálico en Concentraciones de 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 y 2 000 ppm para la Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructura Básica de los Flavonoides.....	13
FIGURA No. 2	Cromatograma del Barrido del extracto etanólico de la Muestra de Propóleo de la Zona de Socorro de 200 a 400 nm.....	90
FIGURA No. 3	Cromatograma del Barrido del extracto etanólico de la Muestra de Propóleo de la Zona de Nitaluisa de 200 a 400 nm.....	91
FIGURA No. 4	Cromatograma del Barrido del extracto etanólico de la Muestra de Propóleo de la Zona de Chambo de 200 a 400 nm.....	92
FIGURA No. 5	Cromatograma del Barrido del extracto etanólico de la Muestra de Propóleo de la Zona de Virgen de Fátima de 200 a 400 nm...	93

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Abeja (<i>Apis mellífera</i>).....	17
FOTOGRAFÍA No. 2	Recolección de Propóleo por el Método de Raspado.....	23
FOTOGRAFÍA No. 3	Recolección de Propóleo por el Método de Malla de Tejido Mosquitero Plástico.....	23
FOTOGRAFÍA No. 4	Recolección de Propóleo por el Método de Mallas Matrizadas.....	24
FOTOGRAFÍA No. 5	Placa Cromatográfica de los Extractos Etanólicos de Propóleos de Cuatro Zonas Apícolas.....	104
FOTOGRAFÍA No. 6	Recolección del Propóleo.....	105
FOTOGRAFÍA No. 7	Análisis Microscópico de las Muestras de Propóleo de las Cuatro Zonas Apícolas con el lente de 40 X.....	106
FOTOGRAFÍA No. 8	Pruebas Físico-Químicas para Determinar la Calidad del Propóleo.....	107
FOTOGRAFÍA No. 9	Parámetros Físicos de los Extractos Etanólicos.....	108
FOTOGRAFÍA No. 10	Ensayos realizados para la Identificación de Metabolitos Secundarios en los Extractos.....	109
FOTOGRAFÍA No. 11	Método de Folin-Ciocalteau y $AlCl_3$	110
FOTOGRAFÍA No. 12	Obtención del Extracto Enzimático de la PPO.....	111

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Cromatogramas del Barridos de los Extractos Etanólicos de las Muestras de Propóleo de las Zonas Apícolas de: Socorro, Nitiluisa, Chambo y Virgen de Fátima, de 200 a 400 nm.....	89
ANEXO No. 2	Análisis Estadístico de los Parámetros de Calidad de las Muestras de Propóleo de las Zonas Apícolas. Programa Estadístico G-STAT 2.1. Prueba Anova un Factor y Tukey HSD al 95 %.....	94
ANEXO No. 3	Elaboración de la Curva de Calibración de rutina como patrón para la Cuantificación de Flavonoides Totales.....	99
ANEXO No. 4	Elaboración de la Curva de Calibración de Ácido Gálico como patrón para la Cuantificación de Compuestos Fenólicos.....	100
ANEXO No. 5	Análisis Estadístico de la Concentración de Flavonoides Totales de las Muestras de las Zonas Apícolas. Programa Estadístico G-STAT 2.1.....	101
ANEXO No. 6	Análisis Estadístico de la Concentración de Fenoles Totales de las Muestras de las Zonas Apícolas. Programa Estadístico G-STAT 2.1.....	101
ANEXO No. 7	Análisis Estadístico de la Actividad Antioxidante de la Muestra a 10 ppm. Programa Estadístico G-STAT 2.1.....	102
ANEXO No. 8	Análisis Estadístico de la Actividad Antioxidante de la Muestra a 100 ppm. Programa Estadístico G-STAT 2.1.....	102
ANEXO No. 9	Análisis Estadístico de la Actividad Antioxidante de la Muestra a 1 000ppm. Programa Estadístico G-STAT 2.1.....	103
ANEXO No. 10	Tamizaje Fitoquímico realizado por Nuria, Y., en el Instituto de Farmacia y Alimentos.....	103
ANEXO No. 11	Placa Cromatográfica de los Extractos Etanólicos de Propóleos de Cuatro Zonas Apícolas.....	104
ANEXO No. 12	Recolección del Propóleo.....	105
ANEXO No. 13	Análisis Microscópico de las Muestras de Propóleos de las Cuatro Zonas Apícolas.....	106
ANEXO No. 14	Control de Calidad del Propóleo.....	107
ANEXO No. 15	Control de Calidad de los Extractos Etanólicos.....	108
ANEXO No. 16	Tamizaje Fitoquímico De los Extractos Etanólicos.....	109
ANEXO No. 17	Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides Totales..	110
ANEXO No. 18	Extracción de la Enzima PPO.....	111

INTRODUCCIÓN

Las plantas y organismos animales ofrecen una amplia diversidad de componentes, los cuales pueden servir como fármacos, así como revelar nuevos mecanismos de acción para el control de enfermedades, es por ello que en las últimas décadas, ha aumentado considerablemente el uso de productos naturales como agentes terapéuticos; esto se debe a que se considera que regresar a lo natural es la mejor manera de llevar una vida más saludable. (36)

Cuando aún el hombre no poblaba la tierra, ya las laboriosas abejas trabajaban afanosamente, ya que con ellas la sabia naturaleza había conseguido una de las mayores muestras de organización colectiva y especialización individual, tan perfecta, que no ha sido necesario variarla. Satisfacen sus necesidades nutricionales con uno de los alimentos más completos, la miel, tuvo la abeja también necesidad de crear sistemas de defensa para protegerse de sus depredadores creando un arma individual, el veneno y un arma colectiva, el propóleo que es uno de los productos apícolas más valiosos. (37)

La composición química del propóleo ha sido un tema sumamente debatido y las divergencias de opiniones están basadas en las variaciones que puedan presentarse con la poca uniformidad de sus componentes. Debemos situarnos en el hecho básico de que la abeja elabora los propóleos de acuerdo a sus necesidades y probabilidades de fuentes de materia prima, por lo que está demostrado internacionalmente que será muy difícil encontrar dos colmenas que produzcan propóleos idénticos aun cuando estén ubicados en la misma zona geográfica, los compuestos fenólicos que encontramos en el propóleo constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy grande de compuestos, algunos todavía no identificados. La concentración en polifenoles también es muy variable, porque depende de muchos factores tales como la variedad o el grado de maduración de la materia prima vegetal. Sin embargo, actualmente hay un interés creciente debido a su capacidad antioxidante, como captadores de radicales libres. (43)

La actividad de los antioxidantes es frenar las reacciones de oxidación en las células a partir de las que se originan los nocivos radicales libres. Por tanto, su papel es clave en la reducción enfermedades cardiovasculares, de tumores, y de enfermedades neurodegenerativas, al tiempo que potencian el sistema inmunológico. (37)

El Ecuador cuenta con una gran biodiversidad de flora y fauna, su ubicación geográfica lo privilegia para producir recursos de inmejorable calidad que han calificado como los mejores productos del mundo. Actualmente los productos de la colmena están brindando excelentes resultados como nutraceuticos (alimento y medicina), lo que favorece a la apicultura en nuestro país. Por lo tanto una adecuada caracterización y cuantificación de los compuestos polifenólicos presentes en las diferentes muestras de propóleo, servirá como base para garantizar la eficacia y la calidad de los productos elaborados a partir de estos, promoviendo su producción y uso en la población ecuatoriana, dando valor agregado a los derivados apícolas y siendo punto de partida para posteriores investigaciones que permitan desarrollar alternativas terapéuticas para garantizar la salud de la población, y para que sirva de incentivo a otros investigadores, ya que, con el esfuerzo de todos, el propóleo ocupe el lugar que le corresponde. (41) (51)

La presente investigación se realizó con el objetivo de caracterizar y evaluar la calidad del propóleo ecuatoriano, en base al contenido de sus principios activos y la actividad biológica de los mismos, conjuntamente con la empresa APICARE, experta en el desarrollo de servicios agropecuarios, (en especial la apicultura); compuesta por un personal técnico profesional capacitado inmerso en el trabajo y desarrollo de la producción, la implementación tecnológica, la transmisión del conocimiento, con el fin de promover el bienestar social y ambiental. (30)

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 RADICALES LIBRES

1.1.1 GENERALIDADES

El concepto de radicales libres se originó en el siglo pasado, cuando por primera vez los químicos orgánicos observaron que ciertos grupos de átomos dentro de una molécula, durante las reacciones químicas, parecían saltar de una molécula a otra. Cuando un radical se salía de una molécula, llegaba a ser libre. De allí su nombre. Pero al fin del siglo, en la medida que mejoraron los métodos analíticos, y no se pudo comprobar la existencia real de estos radicales libres, los científicos llegaron a dudar de su existencia.

Fue durante la Segunda Guerra Mundial, en que Estados Unidos dejó de tener acceso al caucho natural del Sudeste Asiático y de la India, que los radicales libres tomaron de nuevo actualidad. Ello debido al rol clave de los radicales en la química de los polímeros. (39)

A partir de entonces se comenzaron a conocer las propiedades básicas de los radicales libres y las tremendas posibilidades en sus aplicaciones industriales. El desarrollo de polímeros, como el neoprén (una goma sintética) y la química de los plásticos, dieron un gran soporte a la investigación de esta área, y el rol que los radicales libres jugaban en el proceso de polimerización. Entre los años 1940 y 1960, con el desarrollo de la energía nuclear y el estudio del efecto de las radiaciones (que son mediadas por reacciones de radicales libres), despertó un

enorme interés por conocer más acerca de ellos. De allí comenzó el interés por conocer las funciones de estos radicales en toda la biología celular. Más tarde, el fantástico desarrollo de la electrónica, permitió fabricar instrumental que pudo detectar lo efímero de los radicales libres, que existían por tiempos tan cortos como mil millonésimas de segundos. (38)

1.1.2 DEFINICIÓN

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón libre en capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos y la consecuencia de estas reacciones genera una desorganización en las membranas celulares de nuestro organismo. (51)

1.1.3 CAUSAS

1.1.3.1 Factores exógenos

Se pueden sintetizar en el laboratorio. Pueden ser producto de la contaminación atmosférica, el humo del cigarrillo que contiene hidrocarburos aromáticos polinucleares, así como aldehídos que producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo.

El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos trans como los de las grasas de la carne y de la leche también contribuye al aumento de los radicales libres. (38) (51)

1.1.3.2 Factores endógenos

El mismo cuerpo humano fabrica los radicales libres por el contacto con el oxígeno (respiración). También se producen radicales libres por la acción de las enzimas oxidantes y las células fagocitarias. (39)

1.1.4 CLASIFICACIÓN

1.1.4.1 Radicales libres inorgánicos o primarios

1. Radicales Libres derivados del Oxígeno

El oxígeno para transformarse en radical tiene que adquirir un electrón, es decir experimentar una reducción. Según las circunstancias de las uniones del oxígeno, se pueden originar cuatro derivados reactivos, dos de ellos verdaderos radicales: el anión superóxido y el hidroxilo, y dos formas muy reactivas pero sin la exagerada agresividad de los radicales: el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singlete. (39)

El proceso de reducción del oxígeno molecular ocurre en cuatro etapas que involucran, cada una de ellas, la incorporación de un electrón a la molécula. Así se forma el radical libre “superóxido” ($O_2\bullet$).

Posteriormente se forma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que aunque no es un radical libre, es de gran reactividad. Un nuevo proceso de reducción transforma el peróxido de hidrógeno en el radical libre

hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), y finalmente se forma como producto final el agua. El radical superóxido es poco reactivo y tiende a reaccionar consigo mismo dando origen a un proceso conocido como “dismutación”, que lo transforma en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El aspecto más relevante de esta reacción es que el radical superóxido puede además reaccionar con el producto de su propia dismutación (el peróxido de hidrógeno), formando, entre otros productos, el radical libre hidroxilo, considerado como uno de los productos más reactivos del oxígeno. Las reacciones que se verifican con la transferencia de un electrón desde un dador electrónico a un aceptor electrónico se denominan reacciones de óxido-reducción. (51)

En la cadena respiratoria citocromo-oxidasa mitocondrial, se realiza el transporte electrónico desde un sustrato orgánico glucídico, a un aceptor electrónico (el oxígeno molecular), quedando agua y energía liberada, que el organismo tanto requiere y almacena bajo la forma de adenosintrifosfato (ATP). (39)

En esta reacción los electrones se desplazan por pares, pero una pequeña parte, que oscila del 2 % al 5 %, es objeto de una reducción monovalente, de un solo electrón, resultando un RL de cada electrón impar, generalmente el temido anión superóxido. Este radical es degradado por la superóxido dismutasa (SOD) y específicamente neutralizado en gran medida por la vitamina E. (39) (51)

1.1.4.2 Radicales libres orgánicos o secundarios

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario aun átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. (38)

1.1.5 EFECTOS

Son moléculas inestables y muy reactivas. Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen. (51)

Los radicales libres producen daño a diferentes niveles en la célula:

- Atacan a los lípidos y proteínas de la membrana celular por lo que la célula no puede realizar sus funciones vitales (transporte de nutrientes, eliminación de desechos, división celular).

El radical superóxido, O_2^- , que se encuentra normalmente en el metabolismo provoca una reacción en cadena de la lipoperoxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular.

- Atacan al DNA impidiendo que tenga lugar la replicación celular y contribuyendo al envejecimiento celular.

Los procesos normales del organismo producen radicales libres como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. También estamos expuestos a elementos del medio ambiente que crean radicales libres como la polución industrial, tabaco, radiación, medicamentos, aditivos químicos en los alimentos procesados y pesticidas. (38) (51)

No todos los radicales libres son peligrosos pues, por ejemplo, las células del sistema inmune crean radicales libres para matar bacterias y virus, pero si no hay un control suficiente por los antioxidantes, las células sanas pueden ser dañadas. (51)

1.2 ANTIOXIDANTES

1.2.1 INTRODUCCIÓN

La evidencia científica acumulada durante las últimas dos décadas indica que, más allá de las promesas iniciales de retardar el envejecimiento, los antioxidantes al ser consumidos bajo la forma de alimentos tienen un importante potencial para reducir el desarrollo de aquellas enfermedades que actualmente más afectan a la población mundial (enfermedades cardiovasculares, tumorales y neuro-degenerativas). Como resultado de tal reconocimiento los antioxidantes han pasado a ser crecientemente considerados por la población como “Moléculas cuyo consumo es sinónimo de salud”. (32)

1.2.2 DEFINICIÓN

El término “antioxidante” se refiere a cualquier molécula capaz de estabilizar o desactivar los radicales libres antes de que puedan atacar a las células, es decir retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. (41) (32)

1.2.3 CLASIFICACIÓN

1.2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos

1. Glutathión Peroxidasa

El metabolismo del glutathión es uno de los mecanismos de defensa antioxidante más importantes presentes en las células. Sus propiedades antioxidantes permiten la eliminación de los peróxidos, que son una base potencial para la reacción de Fenton (una de las principales reacciones que producen las especies radicales). (51)

2. Catalasa

Esta enzima está presente en los peroxisomas de las células aerobias y es muy eficiente para promover la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y moléculas de oxígeno. (41)

3. Superóxido Dismutasa

Es uno de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más eficaces, catalizando la conversión de radicales superóxido en moléculas de oxígeno y peróxido de hidrógeno. (40)

1.2.3.2 Antioxidantes no Enzimáticos

1. Vitamina E

Se trata de una vitamina liposoluble que presenta ocho isoformas distintas. En los humanos, el α -tocoferol es la isoforma más activa, siendo un poderoso antioxidante ligado a la membrana celular. La principal función de la vitamina E es proteger contra la peroxidación lipídica, también se encuentra en el plasma y en las partículas LDL. Existen estudios que sugieren una asociación inversa entre el consumo de

vitamina E y el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares. (33)
(41)

2. Vitamina C

Es una vitamina hidrosoluble con un poderoso efecto antioxidante. Sus compañeros antioxidantes son la vitamina E y los carotenoides, así como las enzimas antioxidantes. Esta participa en el sistema de regeneración de la vitamina E, manteniendo el potencial antioxidante del plasma, también aumenta los niveles de glutatión intracelular, desempeñando así un importante papel en la protección de las proteínas contra la oxidación del grupo tiol. (33)

3. Zinc

El zinc posee una función de defensa antioxidante y de reparación del ADN, cualquier deficiencia marginal de este mineral provoca estrés oxidativo, por ejemplo, a nivel de la próstata. (41)

4. Tioles Antioxidantes

El principal tiol antioxidante es el tripéptido glutatión (GSH), un antioxidante intracelular, multifuncional considerado el principal tiol-disulfuro redox de la célula, es abundante en el citoplasma, en los núcleos y en las mitocondrias, siendo el principal antioxidante soluble en dichos compartimentos celulares. (51)

5. Melatonina

Se trata de una neurohormona sintetizada principalmente en la hipófisis, tiene muchos efectos sobre una amplia gama de funciones

fisiopatológicas, entre ellas la eliminación de los radicales libres del metabolismo del oxígeno. (32)

6. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos coloreados contenidos principalmente en las plantas, los carotenoides presentes en mayor cantidad en nuestra dieta son el betacaroteno, el licopeno, la luteína, la betacriptoxantina, la zeaxantina y la astaxantina. (41)

Algunos estudios epidemiológicos han revelado que el aumento del consumo de carotenoides se relaciona con un menor riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la edad. Los carotenoides contienen dobles enlaces conjugados, y su acción antioxidante se debe a su capacidad para deslocalizar los electrones desapareados. (51)

7. Polifenoles

Los flavonoides, pertenecientes al grupo de los polifenoles, son fitonutrientes presentes en diversas plantas que constituyen una parte integrante de la alimentación humana. Poseen características antioxidantes, propiedades quelantes y están asociados a la prevención de patologías crónicas y enfermedades relacionadas con la edad. La actividad más conocida de los flavonoides es su protección contra el estrés oxidativo. Los flavonoides pueden eliminar los radicales peroxilo, ser eficaces inhibidores de la peroxidación lipídica y ser quelantes de los metales redox-activos, evitando la ruptura catalítica del peróxido de hidrógeno. (41) (51)

1.2.4 MECANISMOS DE ACCIÓN

Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas.

1.2.4.1 Interacción directa con especies reactivas

El mecanismo más conocido, aunque no necesariamente el más relevante a la acción, se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como “estabilizadores o apagadores de diversas especies reactivas”. Esto último supone la conocida actividad “scavenger” de radicales libres que tienen muchas moléculas antioxidantes. En el caso de los radicales libres, tal acción implica su estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas. Tal mecanismo, definido como “SET” (single electron transfer), permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que, como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. Junto al mecanismo SET, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón). Tal mecanismo es definido como “HAT” (hydrogen atom transfer). En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente.

(33)

Los antioxidantes cuya acción es promovida a través de mecanismos SET y/o HAT son mayoritariamente los antioxidantes no enzimáticos, sean estos normalmente biosintetizados por el organismo humano, o bien que ingresen al organismo a través de la dieta. La mayor parte de los antioxidantes que actúan a través de estos mecanismos presentan en su

estructura química, como grupos funcionales, hidroxilo fenólicos (ejemplo, todos los polifenoles y los tocoferoles). No obstante, otros antioxidantes, no fenólicos, como el glutatión, la melatonina, y los ácidos ascórbico, dihidrolipóico y úrico, son también ejemplos de moléculas cuya acción es promovida por mecanismos SET y/o HAT. (32)

Junto a los mecanismos SET y HAT, ciertos antioxidantes puede actuar también estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica “la adición directa del radical a su estructura”. Ejemplo de este tipo de acción antioxidante es la promovida por carotenos como beta-caroteno. Como resultado de tal reacción, el radical libre (ej. peroxilo) pierde su condición, y el caroteno es modificado covalentemente, convirtiéndose en un radical libre que a través de reacciones sucesivas es oxidado y convertido en derivados epóxido y carbonilos de notablemente menor reactividad. (32) (41)

Como es de esperar, la interacción directa entre un antioxidante y una especie reactiva prevendrá ya sea el inicio y/o la propagación de procesos oxidativos que afectan a los sustratos biológicos. (40)

1.2.4.2 Prevención de la formación enzimática de especies reactivas

Algunos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de ROS y RNS. Lo hacen inhibiendo, ya sea la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas pro-oxidantes involucradas en la generación de especies reactivas, como la NADPH-oxidasa (NOX), la xantinaoxidasa (XO), la mieloperoxidasa (MPO) y la óxido nítrico-sintasa (NOS). Este tipo de acción antioxidante no demanda que un antioxidante exhiba en su estructura características que típicamente se asocian a los mecanismos de acción ET o HAT. Ejemplos de inhibidores de la actividad de estas enzimas son, para compuestos provenientes de la dieta, ciertos

polifenoles capaces de inhibir la NOX, la MPO y la XO, y algunos agentes empleados en la terapia de la gota, como alopurinol, y febuxostat que inhiben la xantina oxidasa. (32)

1.2.4.3 Prevención de la formación de especies reactivas dependiente de metales

Un segundo mecanismo que también implica la inhibición de la formación de especies reactivas se relaciona con contraponer la capacidad que tienen ciertos metales de transición, como hierro y cobre (ambos en su estado reducido), para catalizar (actividad redox) la formación de radicales superóxido a partir de la reducción de oxígeno y de radicales hidroxilo, a partir de peróxido de hidrógeno (Reacción de Fenton). Aquellas moléculas que tienen la habilidad de unir tales metales, formando complejos o quelatos, logran inhibir la actividad redox de éstos, previniendo la formación de las especies reactivas anteriormente mencionadas. Se incluyen en este grupo de antioxidantes ciertos péptidos y proteínas normalmente biosintetizadas por el organismo y cuya función fisiológica les implica transportar, almacenar y/o excretar hierro (como ferritina) o cobre (como metalotioneína y ceruloplasmina); ciertos polifenoles que acceden al organismo a través de la dieta y cuya característica distintiva es presentar en su estructura flavonoídea un grupo catecol en el anillo B, y algunos agentes que son empleados en la terapia de remoción de metales como desferroxamina que atrapa hierro, y penicilamina o tetratiomolibdato que atrapan cobre. (32) (40)

1.2.4.4 Activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes

Como parte de la defensa antioxidante, el organismo humano biosintetiza ciertas enzimas cuya función es remover especies reactivas,

principalmente ROS. Entre estas destacan las siguientes: superóxido dismutasa (SOD, en sus isoformas Cu/Zn y Mn-dependientes) que reduce radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, catalasa (CAT, hierro-dependiente) que reduce peróxido de hidrógeno a agua, glutatión peroxidasa (GSpx; Se-dependiente) que reduce lipo-hidroperóxidos a sus alcoholes correspondientes, glutatión-S-transferasa (GST) en su tipo peroxidasa que actúa reduciendo peróxidos orgánicos, glutatión reductasa que reduce glutatión oxidado (GSSG) a (GSH), y sulfoxi-metionina-reductasa que regenera metionina a partir de su metabolito sulfoxi-oxidado. (32) (51)

1.2.5 LA RELACIÓN ENTRE RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

La relación entre radicales libres, antioxidantes y otros cofactores es importante en la conservación de la salud, el envejecimiento y los problemas relacionados con la edad.

Los radicales libres inducen el estrés oxidativo, que es equilibrado por antioxidantes endógenos, mediante la ayuda de cofactores y por la ingesta de antioxidantes exógenos.

Si la producción de radicales libres es excesiva con respecto a la función de los factores protectores, los antioxidantes y algunos cofactores, pueden aparecer lesiones oxidativas que durarán todo el ciclo de vida y que podrán estar involucradas en el proceso de envejecimiento y en patologías dependientes de éste. (40) (41)

1.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

El término compuestos fenólicos engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles. (26)

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados nuevamente por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (por ejemplo los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable. (13)

1.3.1 CLASIFICACIÓN GENERAL

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos:

1.3.1.1 No flavonoides

- Fenoles no carboxílicos: C6, C6-C1, C6-C3.
- Ácidos fenoles: derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.

1.3.1.2 Flavonoides (C6-C3-C6)

- Antocianos.
- Flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos. (13) (26)

1.4 FLAVONOIDES

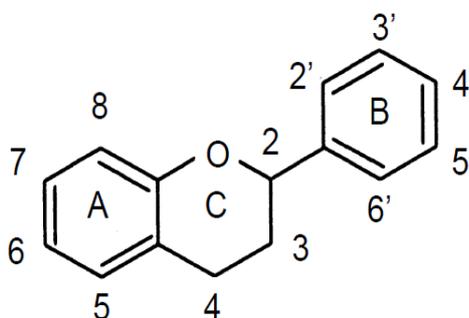


FIGURA No. 1. ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS FLAVONOIDES.

FUENTE:

http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002/2002_los_flavonoides_propiedades_y_acciones_antioxidantes.pdf

Son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado C6-C3-C6, conocido alrededor de 900 flavonoides naturales que se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres o como glicósidos. (1)

Además este gran grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por el premio Nobel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien les denominó como “vitamina P”. El Dr. Szent-Gyorgi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las cuales están muchas de las

que les confieren colores: amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos, especialmente. (26)

Los flavonoides son un grupo de moléculas que son producidas por el metabolismo secundario que, al igual que otros principios activos vegetales, se originan mediante una ruta biosintética mixta (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de la malonilcoenzima A). Son los antioxidantes más potentes presentes en los alimentos vegetales. (13)

1.4.1 ACTIVIDAD ANTIOXINADTE

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. (17)

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica, ya que al poder unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN, quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. (13) (17)

Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatorias. (17) (26)

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides son:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante. (17)

1.4.2 CLASIFICACIÓN

La principal clasificación de los flavonoides se consigue atendiendo a la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3.

1.4.2.1 Los flavonoides 3-hidroxi flavonoides

- **Flavanoles:** Los flavanoles predominantes son la catequina y su isómero epicatequina, la galocatequina y su isómero epigalocatequina. Los flavanoles glicosilados son poco frecuentes.
- **Flavonoles:** Se caracterizan por la presencia de un doble enlace en C2 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. Se conocen 450 tipos de agliconas y 900 tipos de glucósidos aproximadamente, de los cuales la gran mayoría se presentan como O-glucósidos unidos en las posiciones 3 y/o 7.
- **Antocianinas:** Químicamente las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por

medio de un enlace glucosídico. Las antocianidinas se caracterizan por la presencia de dos dobles enlaces, uno en la posición 1 y otro en el C3 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. (26)

1.4.2.2 Los flavonoides no hidroxilados en la posición 3

- Flavonas: Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, son las responsables del color amarillento de los vinos blancos y se caracterizan porque tienen un doble enlace en el heterociclo en la posición 2 -3 y el carbono 4 es un grupo carbonilo.
- Isoflavonas: Las isoflavonas son sustancias diferentes a los esteroides endógenos humanos con capacidad de unirse a los receptores estrogénicos.
- Flavanonas: Se diferencian de las flavonas en que la insaturación del heterociclo no está presente, se encuentran en los cítricos y son las responsables en muchos casos de su sabor amargo. (13)

1.5 APICULTURA

1.5.1 INTRODUCCIÓN

Toda actividad productiva tiene como finalidad el bienestar de las personas y, a esta premisa, la apicultura no se encuentra ajena. Es así que las diferentes formas y métodos desarrollados en la apicultura, deben ser considerados como parte de una empresa productiva rentable, que genera

ingresos al apicultor aumentando su estándar y calidad de vida, con el beneficio adicional de mejorar la calidad del entorno, al buscar una mejor producción de frutos y semillas de los vegetales que son visitados por las abejas. (6)

1.5.2 DEFINICIÓN

Si analizamos etimológicamente Apicultura observamos que la palabra proviene del latín *Apis* (abeja) y *Cultura* (cultivo), es decir, la ciencia que se dedica al cultivo de las abejas o a la cría de las abejas, ya que se trata de animales. (35)

Una definición completa sería la que la define como “la ciencia aplicada que estudia la abeja melífera y mediante la tecnología se obtienen beneficios económicos”. Se distinguen dos tipos de beneficios:

- Directos: como consecuencia de la venta de los productos apícolas (miel, polen y cera).
- Indirectos: debida a la acción que realiza como vector de polen en los cultivos. (35)

1.5.3 HISTORIA

Existen datos históricos que señalan la existencia de prácticas apícolas a través de distintos períodos, es así que se observan pinturas rupestres que datan de 7 000 y 8 000 años de antigüedad donde muestran escenas de recolección de miel de colmenas silvestres. (43)

En general, siempre en los relatos de las sociedades más avanzadas de todas las épocas, se han encontrado vestigios del conocimiento de las abejas y de la explotación racional de la miel y la cera. (43)

1.6 LA ABEJA DE LA MIEL



FOTOGRAFÍA No. 1. ABEJA (*Apis mellifera*).

FUENTE:

http://www.educa.madrid.org/web/ies.atenea.sansebastian/departamentos/biologia_geologia/eso/1eso.html

Las abejas productoras de miel (*Apis mellifera*) que se han explotado en casi todo el continente del Américas (norte, central y sur) originarias de Europa, fueron introducidas durante el siglo XVII (inicialmente 1622 a Norte Americana). Con estas poblaciones de abejas, se inició en el continente de Europa hace miles y miles de años una selección natural de las diferentes razas y hace unos dos mil años atrás una selección artificial (algunos dicen domesticación). (44)

1.6.1 DIVISIÓN DE TRABAJO

1.6.1.1 La Reina

Es considerada la abeja más importante en la colonia, tiene la función de poner huevos, alrededor de 1 500 diarios y propagar la especie, secretan feromonas especiales que producen en sus glándulas mandibulares y otras glándulas, que son la goma social de la colonia porque consolidan la unión y cohesión de su familia y que controlan ciertos aspectos de la fisiología y comportamiento de las obreras, viven 8 meses en áreas

tropicales y casi 2 años en áreas templadas, normalmente solo hay una reina dentro una colmena pero durante épocas de su reemplazo a veces hay la reina, una o más hijas (reinas vírgenes), y reinas crías dentro las celdas reales. (42)

1.6.1.2 El zángano

Es el macho adulto, es único y su misión es la fecundación de la reina virgen, después de tal actividad muere, él vive menos de un mes y no trabaja dentro la colmena. Existen varios cientos dentro de una colmena, sólo cuando las condiciones (temperatura, clima, recursos de néctar y polen) son buenas. (43)

1.6.1.3 Las obreras

Son las habitantes más pequeñas de la colmena y forman la mayoría de la población, las funciones de una obrera, como su nombre lo indica es la de realizar todos los trabajos en las colmenas, estos trabajos varían con la edad, cuando son jóvenes se ocupan de los panales internos de la colmena, sus funciones son:

- Limpia celdas, la primera tarea es limpiar los panales de la cámara de cría, quitando las escamas y otras suciedades que se encuentran dentro de las celdas.
- Nodrizas, es la que da comida especial, jalea real a la larva de la reina.
- Cereras, fabrican la cera y construyen o reparan los panales según sea necesario.
- Bodegueras, recibe el néctar que traen las forrajeras (pecoreadoras o recolectoras) a la colmena, ellas llevan el néctar a las celdas sobre la cámara de cría en donde se convierten en miel madura normalmente

en pocos días, también almacenan el polen en celdas a lado del de cría.

- Defensora, vigilan en sus piqueras de ingresos a las colmenas para que nadie moleste a las colonias.
- Cuidado de la Reina y para la distribución de las feromonas sociales dentro las colmenas.
- Forrajera (otros nombres pecoreadoras o recolectoras), cuando llega a la edad de 2 a 3 semanas, las obreras empiezan a salir de la colmena para buscar néctar, polen, agua y propóleos y llevan a la colmena estos materiales que la colonia necesita para vivir.

Durante los primeros vuelos ellas aprenden la localización de su colmena para regresar solas a su propia colmena. (35) (42) (44)

1.7 PROPÓLEO

1.7.1 GENERALIDADES

Existe un producto recolectado por las abejas para taponar las rendijas no deseadas de la colmena que está haciéndose cada vez más importante; se trata de una sustancia resinosa exudada de las yemas y escamas de las hojas de ciertas plantas y árboles, conocidas como propóleo. (2)

Cuando aún el hombre no poblaba la tierra, ya las laboriosas abejas trabajaban afanosamente, ya que con ellas la sabia naturaleza había conseguido una de las mayores muestras de organización colectiva y especialización individual, tan perfecta, que no ha sido necesario variarla. Desde la aparición de la abeja (*Apis mellífera*) en la faz de la tierra (hace alrededor de 41 millones de años), han necesitado evolucionar muy poco. (10)

El sabio Aristóteles (384-322, AE) confeccionó una colmena transparente para estudiar la vida de las abejas y éstas se lo impidieron cubriendo las paredes con una sustancia oscura. En sus escritos, cita al propóleo como tratamiento ideal para golpes y magulladuras. Y fueron precisamente los griegos quienes le dieron su nombre: PRO: defensa o delante y POLIS: ciudad, es decir, DEFENSA DE LA CIUDAD DE LAS ABEJAS. (10)

1.7.2 CONCEPTO

El propóleo es un polímero balsámico resinoso que las abejas elaboran a partir de diversas resinas de plantas, el que potencializan con las enzimas producidas por sus glándulas salivales, enriqueciéndolos con los residuos de la digestión láctica de los gránulos de polen. Se encuentra en todas las partes de la colmena en forma de resina oscura principalmente en los bordes y las piqueras. Su aspecto externo es amorfo plástico terroso con color que puede variar de castaño claro a pardo oscuro y penetrante olor resinoso también variable en intensidad. (37)

1.7.3 ORIGEN

Existen dos teorías sobre la procedencia del propóleo elaborado por las abejas.

Una teoría dice que el propóleo es recolectado por abejas de más de quince días que, con sus mandíbulas toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas: álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, pino y algunas herbáceas. (12)

Otra teoría sobre el origen del propóleos manifiesta que se trata de un producto resultante de la digestión del polen y que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el intestino medio. (19)

1.7.4 COMPOSICIÓN

En los análisis realizados a lo largo del tiempo, se han encontrado hasta 180 distintos componentes en los propóleos, procedentes en su mayor parte de las resinas que han recolectado de los vegetales, sobre todo árboles y arbustos. (4)

Las diferencias en la composición están determinadas principalmente por:

- La flora del área ecológica.
- Los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas (floración y fructificación) que condicionan cambios en las concentraciones de las resinas.
- Microorganismos presentes en el entorno geográfico.
- Factores climatológicos. (37)

Básicamente el propóleo está constituido por:

- Resinas y bálsamos, 50-55 %.
- Ceras, 25-35 %.
- Aceites volátiles, 10 %.
- Polen, 5 %.
- Sustancias orgánicas y minerales, 5%. (5)

1.7.5 IMPORTANCIA

Se trata de un producto altamente prometedor, que puede ser un importante ingreso para el apicultor. Dado que este producto es utilizado en apiterapia para la elaboración de un sinnúmero de medicamentos, es imprescindible que el apicultor se esmere para no alterar sus propiedades, no calentándolo y reduciendo el nivel de contaminantes. Una colmena puede producir entre 100 g y 500 g, esto permite recuperar la inversión en la temporada y generar ingresos adicionales. (49)

1.7.6 PAISES PRODUCTORES

- Principales productores: China, Brasil, Argentina, Canadá, Chile, Uruguay y Cuba.
- Principales importadores: Dinamarca, Francia y Alemania.

Brasil, es el segundo productor y exportador mundial con 100 toneladas anuales. (49)

1.7.7 PORQUE LAS ABEJAS LO FABRICAN

El propóleo es transportado por las abejas bajo la forma de pequeñas y brillantes gotitas alojadas en los cestillos del polen. (3)

Las abejas lo utilizan para:

- Tapizar el interior de las celdillas y cámaras de cría, así como para sellarlas evitando su contaminación.
- Reforzar tabiques, paredes y todo aquello que sea inestable.
- Sellar las grietas evitando que se formen corrientes de aire.

- Reducir al mínimo las piqueras de entrada a las colmenas evitando que puedan penetrar depredadores.
- Tapizar las piqueras para evitar que las obreras introduzcan en sus patas entes contaminantes.
- Evitar las vibraciones cuando las colmenas estén ubicadas en sitios expuestos a las corrientes de aire.
- Amortiguar los sonidos intensos a los cuales las abejas son muy sensibles.
- Mantener estable la temperatura de la colmena (alrededor de 30°C).
- Mantener estable el nivel de humedad relativo dentro de la colmena, impidiendo la entrada de agua, evitando la evaporación excesiva, ya que las larvas necesitan para su desarrollo determinado grado de humedad.
- Momificar y aislar los cadáveres de aquellos enemigos que hayan entrado en la colmena y por sus dimensiones les sea imposible expulsar. (37)

1.7.8 VENTAJAS

- Bajo costo.
- Fácil manejo.
- Conservación simple.
- Producción acorde a la vegetación.
- Excelente rentabilidad.

1.7.9 MÉTODOS DE COSECHA

1.7.9.1 Método Artesanal o Método de Raspado



FOTOGRAFÍA No. 2. RECOLECCIÓN DE PROPÓLEO POR EL MÉTODO DE RASPADO.

FUENTE: <http://www.mujerapicola.org/docs/TEXON1.pdf>

Es un método de fácil recolección, se lo realiza al raspar las partes de la colmena con una espátula metálica, es conveniente tener en cuenta la ubicación del propóleo en la colmena, así tenemos el propóleo de piquera, a pesar de su fácil obtención y acceso, es un propóleo que ha perdido parte de sus propiedades por la presencia de muchas impurezas, ya que al estar expuesto al medio ambiente, la acción del aire y el sol produce oxidaciones que disminuyen su calidad, mientras que el propóleo de techo suele estar acompañado de mucha cera y el propóleo de piso, contiene demasiadas impurezas. (49)

1.7.9.2 Método Técnico

1. Mallas de Tejido Mosquitero Plástico



FOTOGRAFÍA No. 3. RECOLECCIÓN DE PROPÓLEO POR EL MÉTODO DE MALLA DE TEDILO MOSQUITERO PLÁSTICO.

FUENTE: <http://www.mujerapicola.org/docs/TEXON1.pdf>

2. Mallas Matrizadas



FOTOGRAFÍA No. 4. RECOLECCIÓN DE PROPÓLEO POR EL MÉTODO DE MALLAS MATRIZADAS.

FUENTE: <http://www.mujerapicola.org/docs/TEXON1.pdf>

Este tipo de trampas presenta mallas de diferentes procedencias (brasileñas, alemanas y otras), este método consiste en colocar la malla en la parte superior de la colmena y dejar por un determinado tiempo aproximadamente 3 meses hasta su posterior recolección de forma manual. (49)

1.7.10 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

Entre las principales propiedades terapéuticas tenemos:

- Propiedad Antibacteriana.
- Propiedad Antiviral.
- Propiedades Antioxidantes.
- Propiedad Antimicótica.
- Propiedades Antiparasitarias.
- Propiedades Anticolesterolémicas e Hipotensoras.
- Propiedades Antiinflamatorias.
- Propiedades Antialérgicas.

- Propiedades Anestésicas y Analgésicas. (37)

1.7.11 PRODUCTOS DERIVADOS DEL PROPÓLEO

- Solución de Propóleo.
- Pastillas de Propóleo.
- Ungüento de Propóleo.
- Gel de Propóleo.
- Jabón de Propóleo.
- Miel con Propóleo.
- Crema de belleza.
- Crema Bioregeneradora con Jalea y Propóleo. (47)

1.7.12 CONTROL DE LA CALIDAD

Es éste un punto básico para garantizar la efectividad de las soluciones obtenidas y está normado internacionalmente. Nos basamos en la norma de la URSS: RST RSFSR 317-77 y aunque no la describiremos en su totalidad tenemos:

- Requisitos técnicos: Índices organolépticos, aspecto externo, color, sabor, olor, estructura y consistencia.
- Índices fisicoquímicos: El contenido de cera no debe exceder el 30%. La cantidad de cera presente será inversamente proporcional al contenido de principios activos.
- Contenido de mezclas mecánicas: No debe exceder el 20%, por las mismas razones señaladas para la cera

- Contenido de compuestos fenólicos: No debe ser menor del 30%, considerando que éstos son uno de los principales determinantes de las propiedades antibacterianas.
- Índice de oxidación: No debe ser mayor de 22 segundos. Nos indica la capacidad de los propóleos de fijar oxígeno.
- Número yódico: No menor de 35. Determina la actividad biológica de los propóleos.
- Reacción ante los compuestos flavonoides: Cualitativamente debe ser positiva. Determina la presencia de flavonoides que darán actividad biológica. (37)

La aplicación de estas normas, nos garantizará el determinar la calidad de los propóleos empleados y planificar la concentración de las soluciones obtenidas a partir de ellos. De acuerdo a estos parámetros, los propóleos se agruparán en varias calidades, de diverso valor económico y terapéutico. (47)

1.7.13 TOXICIDAD

En la amplia literatura mundial, hasta el presente estudiada por nosotros, no se encuentran datos de toxicidad provocada por propóleos, a pesar de que muchos autores emplearon dosis relativamente altas para su aplicación. (5)

Kivalkina reporta un estudio, después mencionado por Okonento, donde se apreciaron cambios morfológicos en órganos de animales tratados con sobredosis de propóleos. Estas alteraciones fueron: adiposis hepática, infiltración glomerular en el riñón, hiperplasia de la sustancia blanca en el páncreas e infiltración de la pared alveolar en el pulmón, detectadas después de la administración oral y no se observaron por la inyección intraperitoneal. Toda vez que el vehículo empleado para su

administración fue alcohólico, no consideramos que se pueda precisar con certeza que haya sido precisamente el propóleo el agente causante de estos trastornos. (5) (37)

Esto nos lleva a comprender la necesidad de un estudio más profundo de la relativa toxicidad que presentasen los propóleos cubanos. Con este fin, Castillo, B. y col, realizaron las pruebas con grupos independientes de ratones a los que se aplicó dosis progresivas por vía oral, subcutánea, intramuscular y endovenosa en esquemas agudos y subcrónicos. La dosis máxima estudiada correspondió a 25 mg/g PC: El estudio del perfil bioquímico hasta un mes posterior a los tratamientos, indica que no hay afectaciones orgánicas, lo que fue corroborado por estudios anatomopatológicos. Se trabajó en todos los experimentos con solventes no alcohólicos. (37) (47)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

Los análisis realizados en esta investigación se llevaron a cabo en las instalaciones del Área de Producción de la Empresa APICARE CIA. LTDA., y en los siguientes laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:

- Laboratorio de Bromatología (Facultad de Ciencias).
- Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología (Facultad de Ciencias Pecuarias).
- Laboratorio de Productos Naturales (Facultad de Ciencias).
- Laboratorio de Química Instrumental (Facultad de Ciencias).

2.2 MUESTRAS, MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MUESTRAS

Las muestras de material analizado (propóleo) que se usaron en la presente investigación están detalladas en la TABLA No.1.

TABLA No.1. MUESTRAS DE PROPÓLEOS ANALIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN, RECOGIDAS EN LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y GUAYAS. JUNIO DE 2013.

ZONAS APÍCOLA	CARACTERÍSTICAS	MÉTODO RECOLECCIÓN	VEGETACIÓN
Socorro	Esta zona se encuentra ubicada al noreste de la Provincia de Chimborazo, presenta una altitud que va entre 2 500 y 5 524 m.s.n.m		RESINOSA: <i>Eucalyptus melliodora.</i> <i>Persea Americana.</i> <i>Pinus pinea.</i> <i>Prunus salicifolia.</i> NO

y una temperatura que oscila entre 13 a 15 °C.	Raspado. Consiste en raspar con una espátula o cualquier otra herramienta con corte, todas las partes de la colmena donde las abejas han depositado propóleo. Los cuadros son raspados uno por uno, separando con cuidado la preciada sustancia de la madera. Las tapas, las paredes de la colmena, los cubre panales, también se procede de igual forma. (49)	RESINOSA: <i>Malva sylvestris</i> L. <i>Cyphomandra betacea.</i> <i>Solanum tuberosum.</i> <i>Brugmansia arbórea.</i> <i>Zea mays</i> L. <i>Baccharis latifolia.</i> <i>Fourcroya velutinovaria.</i> <i>Agave andina.</i> <i>Ruta graveolens</i> L. <i>Prunus pérsica.</i>
--	--	---

Nitiluisa

Zona ubicada al oeste de la Provincia de Chimborazo, presenta una altitud promedio de 3 056 m.s.n.m y una temperatura entre 12 a 16 °C.

RESINOSA:

Eucalyptus melliodora.
Pinus pinea.
Prunus salicifolia.

NO

RESINOSA:

Medicago sativa.
Fourcroya mercadilla.
Chenopodium quinoa.
Lupinus polyphyllus.

Chambo	Zona presente al noroeste de la Provincia de Chimborazo, con una altitud entre 2 400 y 4 730 m.s.n.m y una temperatura promedio de 14 °C.	Raspado. Consiste en raspar con una espátula o cualquier otra herramienta con corte, todas las partes de la colmena donde las abejas han depositado propóleo. Los cuadros son raspados uno por uno, separando con cuidado la preciada sustancia de la madera. Las tapas, las paredes de la colmena, los cubre panales, también se procede de igual forma. (49)	RESINOSA: <i>Alnus glutinosa.</i> <i>Eucalyptus melliodora.</i> <i>Pinus pinea.</i> NO RESINOSA: <i>Trifolium pretense.</i> <i>Rubus ulmifolius.</i> <i>Taraxacum officinale.</i> <i>Brassica rapa L.</i> <i>Lupinus polyphyllus</i> <i>Verbena officinalis.</i> <i>Passiflora tarminiana.</i> <i>Cyphomandra betacea.</i>
Virgen de Fátima	Se encuentra ubicada al este de Guayaquil, en el Km 26 de la carretera Durán – Tambo, presenta una altitud promedio de 17 m.s.n.m, y una temperatura entre 22 y 25 °C.	RESINOSA: <i>Cocos nucifera</i> <i>Laurus nobilis</i> <i>Mangifera indica</i> <i>Quercus robur</i> <i>Tectona grandis</i> NO RESINOSA: <i>Zea mays</i> <i>Rosa gallica</i> <i>Ocimum basilicum</i> <i>Quercus petraea</i> <i>Laurus nobilis</i> <i>Tectona grandis</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Mangifera indica</i> <i>L</i>	

2.2.2 MATERIALES

- Frascos de vidrio ámbar.
- Frascos de plástico estériles.
- Papel Filtro.
- Papel de Aluminio.
- Goteros.
- Pizeta.
- Reverbero.
- Gradilla.
- Cronómetro.
- Balones aforados de 50, 100 y 250 mL.
- Placas de vidrio.
- Vidrio Reloj.
- Mortero con pistilo.
- Varilla de agitación.
- Cubeta de vidrio de recorrido óptico.
- Trípode.
- Cápsulas.
- Mangueras.
- Puntas plásticas para pipetas.
- Pinzas para bureta.
- Pinzas universales.
- Pinzas para tubo.
- Bureta de 25 y 50 mL.
- Matraz de 50, 100 y 250 mL.
- Probetas de 10, 50 y 100 mL.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL.
- Embudo de vidrio.
- Picnómetro de 10 mL.
- Micropipeta automática de 500 y 1 000 μ L.
- Espátula.
- Soporte universal.
- Termómetro.
- Cuchillo.
- Vasos de Precipitación de 50, 100, 150, 250, 500 y 1 000 mL.
- Tubos de ensayo.
- Olla de acero.
- Bolsas de hielo.

- Pera de succión.
- Aspersor de vidrio.
- Cuba de vidrio.

2.2.3 EQUIPOS

- Balanza Analítica (ADAM Y BOECO).
- Mufla (VULCAN Y SNOL).
- Refractómetro (BAUSCH Y LOMB).
- Refrigeradora (DUREX).
- Estufa (MEMMERT).
- Cámara fotográfica (SONY).
- pH metro (HANNA INSTRUMENT Y HANNA WATERPROOF).
- Espectrofotómetro (PERKIN ELMER LAMDA EZ 201 Y HELYOS β).
- Extractora de gases (MEMMERT).
- Centrífuga (CLAY ADAMS).

2.2.4 REACTIVOS

- Acetato de plomo al 10 %
- Acetato de sodio anhidro
- Ácido ascórbico (Vitamina C)
- Acetato de etilo.
- Alcohol amílico
- Buffer Acetato de sodio/ácido acético pH 7
- Catecol (Dihidroxibenceno) 0,5 M
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Etanol al 85 %
- Nitrito de Sodio al 5 %
- Óxido de aluminio
- Polifenoloxidasas (PPO de Pulpa de manzana)
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Solución de almidón al 5 %
- Yoduro de potasio al 10 %
- Ácido gálico
- Nitrato de plata 0,1 M
- Agua destilada
- Acetona
- Ácido acético glacial
- Ácido Nítrico
- Ácido clorhídrico 0,05 N, 6,34 N y al 10 %
- Ácido fórmico.
- Ácido sulfúrico al 20 % y concentrado.
- Anhídrido acético.
- Sulfito de Sodio 0,1 N
- Carbonato de sodio al 20 %
- Cloroformo
- Hidróxido de sodio 0,05 N, 5 N, 1 M, al 20 y al 5 %
- Tricloruro de Aluminio al 10 %
- Tricloruro Férrico al 5 %
- Permanganato de Potasio 0,1 N
- Quercetina
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Baljet
- Sílica gel 60 HF₂₅₄
- Reactivo de Hannus

2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL PROPÓLEO

La determinación de los parámetros de calidad de los propóleos de las diferentes zonas apícolas se realizó en base a la Norma Rusa RTS-

RSFSR-317-77 (34) y mediante la misma se realizó las siguientes determinaciones:

2.3.1.1 Características Organolépticas (Sensoriales).

2.3.1.2 Contenido de Cera.

2.3.1.3 Porcentaje de Impurezas Mecánicas.

2.3.1.4 Compuestos Fenólicos.

2.3.1.5 Índice de Oxidación.

2.3.1.6 Flavonoides (Cualitativa).

2.3.1.7 Índice de Yodo.

2.3.2 CONTROL DE CALIDAD DEL PROPÓLEO COMO DROGAS SECAS

El control de calidad de los propóleos de las diferentes zonas apícolas se realizó en base a las Normas Ramales. Drogas crudas y Extractos y tinturas. NRSP 312. MINSAP 1992 (20) y mediante la misma se realizó las siguientes determinaciones:

2.3.2.1 Humedad.

2.3.2.2 Cenizas Totales (Método de Incineración en Mufla).

2.3.2.3 Cenizas Solubles en Agua.

2.3.2.4 Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.

2.3.3 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

- Para la elaboración de los extracto se utilizó el proceso de maceración de las muestras, para ello se procedió a pesar 10 g de cada muestra y se añadieron 100 mL de etanol al 85 % (extracto al 10 % en p/v).
- Estos extractos se dejaron en reposo en ausencia de luz y con agitación diaria por el lapso de 15 días.
- Se filtraron los extractos y se guardaron en frascos ámbar para protegerlos de la acción de la luz.

2.3.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

El control de calidad de los extractos etanólicos de las diferentes zonas apícolas se realizó en base a las Normas Ramales. Drogas crudas y Extractos y tinturas. NRSP 313. MINSAP 1992. (21) (22) y mediante la misma se realizó las siguientes determinaciones:

2.3.4.1 Requisitos Organolépticos de los extractos etanólicos.

2.3.4.2 pH.

2.3.4.3 Índice de Refracción.

2.3.4.4 Densidad Relativa.

2.3.4.5 Sólidos Totales.

2.3.4.6 Tamizaje Fitoquímico

Las pruebas destinadas a la determinación de metabolitos presentes en el extracto alcohólico se presentan en la TABLA No. 2.

TABLA No. 2. TÉCNICAS PARA EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

Ensayo	Metabolito	Procedimiento	Resultado
Dragendorff	Alcaloides.	Si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, éste debe evaporarse, en un baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo.	Si hay opalescencia se considera (+) turbidez definida (++) , precipitado (+++).
Wagner y Mayer		Se parte de igual manera en los casos anteriores de la solución acida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo.	
Baljet	Lactonas.	Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1mL de reactivo.	La aparición de una coloración roja (++) o precipitado rojo (+++).
Borntreger	Quinonas.	Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1mL de cloroformo. Se adiciona 1mL hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su	Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado o rojo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

		ulterior separación.	
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides.	Se adiciona 1mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.	1. Rosado 2. Verde intenso-visible 3. Verde oscuro-negro
Catequinas	Catequinas	Tome una gota de la fracción alcohólica, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio.	Verde carmelita a la luz UV.
Fehling	Azúcares Reductores.	Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 min la mezcla.	Solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.
Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos y/o taninos.	Si el extracto es acuoso se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica a una alícuota del extracto alcohólico se adiciona el reactivo.	Coloración rojo-vino, verde intenso, azul.
Shinoda	Flavonoides.	Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.	Cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.
Antocianidinas	Estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides.	Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases.	La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica.
Resinas	Resinas.	Adicione a 2mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada.	Precipitado.

Espuma	Saponinas.	Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5–10 min.	Si aparece espuma en la superficie del líquido.
---------------	------------	---	---

2.3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

2.3.5.1 Análisis Cromatográfico del marcador químico para Flavonoides Totales expresados como porcentaje de Quercetina (TLC).

1. Fundamento

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte con 2 fases, la fase móvil es líquida y la fase estacionaria en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. (8)

2. Condiciones

- Fase estacionaria: Sílica gel 60 HF 254.

- Fase móvil: Cloroformo - acetona - ácido fórmico (75:16,5:8,5 en v/v) en relación a 30 mL.
- Revelador: Vainillina al 1 % y ácido sulfúrico al 10 % con calor.

3. Cálculos

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por los solventes}}$$

2.3.5.2 Cuantificación de Flavonoides Totales (Método del AlCl₃)

1. Fundamento

El AlCl₃ anhidro forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados en medio básico. Estos quelatos presentan una coloración rosada indicando la presencia de flavonoides. Los valores de flavonoides totales son expresados en valores de mg del flavonoide empleado como estándar equivalente por gramo de muestra. (31)

2. Procedimiento

- Se realizó el ensayo en los extractos siguiendo el siguiente esquema:

TABLA No. 3. ESQUEMA DE REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES POR EL MÉTODO DEL AlCl₃.

Reactivos		Volumen (µL)
Muestras (Extractos de Propóleo por zonas)	Socorro	500
	Nitiluisa	
	Chambo	
	Virgen de Fátima	
Agua		400
NaNO ₂ al 5 %		38

Reposo cerrado a Temperatura ambiente por 5 minutos.	
AlCl ₃ al 10 %	38
Reposo cerrado a Temperatura ambiente por 6 minutos.	
NaOH 1 M	250
Agua	24

- La absorbancia de la reacción fue medida a una longitud de onda de 510 nm.

3. Cálculos

La concentración de flavonoides totales fue establecida mediante una curva de calibración de rutina a concentraciones que fueron desde 20 a 100 ppm, aplicando el mismo esquema de preparación de las muestras (ANEXO No. 3). Se determinó la ecuación de la recta para la curva de calibración en base al estándar de rutina preparado a diferentes concentraciones medidas a 510 nm y obteniendo la siguiente ecuación para la recta:

TABLA No. 4. ECUACIÓN DE LA RECTA OBTENIDA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DE RUTINA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES.

Concentración de Rutina (ppm)	Ecuación de la Recta	R²	R
20 - 100	$y = 0,0017x - 0,387$ 6	0,994	0,9969

2.3.5.3 Cuantificación de Compuestos Fenólicos (Micrométodo de Folin-Ciocalteu)

1. Fundamento

Los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y el ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reduce por oxidación de los fenoles, originando óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes, y posee una absorción máxima a 765 nm. (31)

2. Procedimiento

- Se realizó el ensayo en los extractos siguiendo el siguiente esquema:

TABLA No. 5. ESQUEMA DE REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR EL MICROMÉTODO DE FOLIN-CIOCALTAEU.

Muestras	Zonas Apícola	Extracto	Agua	Folin-Ciocalteu	Carbonato de Sodio al 20 %
Volumen (μL)					
Propóleo	Socorro	100			
	Nitiluisa	100			
	Chambo	100	5 000	500	2 000
	Virgen de Fátima	100			

- Se aforó a 10 mL con agua destilada y se dejó en reposo por 30 minutos, en oscuridad.
- Se realizó la lectura de la absorbancia a 765 nm.

3. Cálculos

La concentración de Compuestos Fenólicos Totales se determinó mediante la elaboración de una curva de calibración usando el ácido

gálico como estándar de referencia, se prepararon soluciones en concentraciones de 500, 800, 1 100 y 1 400, 1 700 y 2 000 ppm y se aplicó el mismo esquema que en la preparación de las muestras (ANEXO No. 4). Se determinó la ecuación de la recta para la curva de calibración en base al estándar de ácido gálico preparado a diferentes concentraciones medidas a 765 nm y obteniendo las siguientes ecuaciones para la recta:

TABLA No. 6. ECUACIÓN DE LA RECTA OBTENIDA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.

Concentración de ácido Gálico (ppm)	Ecuación de la Recta	R²	R
500 – 2 000	$y = 0,0008x + 0,1921$	0,9982	0,9991

2.3.5.4 Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el Método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidasas

1. Fundamento

Los métodos disponibles para determinar la susceptibilidad de pardeamiento son la espectrometría de absorción o métodos de reflectancia. Las técnicas de absorción involucran la medida espectrofotométrica sobre soluciones obtenidas después de separar los tejidos y remover los sólidos. Tales medidas estiman los pigmentos solubles y suelen estar presentes cerca de 400 nm, correspondientes a la absorción máxima del Catecol. La medida de los pigmentos polimerizados y solubles unidos a membranas puede ser evaluada por medidas de reflectancia sobre la fracción insoluble. (9)

2. Procedimiento

a. BÚFFER

- Se preparó el búffer de acetato de sodio/ácido acético glacial a un pH 7, las 2 soluciones de acetato de sodio y ácido acético se prepararon por separado a una concentración de 0,2 M.
- **ÁCIDO ACÉTICO 0,2 M (Solución A):** Se aforó 11,55 mL de ácido acético (CH_3COOH) hasta 1 L con agua destilada.
- **ACETATO DE SODIO 0,2 M (Solución B):** Se diluyó 16,41 g de acetato de sodio anhidro (CH_3COONa) en 1 L de agua destilada.
- Se mezclaron las 2 soluciones y se aforaron a 100 mL con agua destilada para obtener el pH de 7 en base al siguiente esquema:

TABLA No. 7. ESQUEMA PARA LA ELABORACIÓN DEL BÚFFER ACETATO DE SODIO/ÁCIDO ACÉTICO A pH 7.

mL Solución A	mL Solución B	pH
1	175	7

- El búffer se mantuvo en refrigeración a una temperatura de $-6\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

b. SUSTRATO

- Se usó como sustrato una solución de catecol 0,5 M preparado en el búffer, pesando exactamente 0,275 2 g de catecol ($\text{PM} = 110,06\text{ g/mol}$).
- Se diluyó en 5 mL de búffer acetato de sodio/ácido acético, cantidad que es suficiente para los ensayos.

- Cabe destacar que el catecol se preparó para cada análisis ya que se degrada fácilmente con la luz y el oxígeno del aire.

c. EXTRACTO ENZIMÁTICO

- Se extrajo 10 g de pulpa de manzana, variedad chilena (Red Delicious), mantenida en refrigeración de 4 a 14 °C.
- Se homogenizó los 10 g de pulpa en 20 mL de búffer acetato de sodio/ácido acético frío, dentro de un mortero colocado en baño de hielo.
- Se filtró en un embudo frío con algodón y se recolectó el extracto enzimático en tubos de ensayo fríos.
- Se guardó el extracto enzimático en congelación a -6 °C hasta su utilización.
- Y se descongeló el extracto enzimático en baño de hielos para su utilización.

d. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA POLIFENOLOXIDASA

- En una celda de cuarzo limpia y seca se agregaron 2 400 µL del búffer preparado.
- Se añadió 300 µL de la solución de catecol.
- Además se añadió 300 µL del extracto enzimático descongelado en baño de hielo, mezclamos e inmediatamente se introdujo en el espectrofotómetro para medir el aumento en la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm por 4 minutos en intervalos de 30 segundos.

- Este proceso se repitió al minuto, a los 10 minutos, 30 minutos y 2 horas.
- Se calculó la actividad de la enzima con base a la pendiente de la proporción lineal de la curva absorbancia vs tiempo.

e. MUESTRAS A ENSAYAR

- Las muestras se prepararon a 3 diferentes concentraciones 10 000 ppm, 1 000 ppm y 100 ppm, de modo que al ser agregadas las otras soluciones las concentraciones finales fueron de 1 000, 100 y 10 ppm.
- Se pesó 0,05 g de extracto (muestra) en un balón de aforo de 10 mL limpio y seco y se diluyó con 5 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), dando como resultado una solución de concentración a 10 000 ppm.
- Se realizaron diluciones decimales para obtener concentraciones de 1 000 y 100 ppm con el búffer.

f. ANTIOXIDANTE ESTÁNDAR (VITAMINA C)

- Se usó la vitamina C como agente antioxidante positivo preparada a las mismas concentraciones que las muestras a ensayar (10 000, 1 000 y 100 ppm).
- Se diluyó 0,05 g de vitamina C en 5 mL de búffer obteniendo la solución a 10 000 ppm, se realizaron diluciones decimales para obtener concentraciones a 1 000 y 100 ppm.

g. MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

- Se aplicó el siguiente esquema para medir la capacidad antioxidante presentes en la TABLA No. 8.

TABLA No. 8. ESQUEMA PARA EL ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

Muestras	Blanco	1 000 ppm	100 ppm	10 ppm	Vitamina C
Reactivos	Volumen (mL)				
Búffer	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Sustrato	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Muestra	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3*
Extracto Enzimático	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

*SE DEBE USAR 0,3 ML DE DMSO EN EL ESTÁNDAR DE VITAMINA C.

- Se encendió el espectrofotómetro UV con el búffer acetato.
- La adición del búffer, el sustrato, la muestra y las enzimas se realizó en un balón de 10 mL, la reacción se dio inicio mediante la adición del extracto enzimático y se comenzó a leer inmediatamente la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.
- Se anotó las lecturas de la absorbancia cada 30 segundos desde el comienzo del ensayo hasta que hayan transcurrido 120 segundos obteniéndose 4 lecturas de absorbancia.
- Se leyó primero el blanco, luego las diluciones de las muestras desde la menor a la mayor concentración, finalmente la vitamina C como testigo positivo.
- Se repitió este procedimiento por 3 ocasiones en cada muestra en ensayo.
- Se consideró como inhibición nula la absorbancia correspondiente al blanco, en el que las enzimas actuaron libremente sobre el Catecol. Asimismo, se tomó como inhibición absoluta la que presenta la cubeta con el antioxidante de poder previamente probado.
- El porcentaje de inhibición se determinó relacionando la lectura del blanco con la lectura de cada uno de los extractos.

3. Cálculos

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = \frac{\Delta A_{420 \text{ nm BLANCO}} - \Delta A_{420 \text{ nm MUESTRA}}}{\Delta A_{420 \text{ nm BLANCO}}} \times 100$$

Siendo:

$\Delta A_{420 \text{ nm}}$ = Diferencia entre la absorbancia final e inicial a 420 nm.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación una vez culminado con los análisis correspondientes se determinó la caracterización y actividad antioxidante

de los propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo, utilizados como materia prima para elaboración de diferentes productos en la empresa APICARE CIA. LTDA., de la ciudad de Riobamba, para lo cual se obtuvo resultados mediante el promedio de tres mediciones para realizar un análisis estadístico confiable y garantizar que los resultados son valederos.

3.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO DE LAS DIFERENTES ZONAS APÍCOLAS

3.1.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS (NORMA RUSA RTS-RSFSR-317-77)

Para este análisis las muestras fueron recogidas de cuatro zonas apícolas como Socorro, Nitiluisa, Chambo y Virgen de Fátima, las cuales son utilizadas como materia prima en la elaboración de diferentes productos en la empresa APICARE CIA. LTDA., y cuyos resultados se muestran en el siguiente cuadro:

CUADRO No. 1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DETERMINADAS PARA LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO EN BASE A LA NORMA RUSA RTS-RSFSR-317-77. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.

Parámetros					
Zonas Apícolas	Aspecto Externo	Color	Olor	Sabor	Estructura
Socorro	Briquetas	Pardo oscuro	Aromático, Resinoso.	Amargo fuerte	Espesa, sólida con deformaciones
Nitiluisa	Briquetas	Pardo oscuro	Aromático,	Amargo	Espesa, sólida con

			Resinoso.	fuerte	deformaciones	
Chambo	Pelotas	Pardo oscuro	Aromático, Resinoso.	Amargo fuerte	Sólida deformaciones	con
Virgen de Fátima	Briquetas	Negro	Aromático, Resinoso.	Amargo fuerte	Espesa, deformaciones	con

De acuerdo a la información presentada en el CUADRO No. 1 los propóleos utilizados en el empresa APICARE CIA. LTDA., cumplen con los requisitos organolépticos establecidos por la Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77. (34) (37)

El propóleo de las cuatro zonas: Socorro, Nitiluisa, Chambo y Virgen de Fátima presentó un aspecto externo en forma de briquetas debido al método de recolección, ya que al ser raspado con una espátula de acero toma este aspecto, a excepción de la zona de Chambo que presentó un aspecto externo en forma de pelotas a causa de una previa recolección y almacenamiento, razón por la cual tomó esa forma. (15) (49)

Las muestras correspondientes a las zonas de Socorro, Nitiluisa y Chambo presentaron una coloración pardo oscura, mientras que la muestra de la zona Virgen de Fátima presentó una colación negro similar a lo reportado por Lozina, L. et al. (2009) en Argentina. (15)

Todas las zonas indicaron un olor aromático característico a las resinas de su vegetación y un sabor amargo, fuerte, similar a un estudio realizado por López, S. et al. (2003) con un olor 100 % resinoso aromático y un sabor amargo para un propóleo de Argentina. (27)

La estructura que presentaron fue espesa, sólida con deformaciones heterogéneas para las zonas de Socorro y Nitiluisa, mientras que la zona de Chambo presentó una estructura sólida con deformaciones heterogéneas y por último la zona de Virgen de Fátima presentó una estructura espesa con deformaciones heterogéneas, todos estos aspectos

dependen del tiempo de recolección es decir que en un día soleado tendremos propóleos más espesos y mientras que en un día frío o lluvioso el propóleo se presentará más sólido y quebradizo.

Se realizó una comparación microscópica entre las muestras de propóleo de las cuatro zonas apícolas (ANEXO No. 13).

3.1.2 ESPECIFICACIONES FÍSICO - QUÍMICAS (NORMA RUSA RTS-RSFSR-317-77)

Los resultados obtenidos para las especificaciones físicas y químicas de las muestras de Propóleo de las diferentes zonas apícolas en base a la norma Rusa RTS-RSFSR-317-77 se indican en el siguiente cuadro:

CUADRO No. 2. ESPECIFICACIONES FÍSICO-QUÍMICAS DETERMINADAS EN EL PROPÓLEO EN BASE A LA NORMA RUSA RTS-RSFSR-317-77 E IRAM 15.935-1: 2008. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

Parámetros	Resultado				Especificación		
	Socorro	Nitiluisa	Chambo	Virgen de Fátima	Rusia	Brasil	IRAM
Cera (%)	28,62	35,26	14,47	32,75	≤ 30 %	≤ 25 %	<35 %
Impurezas mecánicas (%)	58,67	66,97	67,02	66,24	≤ 20 %	≤ 40 %	<25 %
Compuestos fenólicos (%)	80,29	74,05	74,25	78,62	≥ 30 %	≥ 5 %	> 5%
Índice de oxidación (s)	123	133	133	122	≤ 22 s	≤ 22 s	-
Reacción cualitativa para flavonoides	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	-
Índice de Yodo (%)	88,70	27,80	18,68	27,91	≥ 35 %	-	-

* FUENTE: NORMA RUSA RTS-RSFSR-317-77.
 * FUENTE: Norma IRAM 15.935-1: 2008.

En el CUADRO No. 2 se evidencian los resultados obtenidos para las especificaciones Físico-Químicas del propóleo de las cuatro zonas apícolas con la aplicación de la Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77 y representados en los gráficos correspondientes a cada uno de los análisis realizados. (34) (37)

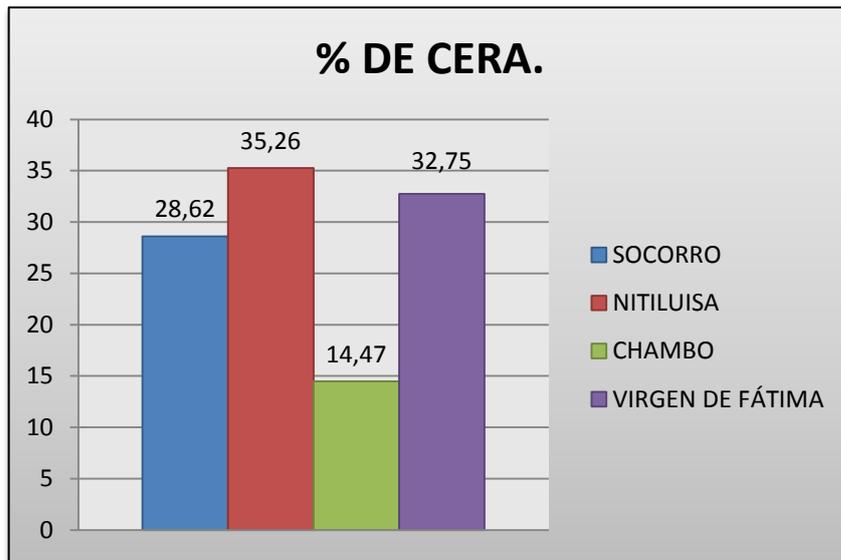


GRÁFICO No. 1. DETERMINACIÓN DEL % DE CERA PRESENTES EN PROPÓLEOS DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

Los resultados presentados fueron:

Las zonas de Socorro y Chambo cumplen con la Norma Rusa, presentando porcentajes de cera menores al 30 %, mientras que las zonas de Socorro, Chambo y Virgen de Fátima cumplen con la Norma IRAM presentando porcentajes inferiores al 35 % y la zona de Chambo fue la única que cumplió con la Norma de Brasil presentando 14,47 % de cera, este parámetro está relacionado con la forma de recolección de propóleo, ya que estas muestras al ser recolectados por el método de raspado se evita el contacto directo con la cera como sucede en el método de

recolección por mallas, es por esta razón que las muestras de las cuatro zonas presentan bajos porcentajes de cera. (34) (37)

Los valores que presentan las zonas de Nitiluisa y Virgen de Fátima son superiores al porcentaje expresado por Vázquez, J. (2010) de 27,52 % en propóleos de Argentina; mientras que las cuatro zonas presentan porcentajes inferiores que el determinado por Álvarez, S. (2012) de 63 % en propóleos del Perú y con respecto a los estudios por Maldonado, L. de 22,09 % de cera, únicamente la zona de Chambo presenta un porcentaje menor a este. (7) (42)

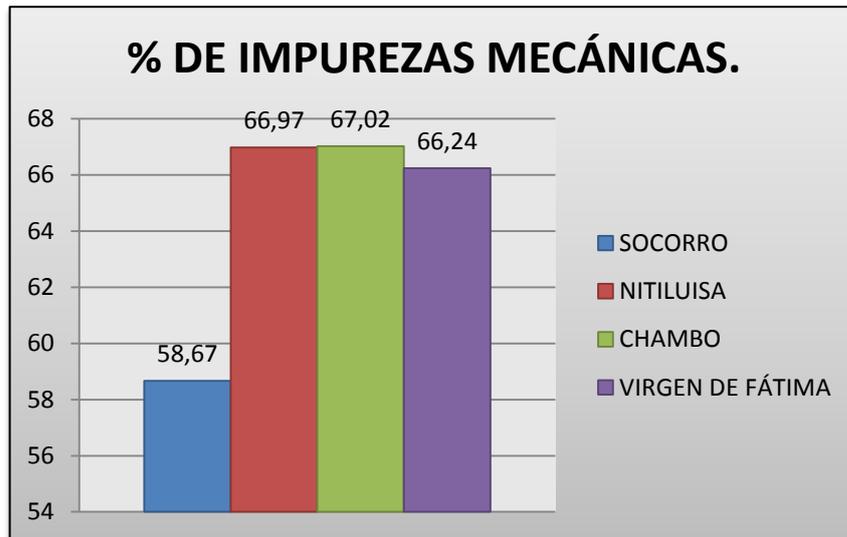


GRÁFICO No. 2. DETERMINACIÓN DEL % DE IMPUREZAS MECÁNICAS PRESENTES EN PROPÓLEOS DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

Los porcentajes de impurezas mecánicas presentados por las cuatro zonas apícolas son superiores a los reportados por las Normas de especificación como son la Norma Rusa ≤ 20 %, Norma de Brasil ≤ 40 % y la Norma de IRAM < 25 % lo cual nos indica que sus valores no cumplen con estas Normas, debido al método de recolección por raspado en donde existe una incorporación al producto de distintos tipos de impurezas

como: astillas de madera, cera, partes de abejas, restos vegetales, entre otras, que en algunos casos se pueden separar del propóleo y en otros casos quedan incorporadas, disminuyendo la calidad del mismo. (34) (37)

La muestra de la zona de Socorro fue la que presentó un menor porcentaje de impurezas mecánicas, esto se debe a que hubo una mejor asepsia el momento de su recolección.

Al comparar con otros estudios realizados, los valores de las cuatro zonas apícolas son superiores a los realizados por Vázquez, J. (2010) de 4,61 % y de Lozina, L. et al. (2009) de 39,80 % en Argentina y la zona de Socorro fue la única inferior en porcentaje a estudios realizados por Álvarez, S. (2012) de 62 % en el Perú. (7) (15)

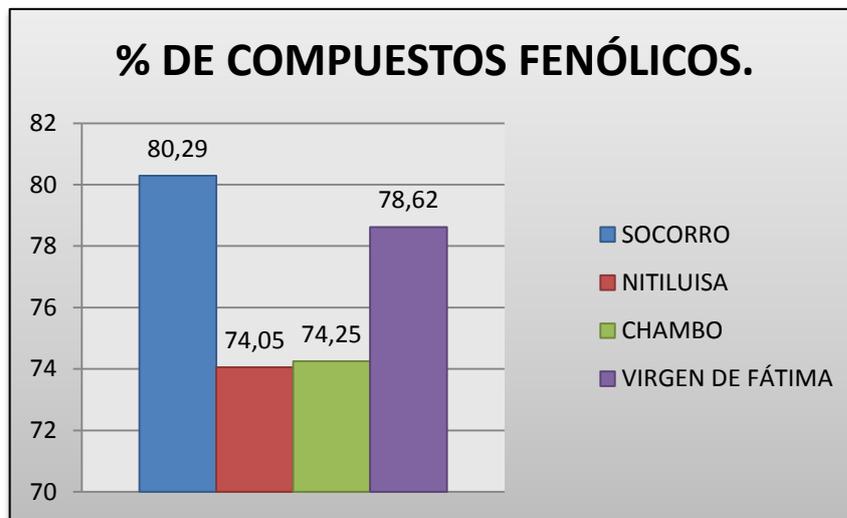


GRÁFICO No.3. DETERMINACIÓN DEL % DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN PROPÓLEOS DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

Los compuestos fenólicos se relacionan con varias de las actividades biológicas del propóleo de ahí la importancia de su cuantificación, los porcentajes que presentaron las zonas apícolas de investigación fueron: el Socorro 58,67 %, Nitiluisa 66,97 %, Chambo 67,02% y Virgen de Fátima

66,24 %, porcentajes que si cumplen y se encuentran elevados con respecto a las tres Normas de especificación, esto se puede deber a la vegetación que presentan las zonas de recolección, ya que el Ecuador se caracteriza por tener una amplia gama de plantas y una variedad climática. (34) (37)

Al realizar una comparación con otros estudios de propóleos como el de Maldonado, L. de 17,76 % y Vázquez, J. (2010) de 17,21 % en propóleos Argentinos, las cuatro zonas presentaron un porcentaje que supera ampliamente a estos resultados, en cambio que solo las zonas de Socorro y Virgen de Fátima son superiores al 75,22 % determinado en propóleos Colombianos por Palomino, L. (2009), esto se pude deber a la gran variedad de vegetación que presentan estas cuatro zonas apícolas. (42)

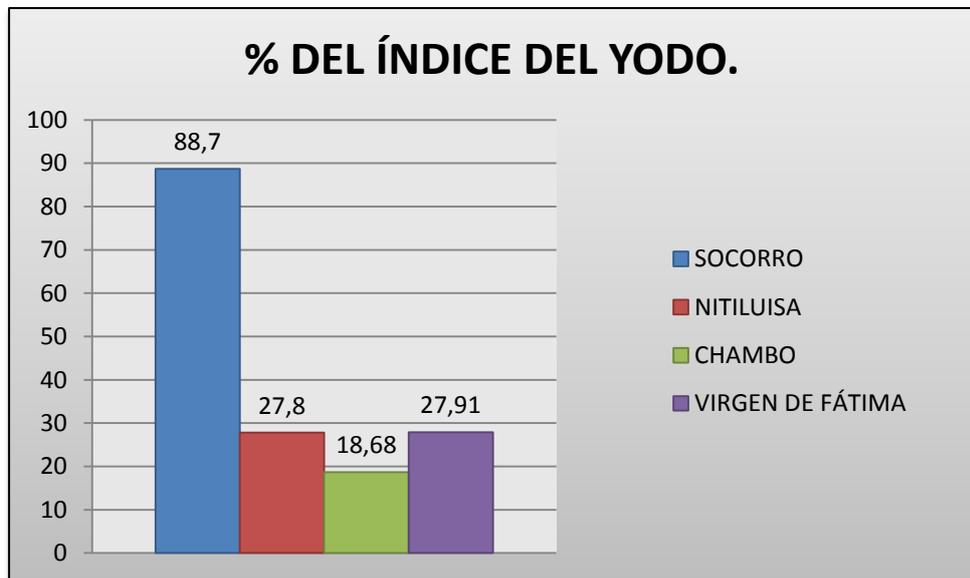


GRÁFICO No.4. DETERMINACIÓN DEL % DE ÍNDICE DEL YODO PRESENTES EN PROPÓLEOS DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

La importancia del incremento del IY se debe al alto contenido de compuestos fenólicos los mismos que están en relación con las plantas ricas en estos compuestos principalmente resinosas de las cuales las abejas extraen las resinas.

Además es un parámetro que en el propóleo va estar relacionado con el número de dobles enlaces presentes en los compuestos fenólicos, relacionándose directamente con este parámetro ya que los compuestos fenólicos son inestables lo cual reaccionan fácilmente con el reactivo de yodo.

La zona de Socorro fue la única que cumplió con la Norma Rusa que presenta un $IY \geq 35 \%$ y presenta un porcentaje superior al reportado por López, J. y Ubillús, M. (2004) de 34,64 %. (27)

El índice de oxidación según la Norma rusa y la Norma de Brasil para propóleos estipula que el tiempo de decoloración debe ser menor o igual a los 22 s, por lo tanto el propóleo de las cuatro zonas apícolas utilizadas en esta investigación no cumplen con dichas normas al presentar tiempos muy superiores a los estipulados, puede ser debido a la pérdida de calidad del propóleo, porque a pesar de que las muestras de propóleo presentan un alto contenido de compuestos fenólicos, se van a ver afectadas disminuyendo su actividad biológica por la acción de factores ambientales como la acción de radicales libres provenientes del sol o del medio ambiente. (34) (37)

De igual manera presentan tiempos muy superiores a los 40 s en índice de oxidación estudios determinados por Álvarez, E. y otros (2010) en Colombia, inclusive valores mayores al rango de 2 a 110 s propuestos por Lozina, L. et al. (2009) en propóleo Argentinos, ya que las zonas de

análisis presentaron tiempos como el Socorro 123 s, Virgen de Fátima 122 s, Nitiluisa y Chambo 133 s. (7) (15)

La presencia de Flavonoides se determinó mediante la prueba de coloración en presencia de acetato de plomo e hidróxido de sodio siendo positiva en ambos casos para las cuatro zonas apícolas estudiadas, cumpliendo con la Norma Rusa y Norma de Brasil al existir la presencia de flavonoides; similares a lo reportado por López, J. y Ubillús, M. (2004) en propóleo del Perú. (27) (37)

3.2 CONTROL DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO COMO DROGAS SECAS

3.2.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La determinación de la humedad es importante ya que un elevado contenido de ésta influye en la velocidad de multiplicación de los microorganismos, provocando su descomposición y por lo tanto la pérdida de la calidad. (23)

Los resultados obtenidos para la humedad de las muestras de propóleo como drogas secas se reportan en el siguiente cuadro:

CUADRO No. 3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO COMO DROGAS SECAS PARA LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

Zonas Apícolas

	% de Humedad	Especificación
Socorro	4	Hasta 14 %
Nitiluisa	2,89	
Chambo	6,38	
Parroquia Virgen de Fátima	2,64	

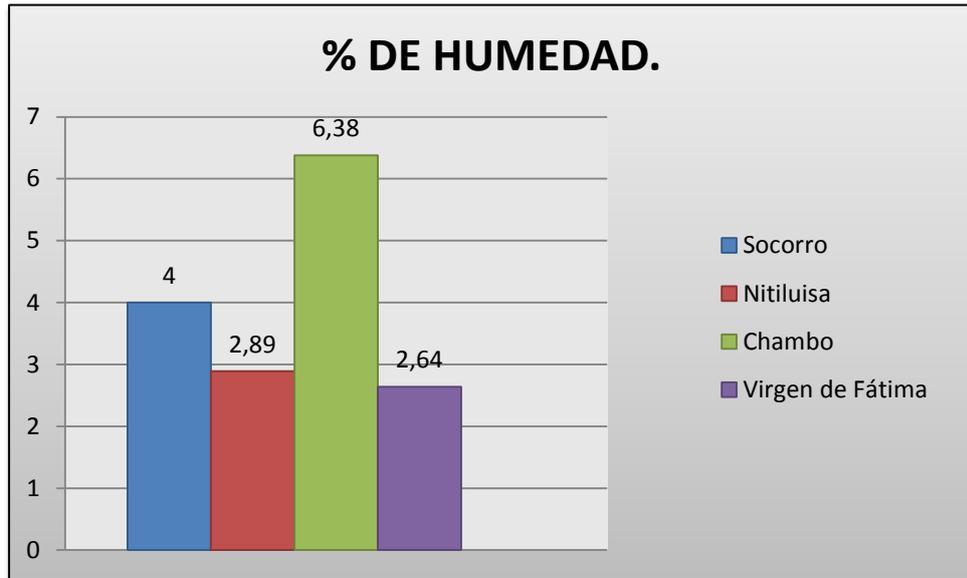


GRÁFICO No. 5. PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS Y EL VALOR DE REFERENCIA ESTABLECIDO POR LA USP #18 PARA PRODUCTOS NATURALES. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

En el CUADRO No. 3 se puede apreciar los contenidos de humedad que presentan las muestras de propóleo de las cuatro zonas apícolas y representados en el GRÁFICO No. 5, en la cual se puede determinar que los porcentajes se encuentran dentro de los límites establecidos por la Normas Ramales NRSP 313 que establece un máximo de 14 %. (24)

Los porcentajes de las cuatro zonas se encuentran por encima de los descritos por Martínez, J. et al. (2011) en Colombia con 1,72 % y por debajo de los determinado por López, S. et al. (2003), con 6,77 % de humedad en propóleos Argentinos. (18)

En comparación con el propóleo de Chile con 5,22 % de humedad descrito por Hernández, S. et al. (2005), la zona de Chambo es la única que presenta un mayor porcentaje. (25)

3.2.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

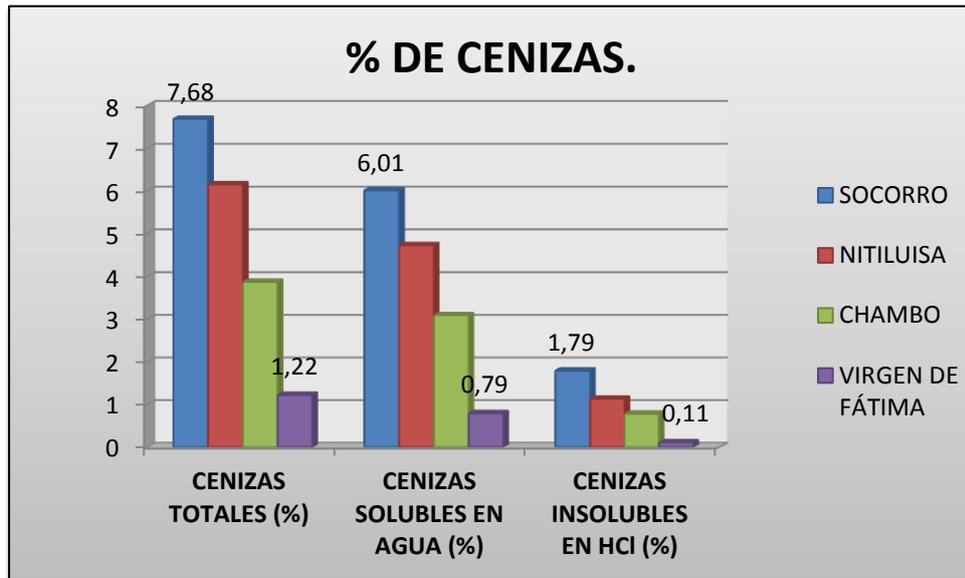
Las cenizas son un indicativo del contenido de sales minerales presentes en la muestra los resultados obtenidos para las cuatro zonas apícolas como drogas secas se indican en el siguiente cuadro:

CUADRO No. 4. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN HCl DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO COMO DROGAS SECAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.

Zonas Apícolas	Parámetros		
	Cenizas Totales (% en masa)	Cenizas Solubles en Agua (% en masa)	Cenizas Insolubles en HCl (% en masa)
Socorro	7,68	6,01	1,79
Nitiluisa	6,15	4,73	1,13
Chambo	3,87	3,09	0,78
Parroquia Virgen de Fátima	1,22	0,79	0,11
Especificación*	≤ 12	≤ 7	≤ 5

* FUENTE: FARMACOPEA ESPAÑOLA (2002)

GRÁFICO No. 6. PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES, CENIZAS SOLUBLES EN AGUA Y CENIZAS INSOLUBLES EN HCl DE PROPÓLEOS DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.



En el CUADRO No. 4 se indica y en el GRÁFICO No. 6 se representan los valores promedio determinados para las cuatro zonas apícolas analizadas que son: Socorro, Nitiluisa, Chambo y Virgen de Fátima, presentando un porcentaje de rango para Cenizas Totales de 1,22 a 7,68 %; en cambio que el porcentaje de rango para Cenizas Solubles en Agua fue de 0,79 a 6,01 % y el porcentaje de rango para Cenizas Insolubles en HCl fue de 0,11 a 1,79 %, el cual es un indicativo del cumplimiento de los tres parámetros en las cuatro zonas estudiadas con los valores máximos establecidos por la Farmacopea Española (2002). (24)

La variación entre los resultados reportados por las muestras de propóleo se puede deber a la utilización por parte de las abejas de otras sustancias diferentes a las resinas de árboles como: Lodo, cera, residuos vegetales,

astillas de madera entre otros, en la elaboración del propóleo para brindarle mayor consistencia, lo cual altera el contenido de las diferentes cenizas determinadas en el mismo.

Los valores de cenizas totales que presentan las cuatro zonas apícolas son superiores a los reportados por Martínez, J. et al. (2011) en Colombia con 0,78. (28)

En cambio los porcentajes de Socorro y Nitiluisa son mayores que el valor determinado por Maldonado, L. de 4,34 % en y la zona de Virgen de Fátima fue la única que presentó un porcentaje menor que al rango de 1,49 a 2,10 % propuestos por Lozina, L. et al. (2009) en propóleos Argentinos. (15) (42)

3.3 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

3.3.1 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

CUADRO No. 5. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.

Extracto	Socorro	Nitiluisa	Chambo	Virgen de Fátima
Parámetro				
Olor	Aromático, Resinoso.	Aromático, Resinoso.	Aromático, Resinoso.	Aromático, Resinoso.
Color	Verde	Verde	Verde	Verde Amarillenta
Sabor	Amargo, Picante Intenso	Amargo, Picante Intenso	Amargo, Picante Intenso	Amargo, Picante Intenso

Aspecto	Líquido Turbio	Líquido Turbio	Líquido Turbio	Líquido Homogéneo, Transparente
----------------	----------------	----------------	----------------	---------------------------------

En base a lo reportado en el CUADRO No. 5 los extractos etanólicos de las cuatro zonas apícolas presentaron un Olor aromático, resinoso; un sabor amargo, picante intenso; la coloración verde y aspecto líquido turbio fue característico de las zonas de Socorro, Nitiluisa y Chambo, mientras que la zona Parroquia Virgen de Fátima presentó una coloración verde amarillenta y un aspecto líquido homogéneo transparente.

3.3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS

En el siguiente cuadro se reportan los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros físicos de los extractos etanólicos:

CUADRO No. 6. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.

Extracto	Socorro	Nitiluisa	Chambo	Virgen de Fátima
Parámetro				
pH	6,20	6,17	5,55	6,40
Índice de Refracción	1,370	1,369	1,368	1,370
Densidad Relativa (g/mL)	0,86	0,85	0,85	0,86
Sólidos Totales (%)	2,46	2,22	1,77	3,34

En el CUADRO No. 6 se presentan y en el GRÁFICO No. 7 se representan los siguientes resultados promedio para los extractos etanólicos de las cuatro zonas apícolas Socorro, Nitiluisa, Chambo y Parroquia Virgen de Fátima, presentando un rango en porcentaje de 5,55 a 6,40 en pH; un índice de refracción que va de 1,368 a 1,370; con una densidad relativa de 0,85 a 0,86 g/mL y un porcentaje para sólidos totales que va de 1,77 a 3,34 %.

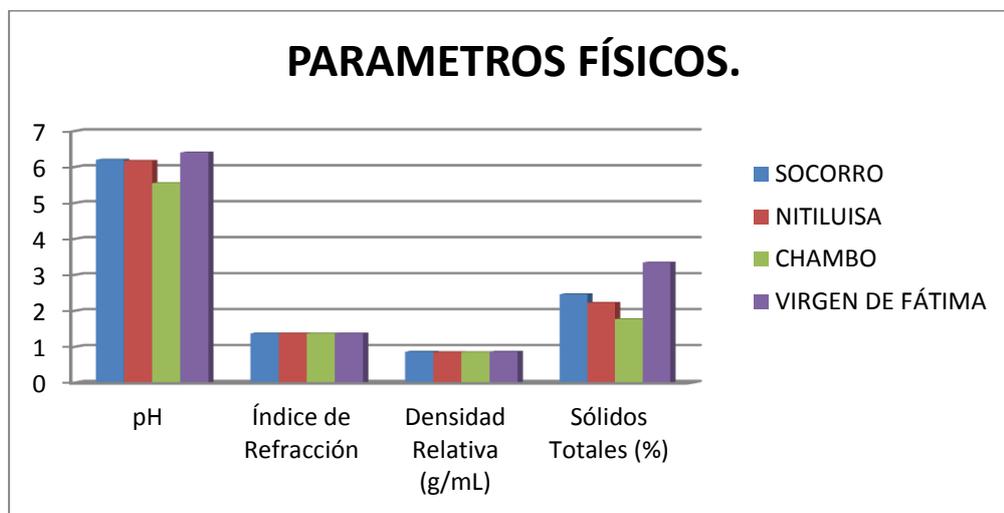


GRÁFICO No. 7. PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.

El pH que presentaron las cuatro zonas fue ligeramente ácidos pero la zona de Chambo presentó un pH más ácido con 5,55 el cual es un indicativo de mayor contenido de sustancias solubles en etanol que son ácidas.

Al comparar el índice de refracción y la densidad de los extractos con el índice de refracción de 1,360 y la densidad de 0,790 g/mL del etanol, los valores de los extractos fueron mayores en los dos casos lo cual nos indica la presencia de compuestos densos disueltos en el solvente de extracción.

Con respecto a sólidos totales la zona Virgen de Fátima presentó el mayor porcentaje con 3,34 %, esto se puede deber a la variedad vegetal que presenta esta zona y a la presencia de un mayor número de compuestos fenólicos solubles en etanol.

Al ser comparados con otros estudios realizados por Nuria, Y. et al. (2000) en Cuba, presentaron similares resultados en todos los parámetros.

3.3.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

CUADRO No. 7. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

Ensayos	Metabolito	Extractos			
		Socorro	Nitiluisa	Chambo	Virgen de

		Fátima			
Dragendorff		-	-	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-	-	-
Meyer		-	-	-	-
Baljet	Lactonas y Cumarinas	++	++	++	++
Borntrager	Antraquinonas	++	++	++	+++
Liebermann- Burchard	Triterpenos y/o Esteroides	+	+	+	+
Catequinas	Catequinas	+	+	+	+
Fehling	Azúcares reductores	-	-	-	-
Tricloruro Férrico	Taninos	++	++	++	++
Shinoda	Flavonoides	+++	+++	+++	+++
Antocianidinas		+++	+++	+++	+++
Resinas	Resinas	+++	+++	+++	+++
Espuma	Saponinas	-	-	-	-

INTERPRETACIÓN: - NO PRESENCIA
+ BAJA EVIDENCIA
++ EVIDENCIA
+++ ALTA EVIDENCIA

Los resultados presentes en el CUADRO No. 7 nos indican los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a las cuatro zonas apícolas, Socorro, Nitiluisa, Chambo y Parroquia Virgen de Fátima, en las cuales se determinó la presencia de lactonas, cumarinas, antraquinonas, triterpenos, catequinas, taninos, flavonoides tipo antocianidinas y resinas.

Concordante con lo reportado por Álvarez, S. (2012) y los presentados por Tolosa, L. y Cañizares, E. (2008) en propóleos de México y al comparar con los estudios por Nuria, Y. et al. (2000) en propóleo de la

zona de Pinar del Río, Cuba, presentan los mismos resultados en todos los ensayos realizados (ANEXO No. 10). (7)

3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

3.4.1 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC) DEL MARCADOR QUÍMICO FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADO COMO PRESENCIA DE QUERCETINA

CUADRO No. 8. RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DE LOS R_f DE LAS MANCHAS OBTENIDAS PARA CADA MUESTRA DE PROPÓLEO DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

Muestra	Mancha	Distancia (cm)	Color	R _f	Compuesto
Quercetina	1	2,7	Amarillo verdoso	0,38	Quercetina
	1	1,5	Violeta	0,21	
Socorro	2	3,3	Amarillo	0,46	
	3	4,7	Violeta	0,66	
	4	5,3	Amarillo	0,75	
	5	6,1	Violeta	0,86	
	6	6,6	Amarillo	0,93	
Nítiluisa	1	4,7	Violeta	0,66	
	2	5,3	Amarillo	0,75	
	3	6,1	Violeta	0,86	
	4	6,6	Amarillo	0,93	
Chambo	1	4,7	Violeta	0,66	
	2	5,3	Amarillo	0,75	
	3	6,1	Violeta	0,86	
	4	6,6	Amarillo	0,93	
Virgen de Fátima	1	4,1	Rosado	0,58	
	2	5,5	Rosado	0,77	
	3	6,3	Violeta	0,89	

4	6,6	Amarillo	0,93
---	-----	----------	------

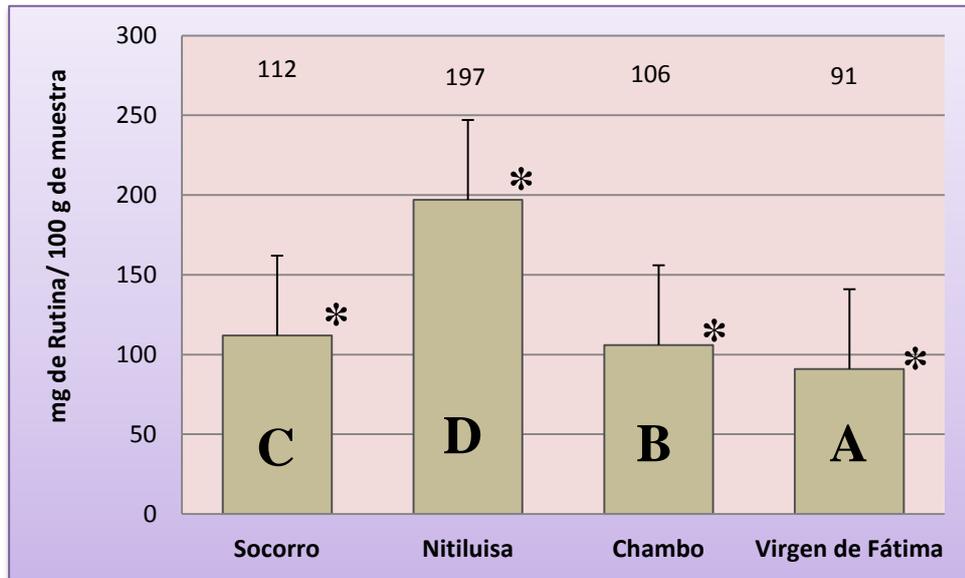
En el CUADRO No. 8 se indican los Rf determinados para la Cromatografía de Capa Fina (TLC) de los extractos de las cuatro zonas apícolas usando el solvente de corrido Cloroformo-Acetona-Ácido Fórmico (75:16,5:8,5) y como revelador Vainillina-Ácido Sulfúrico.

3.4.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (MÉTODO DEL $AlCl_3$)

CUADRO No. 9. RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS EN mg DE RUTINA/100 g DE MUESTRA DETERMINADOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

Muestras de las Zonas Apícolas	Absorbancia	Concentración en (%)	Contenido de Flavonoides Totales en mg de rutina por g de Muestra	Flavonoides Totales (mg/100 g muestra)
Socorro	0,578	0,11	1,12	112
Nitiluisa	0,722	0,20	1,97	197
Chambo	0,568	0,11	1,06	106
Virgen de Fátima	0,542	0,09	0,91	91

GRÁFICO No. 8. CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXTRAÍDOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO EXPRESADOS EN mg DE RUTINA POR 100 g DE MUESTRA. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013. ANALISIS ESTADÍSTICO (ANEXO No. 5).



*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 3. p-VALOR > 0,05.

En los resultados indicados en el CUADRO No. 9 y representados en el GRÁFICO No. 8 se observa que en el contenido de Flavonoides Totales para las cuatro zonas apícolas, en la cual la zona de Nitiluisa presenta el valor más alto con 197, seguido de la zona de Socorro con 112, Chambo con 106 y siendo la más baja la Virgen de Fátima con 91 mg/100 g de muestra.

Al comparar con los resultados reportados por Rodríguez, Y. et al. (2012) de valores entre 190 y 360 mg/100 g de muestra, la zona de Nitiluisa es la única que se encuentra dentro de este rango, mientras que todas las zonas presentan valores superiores a los determinados por Grosso, G. et al. (2007) en propóleo de Colombia con un rango de 5,30 a 22,3 mg/100 g de muestra. (14) (29)

Todas las zonas se encuentran dentro del rango reportado por Lozina, L. et al. (2009) con valores de 12 a 3 039 mg/100 g de muestra y por debajo de los resultados presentados por Bedascarrasbure, E. et al. (2004) con valores entre 370 y 1 290 mg/100 g en propóleos argentinos, situándose nuestro propóleo en base a este resultado en una calidad óptima y

resaltando lo dicho por Torel, J. et al. (1986) quien expresa que el contenido de fenoles y flavonoides en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico, en especial para la actividad antioxidante. (8) (15)

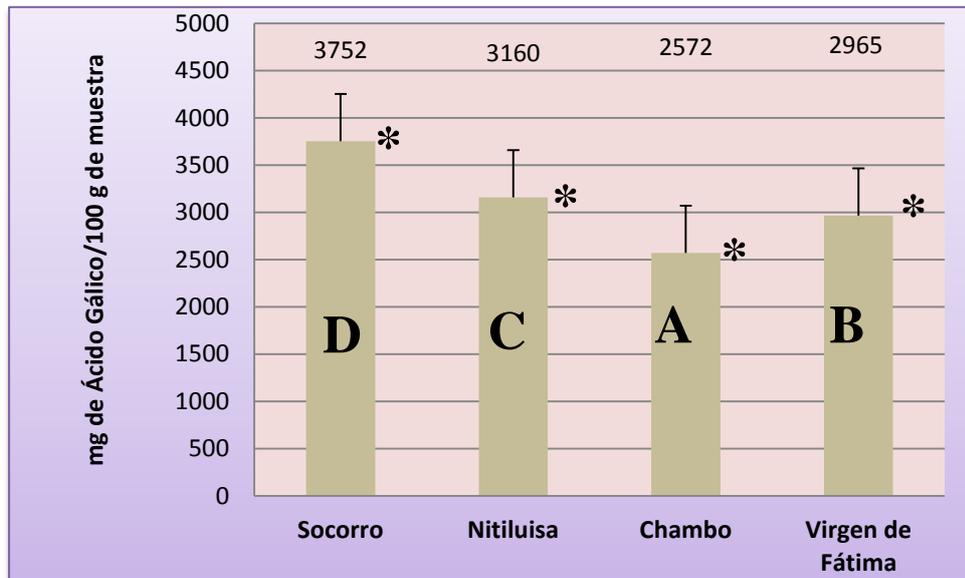
3.4.3 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS (MICROMÉTODO DE FOLIN-CIICALTEAU)

El método de Folin-Ciocalteu se usa para determinar el contenido total de compuestos fenólicos en el análisis de plantas y alimentos, es útil para evaluar estos materiales porque contienen muchas clases de compuestos fenólicos en especial el propóleo.

CUADRO No. 10. RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EXPRESADOS EN mg DE ÁCIDO GÁLICO/100 g DE MUESTRA DETERMINADOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

Muestras de las Zonas Apícolas	Absorbancia	(%)	Contenido de Compuestos Fenólicos Totales en mg de Ácido Gálico por g de Muestra	Fenoles Totales (mg/100 g)
Socorro	3,194	3,75	37,52	3 752
Nitiluisa	2,720	3,16	31,60	3 160
Chambo	2,250	2,57	25,72	2 572
Virgen de Fátima	2,564	2,97	29,65	2 965

GRÁFICO No. 9. CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EXTRAÍDOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO EXPRESADOS EN mg DE ÁCIDO GÁLICO POR 100 g DE MUESTRA. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013. ANALISIS ESTADÍSTICO (ANEXO No. 6).



*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 3. p-VALOR > 0,05.

Los resultados reportados en el CUADRO No. 10 y representados en el GRÁFICO No. 9 para el contenido de Compuestos Fenólicos Totales en función del ácido Gálico para las cuatro zonas apícolas fueron de 3 752 para la zona de Socorro quien presentó el valor más alto, seguido de la

zona de Nítiluisa con 3 160, Virgen de Fátima con 2 965 y 2 572 mg/100 g de muestra para la zona de Chambo que presentó el valor más bajo.

Los valores reportados por las cuatro zonas son menores a los determinados por Rodríguez, Y. et al. (2012) de 6 372 a 9 455 mg/100 g de muestra y entre los presentados por Palomino, L. et al. (2009) con valores de 2 211 a 7 522 mg/100 g de muestra. (16)

3.4.4 ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA.

3.4.4.1 Determinación de la Actividad Enzimática de la Polifenoloxidasasa (PPO)

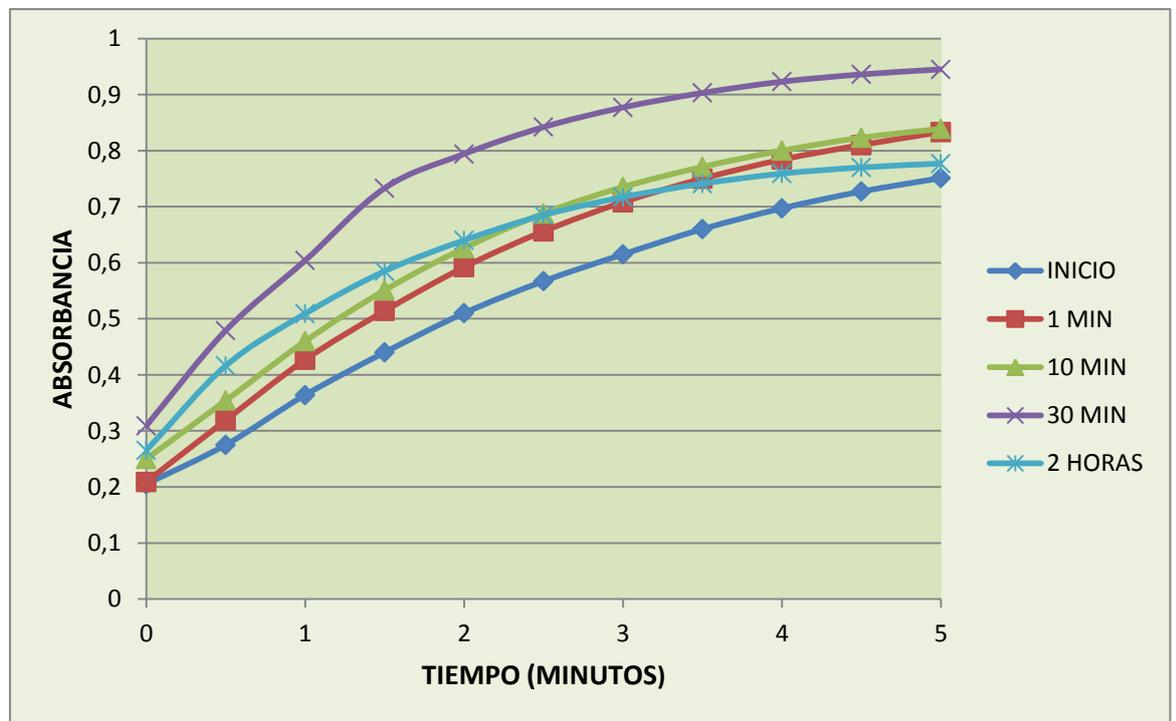
La determinación de la Actividad Enzimática de la Polifenoloxidasasa permitió establecer el tiempo durante el cual la actividad de la enzima se mantuvo constante para realizar las mediciones del ensayo con un mismo extracto y en las mismas condiciones para cada prueba.

CUADRO No. 11. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (Abs/minuto) DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO) MEDIDA PARA DIFERENTES TIEMPOS DE CONGELACIÓN A -6 °C. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DE 2013.

Tiempo (min)	Inicio	1 min	10 min	30 min	2 Horas
0	0,205	0,209	0,250	0,309	0,265
0,5	0,275	0,319	0,354	0,479	0,416
1	0,364	0,427	0,46	0,604	0,509
1,5	0,44	0,514	0,551	0,733	0,585
2	0,51	0,592	0,626	0,794	0,64
2,5	0,567	0,656	0,688	0,842	0,685
3	0,615	0,708	0,735	0,877	0,717

3,5	0,66	0,75	0,771	0,903	0,741
4	0,697	0,784	0,8	0,923	0,759
4,5	0,727	0,81	0,823	0,936	0,77
5	0,751	0,833	0,839	0,945	0,777

GRÁFICO No. 10. CURVAS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO) MEDIDAS DESPUÉS DE DIFERENTES TIEMPOS DE CONGELACIÓN A -6 °C. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DE 2013.



En el GRÁFICO No. 10 se observa la actividad de la PPO después de diferentes periodos de congelación a -6 °C, se puede establecer que la actividad se logró mantener ligeramente estable hasta un lapso de 2 horas, produciéndose un leve incremento a los 10 minutos de congelación y a las 2 horas se produjo un ligero descenso, pero todas las curvas presentaron una aproximación en la tendencia exceptuando la de los 30 minutos cuya actividad no se apega a la tendencia de las demás curvas,

hay que indicar que el tiempo de congelación es un factor determinante para mantener la estabilidad.

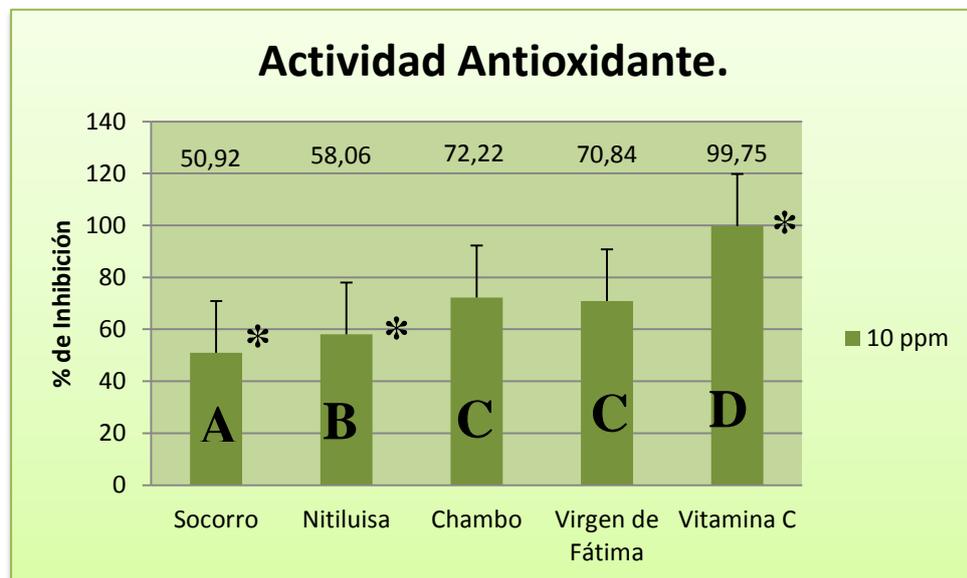
3.4.4.2 Actividad Antioxidante Total

CUADRO No. 12. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT) EXPRESADA COMO PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO) ENCONTRADOS PARA LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS EN CONCENTRACIONES DE 10, 100 Y 1 000 ppm. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DE 2013.

Muestra	Concentración (ppm)	Δ Absorbancia	% Inhibición de la PPO
Blanco	-	0,798	0,00
	10	0,392 \pm 1,1905	50,92
Socorro	100	0,364 \pm 2,8850	54,39
	1 000	0,665 \pm 9,6500	16,67
Nítiluisa	10	0,335 \pm 0,0751	58,06
	100	0,373 \pm 1,8203	53,30
	1 000	0,631 \pm 5,3900	20,93
Chambo	10	0,222 \pm 2,5702	72,22
	100	0,261 \pm 0,6912	67,34
	1 000	0,192 \pm 4,5100	75,94
Virgen de	10	0,233 \pm 2,1953	70,84
Fátima	100	0,257 \pm 0,5662	67,83

	1 000	0,639±4,0752	19,96
	10	0,002	99,75
Vitamina C	100	0,000	100
	1 000	0,005	99,37

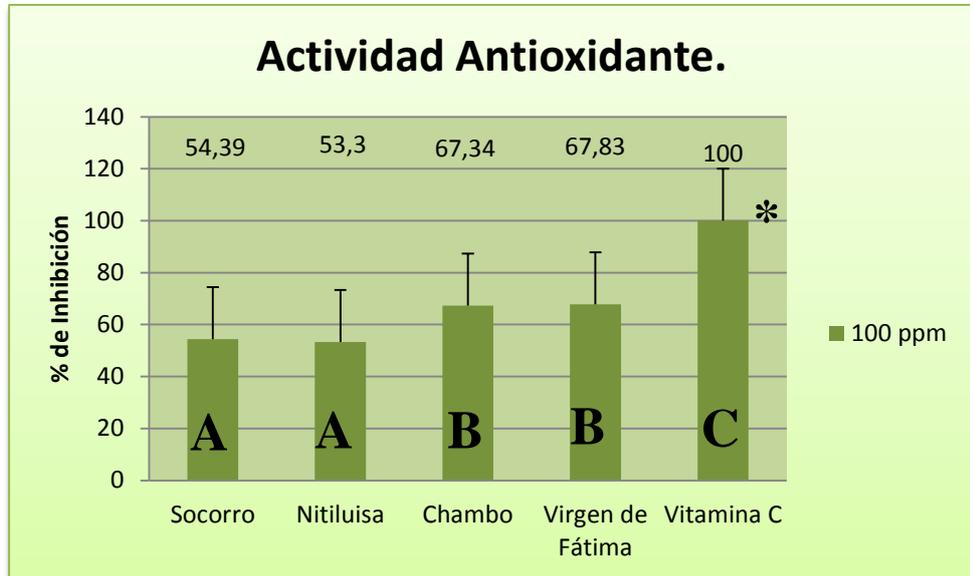
GRÁFICO No. 11. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXPRESADA POR % DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS EN CONCENTRACIÓN DE 10 ppm. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DE 2013.



*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 3. p-VALOR > 0,05.

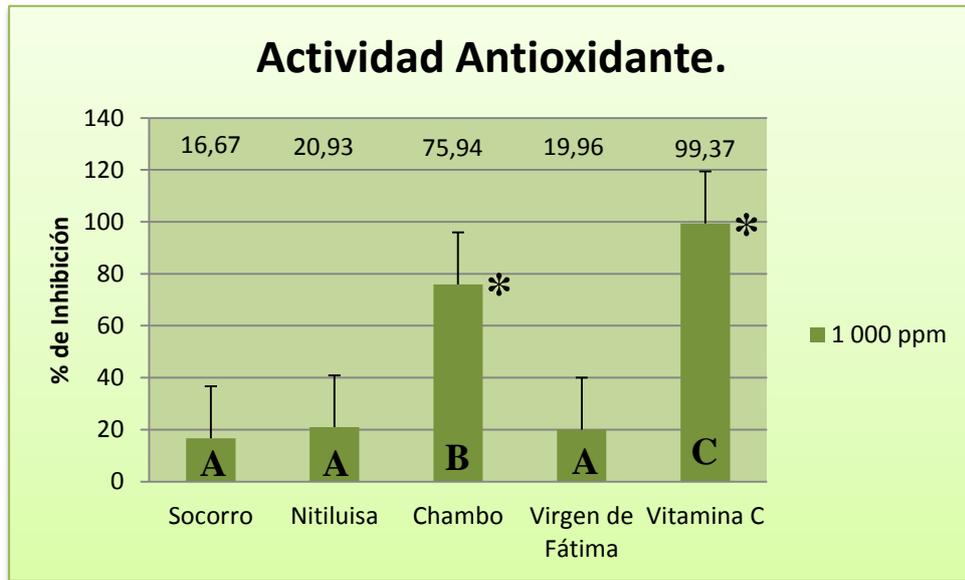
GRÁFICO No. 12. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXPRESADA POR % DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS

APÍCOLAS EN CONCENTRACIÓN DE 100 ppm.
LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL.
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE
DE 2013.



*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 3 GRUPOS: A, B, C.
N = 3. p-VALOR > 0,05.

GRÁFICO No. 13. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXPRESADA POR % DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS EN CONCENTRACIÓN DE 1 000 ppm. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DE 2013.



*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 3 GRUPOS: A, B, C. N = 3. p-VALOR > 0,05.

En el CUADRO No. 12 y en los GRÁFICOS No. 11, 12 y 13 se reportan los resultados de la determinación de la Actividad Antioxidante por Inhibición de la Polifenoloxidasas que nos indican a la concentración de 10 ppm la zona de Chambo presentó el porcentaje más alto de inhibición con el 72,22 % en comparación al estándar de Vitamina C que a la misma concentración alcanzó el 99,75 %, le siguen las zonas de Parroquia Virgen de Fátima con el 70,84 %, Nitiluisa con el 58,06 % y el Socorro con el 50,92 %.

A 100 ppm el mejor porcentaje de inhibición lo presentó la zona de Parroquia Virgen de Fátima con el 67,83 %, superando la mitad del presentado por la Vitamina C de 100 %, le siguen la zona de Chambo con el 67,34 %, el Socorro con el 54,39 % y Nitiluisa con el 53,3 %.

A los 1 000 ppm la zona de mayor porcentaje fue Chambo con el 75,93 %, en comparación al estándar de Vitamina C que a la misma concentración alcanzó el 99,37 %, le siguen las zonas de Nitiluisa con el 20,93 %, Parroquia Virgen de Fátima con el 19,96 % y el Socorro con el

16,67 % siendo el alto contenido de resinas presente en el extracto un impedimento para realizar la adecuada lectura del propóleo a esta concentración.

Estudios realizados para medir la Actividad Antioxidante de propóleos de otros países son los realizados por Rodríguez, Y. et al. (2012) quien determinó valores de 190,41 ($\mu\text{mol/g}$) para el método DPPH, 1918,41 ($\mu\text{mol/g}$) para el método ABTS y 321,27 ($\mu\text{mol/g}$) para el método FRAP; Palomino, L. et al. (2009) encontró entre $33,9 \pm 9,7$ y $324,6 \pm 15,0$, y entre $455,5 \pm 7,8$ y $1,091 \pm 17,3$ $\mu\text{mol TE/g}$ de EEP (TEAC) en los sistemas DPPH y ABTS, respectivamente, en el método FRAP, la actividad se encuentra entre $40,9 \pm 13,3$ y $338,4 \pm 22,4$ $\mu\text{mol AAE/g}$ de EEP (AEAC), ambas en propóleos de Colombia, Velázquez, C. et al. (2007) indica valores de 75, 26 y 22 % por el método DPPH para muestras de México. (9) (11)

Los resultados presentados por las muestras de las cuatro zonas fueron los esperados, en concentraciones de 10 y 100 ppm, mientras que el problema se presentó en la concentración de 1 000 ppm debido a las características propias y a los compuestos presentes en las mismas, principalmente las resinas, excepto la zona de Chambo que presentó el mejor porcentaje de inhibición de la Polifenoloxidasasa con el 75,94 % en este estudio realizado, esto puede deberse a que sus compuestos fenólicos no se encontraron atrapados en las resinas lo cual les permitió actuar con mayor libertad, incrementando la actividad antioxidante.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de se realizó utilizando la prueba de ANOVA y el test de Tukey para determinar qué valores presentaban una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control, se utilizó el programa estadístico G-STAT y los resultados se indican a continuación:

CUADRO No. 13. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Virgen de Fátima	3	91.0000	X
Chambo	3	105.6667	X
Socorro	3	112.0000	X
Nitiluisa	3	196.6667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Socorro VS Nitiluisa	*-84.6667	*2.8237
Socorro VS Chambo	*6.3333	*2.8237
Socorro VS Virgen de Fátima	*21.0000	*2.8237
Nitiluisa VS Chambo	*91.0000	*2.8237
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	*105.6667	*2.8237
Chambo VS Virgen de Fátima	*14.6667	*2.8237

*** Diferencia estadísticamente significativa.**

En el ANOVA Un Factor se obtuvo un p-valor de 0,000 1E-9, que es menor al 0,05 de significancia por lo que se acepta la hipótesis de diferencia de medias. (ANEXO No. 5)

En base a la prueba de Tukey al 95 % de confianza y con un 0,05 de nivel de significancia indicada en el CUADRO No. 13, se obtuvo 4 grupos, en donde los extractos etanólicos de las cuatro zonas son estadísticamente diferentes, es decir no tienen homogeneidad.

CUADRO No. 14. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Chambo	3	2572.0000	X
Virgen de Fátima	3	2965.0000	X
Nitiluisa	3	3160.3333	X
Socorro	3	3752.3333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Socorro VS Nitiluisa	*592.0000	*14.1787
Socorro VS Chambo	*1180.3333	*14.1787
Socorro VS Virgen de Fátima	*787.3333	*14.1787
Nitiluisa VS Chambo	*588.3333	*14.1787
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	*195.3333	*14.1787
Chambo VS Virgen de Fátima	*-393.0000	*14.1787

*** Diferencia estadísticamente significativa.**

En el ANOVA Un Factor se obtuvo un p-valor de 0,000 3E-12, que es menor al 0,05 de significancia por lo que se acepta la hipótesis de diferencia de medias. (ANEXO No. 6)

En base a la prueba de Tukey al 95 % de confianza y con un 0,05 de nivel de significancia indicada en el CUADRO No. 14, se obtuvo 4 grupos, en donde los extractos etanólicos de las cuatro zonas son estadísticamente diferentes, es decir no tienen homogeneidad.

CUADRO No. 15. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 10 ppm.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Socorro	3	50.9200	X
Nitiluisa	3	58.0633	X
Virgen de Fátima	3	70.8433	X
Chambo	3	72.2200	X

Contraste	Diferencia	+/- Límite
Socorro VS Nitiluisa	*-7.1433	*4.6853
Socorro VS Chambo	*-21.3000	*4.6853
Socorro VS Virgen de Fátima	*-19.9233	*4.6853
Nitiluisa VS Chambo	*-14.1567	*4.6853
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	*-12.7800	*4.6853
Chambo VS Virgen de Fátima	1.3767	4.6853

* Diferencia estadísticamente significativa.

En el ANOVA Un Factor se obtuvo un p-valor de 0,000 1E-2, que es menor al 0,05 de significancia por lo que se acepta la hipótesis de diferencia de medias. (ANEXO No. 7)

En base a la prueba de Tukey al 95 % de confianza y con un 0,05 de nivel de significancia indicada en el CUADRO No. 15, se obtuvo 3 grupos, en donde los extractos etanólicos de las zonas de Chambo y Virgen de Fátima, pertenecen al grupo 3, la diferencia entre sus medias fue de 1,376 7 valor que es inferior al límite de la diferencia estadísticamente significativa que es de +/- 4,685 3 lo cual nos indica la homogeneidad entre las dos muestras.

CUADRO No. 16. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 100 ppm.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Nitiluisa	3	53.3000	X
Socorro	3	54.3867	X
Chambo	3	67.3367	X
Virgen de Fátima	3	67.8333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Socorro VS Nitiluisa	1.0867	4.6093
Socorro VS Chambo	*-12.9500	*4.6093
Socorro VS Virgen de Fátima	*-13.4467	*4.6093
Nitiluisa VS Chambo	*-14.0367	*4.6093
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	*-14.5333	*4.6093
Chambo VS Virgen de Fátima	-0.4967	4.6093

*** Diferencia estadísticamente significativa.**

En el ANOVA Un Factor se obtuvo un p-valor de 0,000 7E-2, que es menor al 0,05 de significancia por lo que se acepta la hipótesis de diferencia de medias. (ANEXO No. 8)

En base a la prueba de Tukey al 95 % de confianza y con un 0,05 de nivel de significancia indicada en el CUADRO No. 16, se obtuvo 2 grupos.

Al grupo 1 pertenecen los extractos etanólicos de las zonas de Socorro y Nitiluisa, la diferencia entre sus medias es de 1,086 7 valor que es inferior al límite de la diferencia estadísticamente significativa que es de +/- 4,685 3 lo cual nos indica la homogeneidad entre las dos muestras.

Al grupo 2 pertenecen los extractos etanólicos de las zonas de Chambo y Virgen de Fátima, la diferencia entre sus medias fue de - 0,496 7 valor que es inferior al límite de la diferencia estadísticamente significativa que es de +/- 4,685 3 lo cual nos indica la homogeneidad entre las dos muestras.

CUADRO No. 17. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 1 000 ppm.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Socorro	3	16.6700	X
Virgen de Fátima	3	19.9633	X
Nitiluisa	3	20.9300	X
Chambo	3	75.9400	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Socorro VS Nitiluisa	-4.2600	16.4883
Socorro VS Chambo	*-59.2700	*16.4883
Socorro VS Virgen de Fátima	-3.2933	16.4883
Nitiluisa VS Chambo	*-55.0100	*16.4883
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	0.9667	16.4883
Chambo VS Virgen de Fátima	*55.9767	*16.4883

*** Diferencia estadísticamente significativa.**

En el ANOVA Un Factor se obtuvo un p-valor de 0,0007E-2, que es menor al 0,05 de significancia por lo que se acepta la hipótesis de diferencia de medias. (ANEXO No. 9)

En base a la prueba de Tukey al 95 % de confianza y con un 0,05 de nivel de significancia indicada en el CUADRO No. 17, se obtuvo 2

grupos, en donde los extractos etanólicos de las zonas de Socorro, Nitiluisa y Virgen de Fátima, pertenecen al grupo 1.

La diferencia entre las medias de las zonas de Socorro y Nitiluisa fue de - 4,260 valor que es inferior al límite de la diferencia estadísticamente significativa que es de +/- 16,488 3 lo cual nos indica la homogeneidad entre las dos muestras.

En cambio que la diferencia entre las medias de las zonas de Socorro y Virgen de Fátima fue de - 3,293 3 valor que es inferior al límite de la diferencia estadísticamente significativa que es de +/- 16,488 3 lo cual nos indica la homogeneidad entre las dos muestras.

Y mientras que la diferencia entre las medias de las zonas de Nitiluisa y Virgen de Fátima fue de 0,696 7 valor que es inferior al límite de la diferencia estadísticamente significativa que es de +/- 16,488 3 lo cual nos indica la homogeneidad entre las dos muestras.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Se concluyó que los propóleos se caracterizaron por la presencia de diferentes compuestos, principalmente polifenoles y flavonoides, los mismos que pueden presentar actividad biológica como la capacidad de inhibir la acción de la polifenoloxidasas.
2. La Norma rusa no se ajusta a las condiciones del propóleo Ecuatoriano ya que la amplia variedad botánica en nuestro país produce una gama de propóleos en los cuales no se pueden establecer parámetros fijos para su estandarización.
3. Se cuantificó los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en cada una de las muestra, que en base a otros estudios e investigaciones consultadas son los que proporcionan la mayoría de las actividades biológicas del propóleo entre ellas la capacidad antioxidante, para este

análisis la relación entre el contenido de estos compuestos y la actividad antioxidantes es inversa.

4. La aplicación de pruebas estadísticas como ANOVA Unifactorial y la prueba HSD de Tukey, corroboró la diferencia estadística que se pudo apreciar entre las muestras de las cuatro zonas apícolas.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el empleo de un método de recolección para el propóleo diferente al utilizado en esta investigación (Raspado), como puede ser el de mallas el cual evitará un contenido elevado de impurezas que disminuyen la calidad del mismo, e impide realizar un mejor análisis.
2. Realizar investigaciones para determinar el potencial del propóleo como materia prima en la elaboración de diferentes medicamentos, cosméticos y alimentos.

3. Comparar el método inhibición de la Polifenoloxidasa con otros métodos usados para medir la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS), con el fin de evaluar la efectividad del método aplicado en esta investigación.
4. Realizar investigaciones de la actividad antioxidantes de los propóleos de las zonas apícolas estudiados, utilizando modelos in vivo.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

Se determinó la Actividad Antioxidante de muestras de propóleo de cuatro zonas apícolas como Socorro, Nitiluisa y Chambo correspondientes a la provincia de Chimborazo y Virgen de Fátima a la provincia del Guayas, utilizadas como materia prima en la elaboración de productos en la empresa Apicare Cía. Ltda., de la ciudad de Riobamba. La investigación se efectuó en laboratorios de la Facultad de Ciencias de

la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En base a métodos experimentales se confirmó la actividad inhibitoria de polifenoloxidasa de la manzana en dichas muestras de propóleo, asegurando de esta manera la calidad como materia prima en la elaboración de productos en la empresa

Se realizó el control de calidad de materias primas, en el propóleo con la Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77. Se usó el método de Folin-Ciocalteu para cuantificar compuestos fenólicos, los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (GA) por 100 g de muestra, determinándose los siguientes valores: 3 752 mg en Socorro, 3 160 mg en Nitiluisa, 2 572 mg en Chambo y 2 965 mg en Virgen de Fátima. Para flavonoides se aplicó el método de Tricloruro de Aluminio ($AlCl_3$), se reportó valores en mg de rutina por 100 g de muestra de 112 mg; 197 mg; 106 mg; 91 mg para cada zona respectivamente. La muestra de propóleo con mejor capacidad inhibitoria de polifenoloxidasa fue la de la zona de Chambo presentando un 72,22 % a 10 ppm, 67,34 % a 100 ppm y un 75,94 % a 1 000 ppm, en comparación a Vitamina C. Se concluye que el propóleo de cada una de estas zonas presenta una buena actividad antioxidante, debido al contenido de compuestos fenólicos existentes. Se recomienda realizar estudios aplicando otros métodos y modelos experimentales para cuantificar actividad antioxidante que complementen la presente investigación.

SUMMARY

The antioxidant activity of samples of bee Propolis was determined in four areas such as Socorro, Nitiluisa y Chambo these places belong to Chimborazo province y Virgen de Fátima is located in Guayas province. The Propolis samples were used as raw material in the fabrication of products in the company called Apicare Cía. Ltda, which is located in Riobamba. The present research was carried out in the labs of the Faculty Science at Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Based on scientific methods, the polyphenol oxidase inhibitory activity of the apples, samples of Propolis were confirmed thus ensuring quality as raw material in the elaboration of products in the company.

It was performed quality control of raw materials in the Propolis with Russian standard RTS-RSFSR-317-77. Folin-Ciocalteu method was used for phenolics quantifying, results were expressed as g of gallic acid (GA) per 100 g of sample, the following values were determined: 3 7252 g in Socorro, 3 160 g in Nitiluisa, 2 572 g in Chambo and 2 965 g in Virgen de Fátima. For flavonoids aluminium trichloride method was applied ($AlCl_3$), values of routine were reported in g per 100 g of sample of 112 g, 197 g, 106 g, 91 g for each zone correspondingly. The sample of Propolis with the top inhibitory capacity of polyphenoloxidase was in Chambo with 72,22 % 10 ppm, 67,34 % 100 ppm and 75,94 % 1 000 ppm, comparing with vitamin C. It is concluded that the Propolis in each one of the areas shows a good antioxidant activity because of the phenolic compound content. It is recommended to do research, applying another methods and experimental models to quantify the antioxidant activity which complement the research.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **DOMÍNGUEZ, X.**, Métodos de Investigación Fitoquímica., 2da. Ed., México D.F. - México., LIMUSA., 1979., Pp. 81-89.
2. **MACE, H.**, Manual Completo de Apicultura., 2da. Ed., México D.F. - México., Continental S.A., 1985., Pp. 17-22.
3. **PIERRE, J.**, Apicultura., 2da. Ed., Madrid – España., Mundi-Prensa., 1985., Pp. 142-150.
4. **POLAIVO, C.**, Manual Práctico del Apicultor., 4ta. Ed., Madrid - España., Cultural S.A., 2009., Pp. 288-300.
5. **VILLAMAR, B.**, Producción y Comercialización de la miel de Abeja., 1ra. Ed., Lima - Perú., Palomino E.I.R.L., 2001., Pp. 73-95.
6. **GRANDJEAN, M. y otros.**, Manual de Buenas Prácticas para la Apicultura., S. Ed., Santiago - Chile., PROMER (IICA)., 2002., Pp. 6-10.

- 7. ALVAREZ, S.,** Caracterización organoléptica y físico-química de Propóleos del Departamento de La Libertad, Perú., Revista The Biologist., No. 1., Vol. 10., Lima – Perú., 2012., Pp. 1-5.
<http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/bio/v10n1/a04v10n1.pdf>
- 8. BEDASCARRASBURE, E. y otros.,** Revista Farmacéutica Bonaerense., Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo Argentino., No. 3., Vol. 23., Buenos Aires – Argentina., 2004., Pp. 1-4.
- 9. BERMÚDEZ, I y otros.,** Revista Redalyc., Evaluación de la actividad antioxidante del propóleo de la región de Manzanillo. Provincia Gramma. Cuba., No. 3., Vol. 25., México D.F – México., 2000., Pp. 3-6.
- 10. CHAILLOU, L. y otros.,** Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria., Estudio de propóleos de Santiago del Estero, Argentina., No. 24., Vol. 1., Santiago del Estero – Argentina., 2004., Pp. 1-5.
- 11. CHUQUINIA, F. y otros.,** Revista Boliviana de Química., Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoidicos de cuatro especies vegetales de la región andina de Bolivia., No. 1., Vol. 25., La Paz – Bolivia., 2008., Pp. 2-7.

12. **GARCIA, Y. y otros.,** Revista CENIC., Potencial acción arteroprotectora de algunos productos apícolas., No. 2., Vol. 43., La Habana - Cuba., 2012., Pp. 4-8.

13. **GIMENO, E.,** Revista OFFARM., Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para su salud., Vol. 23., España., 2004., Pp. 80-84.

14. **GROSSO, G. y otros.,** Revista Zootecnia Tropical., Perfil de flavonoides e índice de oxidación de algunos propóleos Colombianos., No. 2., Vol. 25., Lara - Venezuela., 2007., Pp. 1-8.

15. **LOZINA, L. y otros.,** Revista Latinoamericana de Farmacia., Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos., No. 1., Vol. 29., Corrientes - Argentina., 2010., Pp. 1-8.

16. **MANRIQUE, A. y otros.,** Revista Zootecnia Tropical., Flavonoides, Actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nanotrigona sp.* De Brasil y Venezuela., No. 2., Vol. 26., Brasil., 2008., Pp. 1-10.

17. **MARTÍNEZ, J.**, Revista Nutrición Hospitalaria., Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes., Vol. 17., España., 2002., Pp. 271-278.

18. **MARTÍNEZ, J. y otros.**, Revista MVZ., Caracterización de propóleos provenientes del Municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección., No. 1., Vol. 17., Córdoba – Argentina., 2012., Pp. 1-9.

19. **PÉREZ, C. y otros.**, Revista Hojas Divulgadoras., El propóleos de las abejas., No. 7., Zaragoza – España., 2002., Pp. 2-5.

20. **CUBA., MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA., (MINSAP).**, Droga Cruda., Métodos de Ensayo., NRSP 309., La Habana - Cuba., 1992., Pp. 1-7.

21. **CUBA., MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA., (MINSAP).**, Extractos Fluidos y Tinturas., Procesos tecnológicos., NRSP 311., La Habana - Cuba., 1992., Pp. 1-6.

22. **CUBA., MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA (MINSAP).**, Extractos Fluidos y Tinturas., Métodos de Ensayo., NRSP 312., La Habana - Cuba., 1992., Pp. 1-5.

- 23. MÉXICO., SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C. NORMEX.,** Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico., Método por arena o gasa., NOM-116-SSA1., México., 1994., Pp. 12.
- 24. PHARMACOPEIA NATIONAL FORMULARY.,** Normas de Estándar Internacional., USP XXVIII NF 18., 1985., Pp. 1267-1268.
- 25. CAMPO, M.,** Estudio químico de propóleos rojos Cubanos., Facultad de Farmacia., Escuela de Farmacia y Alimentos., Universidad de La Habana., La Habana – Cuba., **TESIS.,** 2007., Pp. 12-17.
- 26. COLLADO, J.,** Identificación de Polifenoles en Zumos de frutas rojas., FACULTAD., ESCUELA., Universidad Politécnica de Cartagena., Cartagena - Colombia., **TESIS.,** 2011., Pp. 15-21.
- 27. LÓPEZ, J. y otros.,** Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial., Facultad de Farmacia y Bioquímica., Escuela de Farmacia y Bioquímica., Universidad Nacional Mayor de San Marcos., Lima - Perú., **TESIS.,** 2004., Pp. 6-18.

- 28. MARTÍNEZ, J.,** Caracterización físico química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste Antioqueño., Facultad de Ciencias Agropecuarias., Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos., Universidad Nacional de Colombia., Medellín - Colombia., **TESIS.,** 2009., Pp. 20-26.
- 29. MEDINA, M.,** Flavonoides aislados de propóleos Chilenos y Bioactividad., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Microbiología., Universidad Austral de Chile., Valdivia - Chile., **TESIS.,** 2012., Pp. 3-7.
- 30. ORDOÑEZ, F.,** Método de Purificación del Propóleo para su posterior aplicación en sanidad animal., Facultad de Ciencias Pecuarias., Escuela de Ingeniería Zootécnica., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba – Ecuador., **TESIS.,** 2005., Pp. 16-18.
- 31. RODRÍGUEZ, Y. y otros.,** Caracterización Físicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento del Atlántico, Colombia., Facultad de Ciencias., Universidad Nacional de Colombia., Medellín, Antioquia - Colombia., **TESIS.,** 2012., Pp. 1-4.

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

32. ANTIOXIDANTES: DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y CONCEPTOS GENERALES

<http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>
2013/11/05

33. ANTIOXIDANTES Y ALIMENTOS

<http://www.unirioja.es/ensaya/archivos/antioxidantes.pdf>
2013/11/14

34. APACAME., NORMAS DE BRASIL., REGLAMENTO TÉCNICO PARA LA CALIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CUALIDADES DEL PROPÓLEO

<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>
2013/10/09

35. APICULTURA

http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/apicultura
2013/11/12

36. CIENCIAS DE LA NATURALEZA

<http://www.educa.madrid.org/web/ies.atenea.sansebastian/dep>
2013-12-10

37. EL PROPÓLEO SU APLICACIÓN EN LA MEDICINA HUMANA

<http://www.slideshare.net/aloverasantander/el-propleo>

2013/11/14

38. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS RADICALES LIBRES

<http://es.scribd.com/doc/6869194/RADICALES-LIBRES>

2013/11/06

39. FISIOLÓGÍA BÁSICA DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

<http://www.se-neonatal.es/Portals/0/fisiorad.pdf>

2013/11/16

40. FLAVONOIDES Y SUS ACCIONES ANTIOXIDANTES

<http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207>

2013/11/16

41. LA EXCELENCIA DE LOS ANTIOXIDANTES.

<http://www.nestle.es/nutricion/userfiles/pdfs/dialogos/nesvida>

2013/11/05

42. MALDONADO, L. y otros., PROPOLEOS, PASADO Y PRESENTE

<http://www.biblioteca.org.ar/libros/210155.pdf>

2013/10/15

43. MANUAL DE APICULTURA

<http://www.easdonboscouribe.edu.ar/files/MANUAL%20>
2013/11/12

44. MANUAL PRÁCTICO DE APICULTURA

<http://food4farmers.org/wp-content/uploads/2012/08/MAN>
2013/11/12

45. PRODUCCIÓN Y ALMACEDANADO DE PROPÓLEOS

<http://coronaapicultores.blogspot.com/2012/11/produccion-y->
2013/12

46. PRODUCTOS APÍCOLAS

<http://www.ual.es/personal/tcabello/Temarios/ApiTema10p>
2013/10/11

47. PROPÓLEO ELIXIR INMUNOLÓGICO Y ALGO MÁS

http://www.prama.com.ar/sugerencias_saludables/propoleo.
2013/11/15

49. PROPÓLEO EL ORO PÚRPURA DE LAS ABEJAS

<http://www.mujerapicola.org/docs/TEXON1.pdf>
2013/11/14

50. PROPÓLEO, SALUD NATURAL FABRICADO POR LAS ABEJAS

<http://teatrevesadespertar.wordpress.com/2012/05/25/propole>
2013/11/17

51. RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES.

<http://www.federacioncafe.com/Documentos/CafeYSalud/Ca>
2013/11/05

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO No. 1. CROMATOGRAMAS DEL BARRIDOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO DE LAS ZONAS APÍCOLAS DE: SOCORRO, NITILUISA, CHAMBO Y VIRGEN DE FÁTIMA, DE 200 A 400 nm. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DE 2013.

FIGURA No. 2. CROMATOGRAMA DEL BARRIDO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA MUESTRA DE PROPÓLEO DE LA ZONA DE SOCORRO DE 200 A 400 nm.

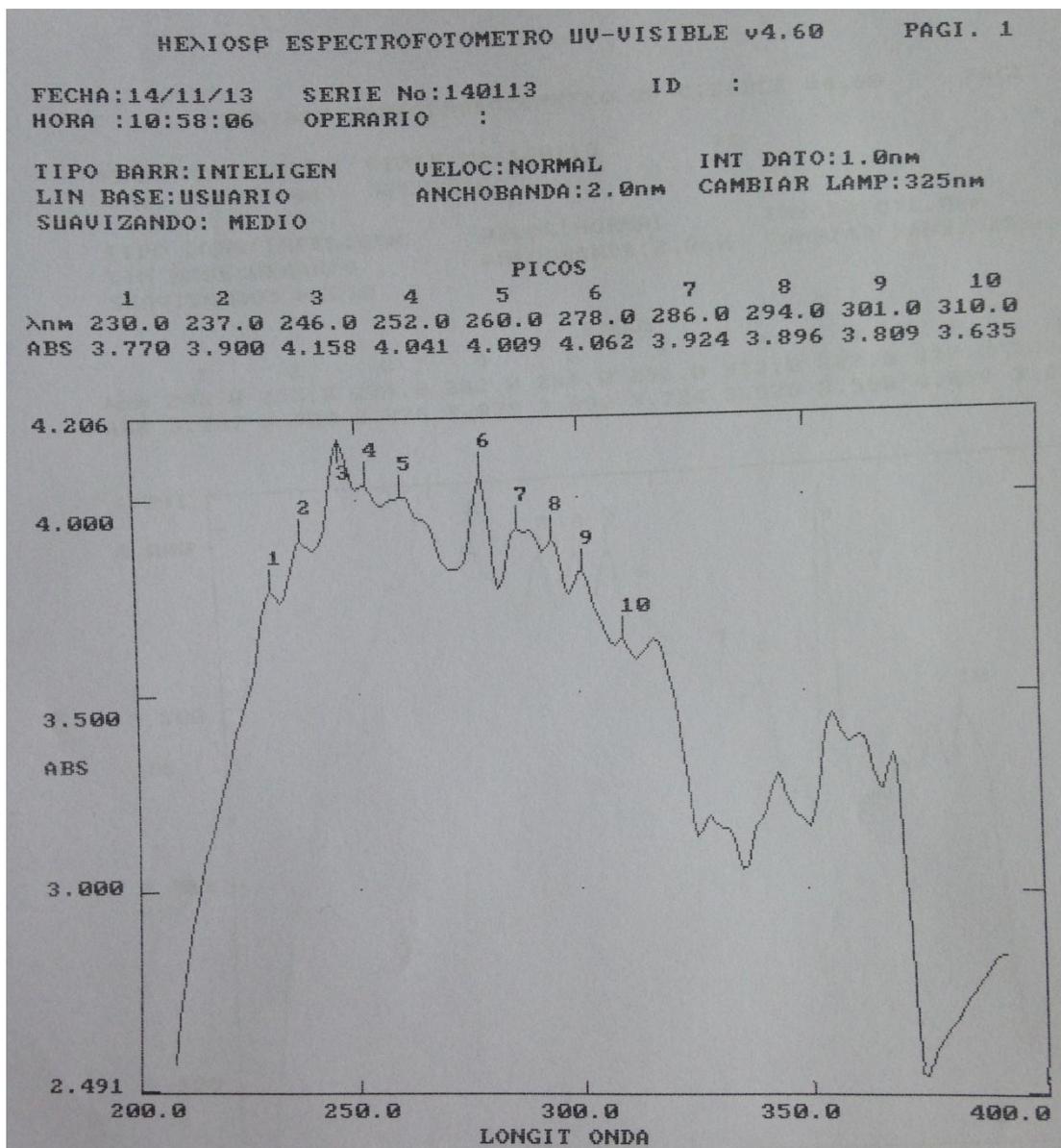


FIGURA No. 3. CROMATOGRAMA DEL BARRIDO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA MUESTRA DE PROPÓLEO DE LA ZONA DE NITILUISA DE 200 A 400 nm.

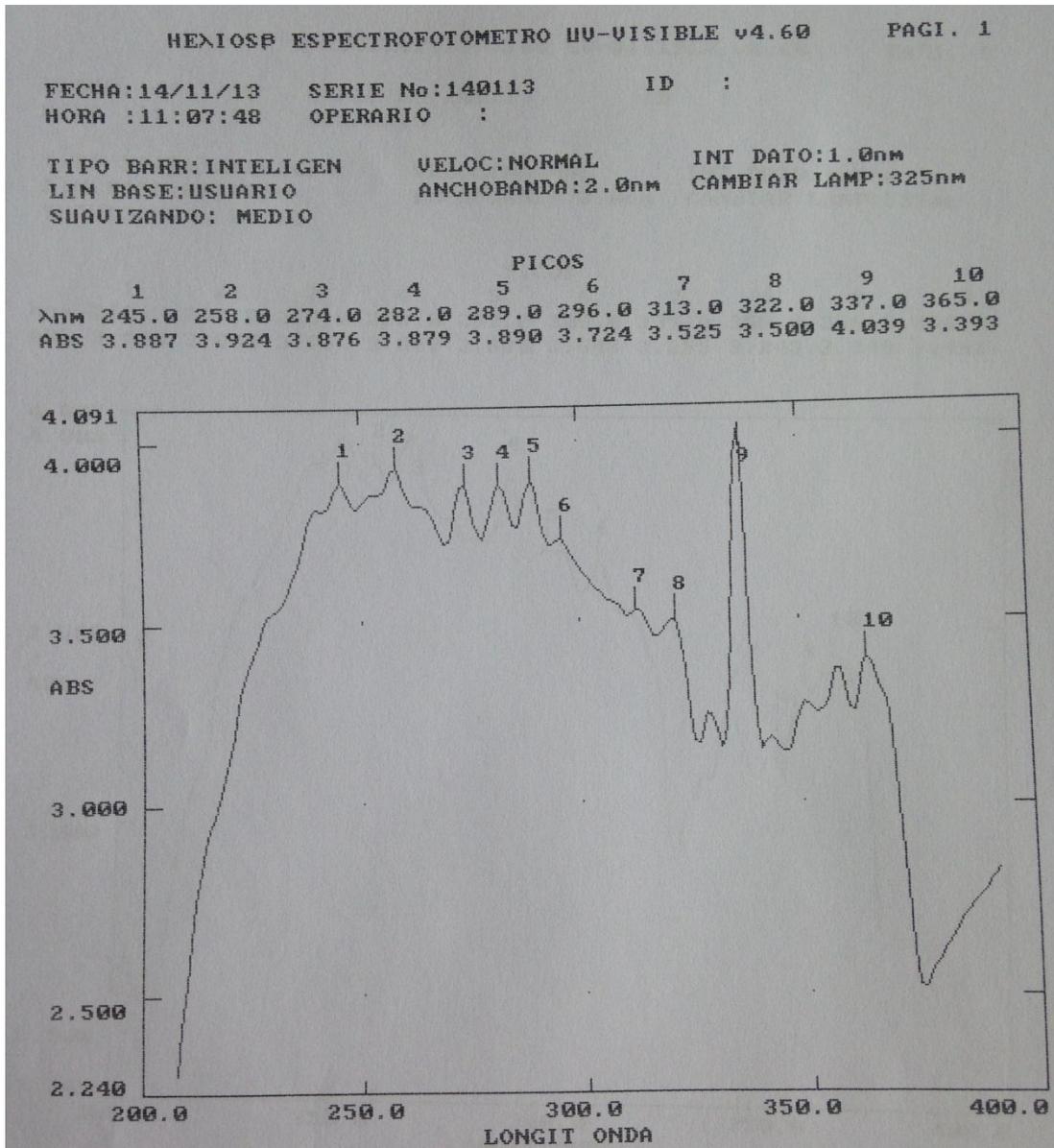


FIGURA No. 4. CROMATOGRAMA DEL BARRIDO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA MUESTRA DE PROPÓLEO DE LA ZONA DE CHAMBO DE 200 A 400 nm.

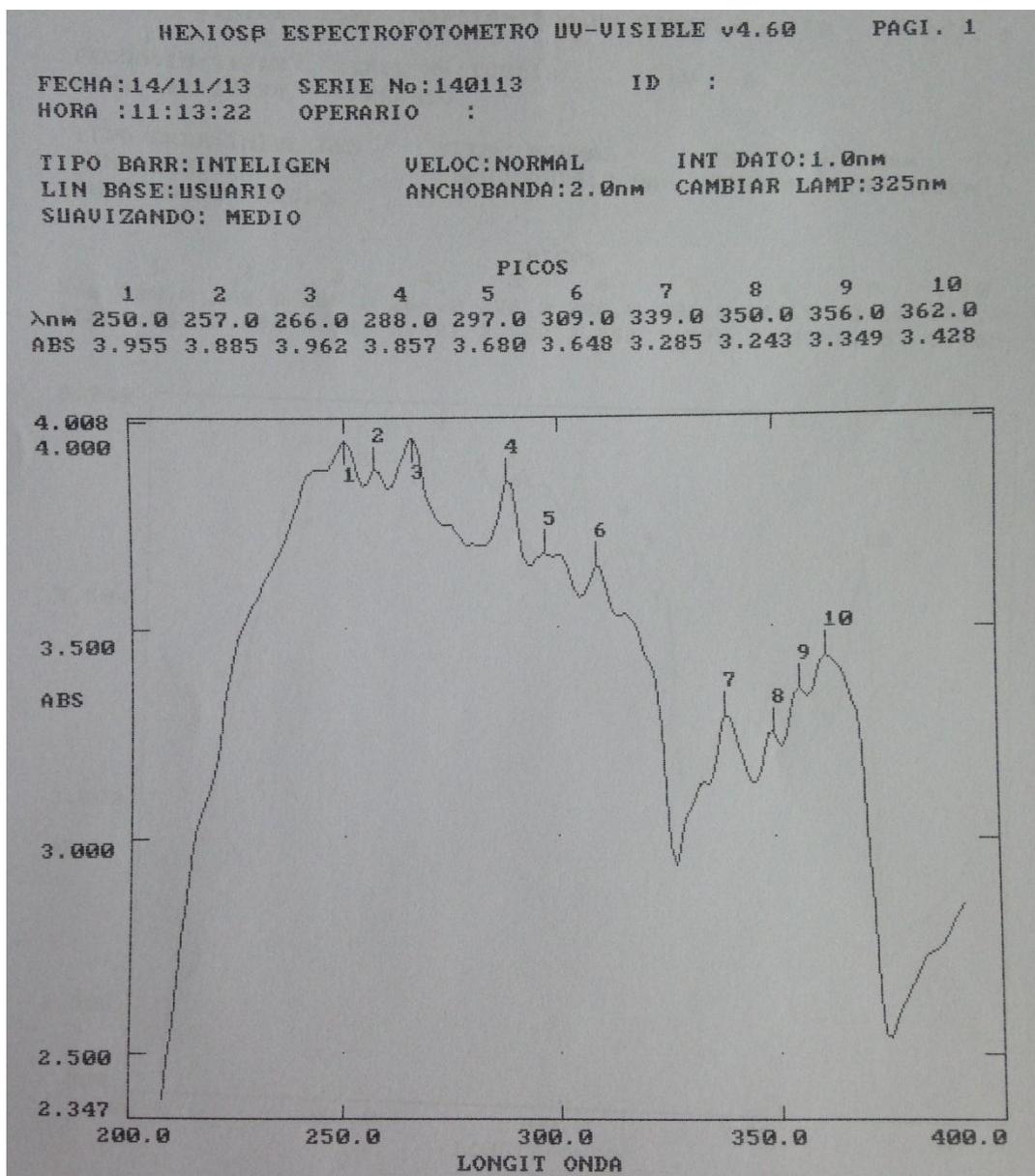
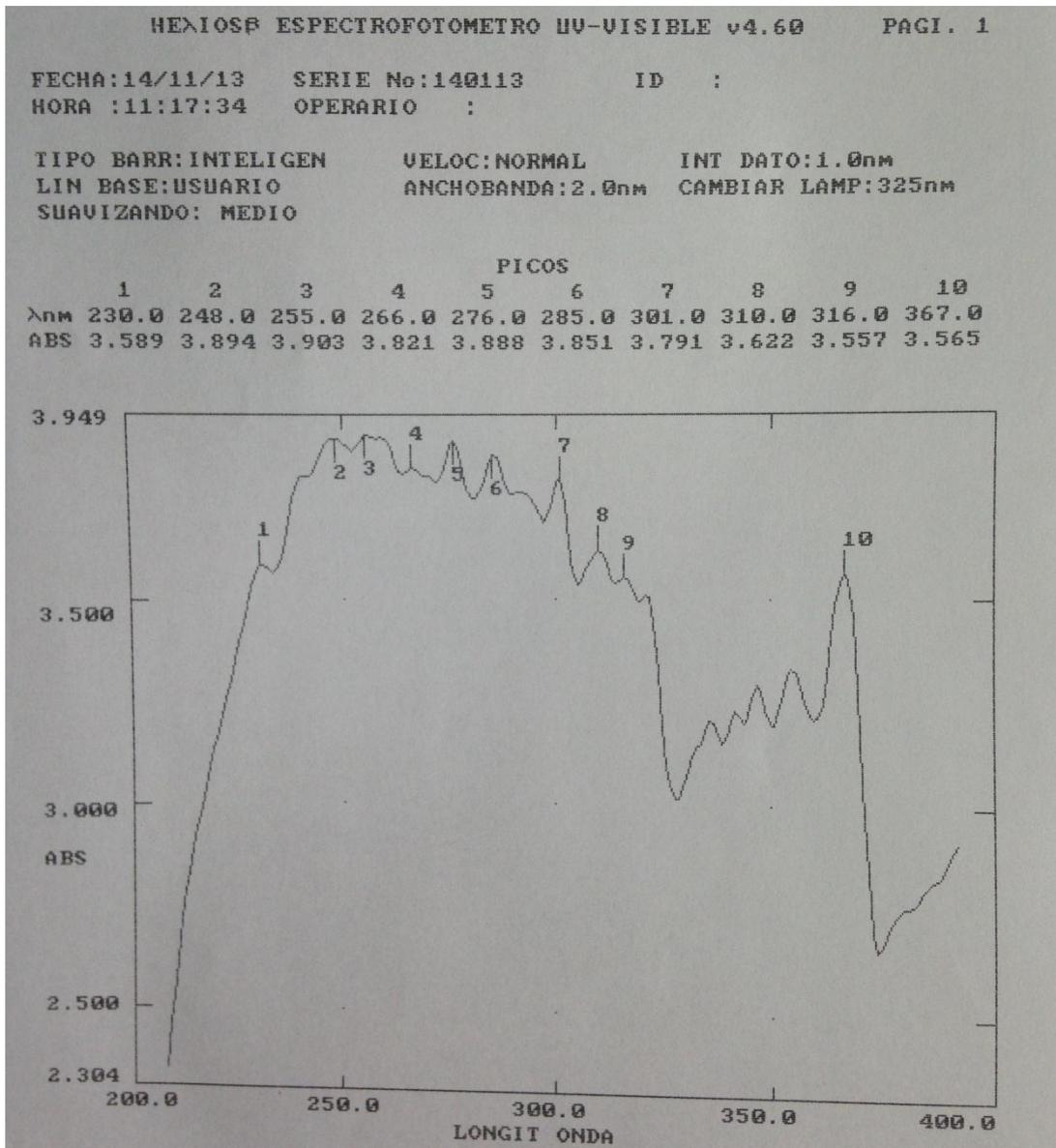


FIGURA No. 5. CROMATOGRAMA DEL BARRIDO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA MUESTRA DE PROPÓLEO DE LA ZONA DE VIRGEN DE FÁTIMA DE 200 A 400 nm.



ANEXO No. 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO DE LAS ZONAS APÍCOLAS. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT 2.1. PRUEBA ANOVA UN FACTOR Y TUKEY HSD AL 95 %

CUADRO No. 18. ANOVA UN FACTOR PARA EL PORCENTAJE DE CERA DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

05/12/2013 20:29
Anova Un Factor

Variable Respuesta: CERAS (%)
Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	775.3890	3	258.4630	67.0599	0.0005E-2
Dentro Grupos	30.8337	8	3.8542		
Total (corr.)	806.2227	11			

CUADRO No. 19. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA EL PORCENTAJE DE CERA DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Chambo	3	14.4700	X
Socorro	3	28.6200	X
Virgen de Fátima	3	32.7500	XX
Nitiluisa	3	35.2567	X

Contraste	Diferencia	+/- Límite
Socorro VS Nitiluisa	*-6.6367	*5.1323
Socorro VS Chambo	*14.1500	*5.1323
Socorro VS Virgen de Fátima	-4.1300	5.1323
Nitiluisa VS Chambo	*20.7867	*5.1323
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	2.5067	5.1323
Chambo VS Virgen de Fátima	*-18.2800	*5.1323

* Diferencia estadísticamente significativa.

CUADRO No. 20. ANOVA UN FACTOR PARA EL PORCENTAJE DE IMPUREZAS MECÁNICAS DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

05/12/2013 20:42
Anova Un Factor

Variable Respuesta: IMPUREZAS MECÁNICAS (%)
Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	147.8418	3	49.2806	21.9164	0.0003
Dentro Grupos	17.9886	8	2.2486		
Total (corr.)	165.8304	11			

CUADRO No. 21. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA EL PORCENTAJE DE IMPUREZAS MECÁNICAS DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Socorro	3	58.6667	X
Virgen de Fátima	3	66.2367	X
Nitiluisa	3	66.9667	X
Chambo	3	67.0200	X

Contraste	Diferencia	+/- Límite
Socorro VS Nitiluisa	*-8.3000	*3.9201
Socorro VS Chambo	*-8.3533	*3.9201
Socorro VS Virgen de Fátima	*-7.5700	*3.9201
Nitiluisa VS Chambo	-0.0533	3.9201
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	0.7300	3.9201
Chambo VS Virgen de Fátima	0.7833	3.9201

* Diferencia estadísticamente significativa.

CUADRO No. 22. ANOVA UN FACTOR PARA EL PORCENTAJE DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

05/12/2013 20:50

Anova Un Factor

Variable Respuesta: COMPUESTOS FENÓLICOS (%)
 Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
 Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	88.6578	3	29.5526	19.0965	0.0005
Dentro Grupos	12.3803	8	1.5475		
Total (corr.)	101.0381	11			

CUADRO No. 23. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA EL PORCENTAJE DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Nitiluisa	3	74.0467	X
Chambo	3	74.2500	X
Virgen de Fátima	3	78.6200	X
Socorro	3	80.2867	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Socorro VS Nitiluisa	*6.2400	*3.2521
Socorro VS Chambo	*6.0367	*3.2521
Socorro VS Virgen de Fátima	1.6667	3.2521
Nitiluisa VS Chambo	-0.2033	3.2521
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	*-4.5733	*3.2521
Chambo VS Virgen de Fátima	*-4.3700	*3.2521

* Diferencia estadísticamente significativa.

CUADRO No. 24. ANOVA UN FACTOR PARA EL ÍNDICE DE OXIDACIÓN DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

05/12/2013 20:56

Anova Un Factor

Variable Respuesta: ÍNDICE DE OXIDACIÓN (s)
 Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
 Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	332.2500	3	110.7500	0.0000	1.0000
Dentro Grupos	0.0000	8	0.0000		
Total (corr.)	332.2500	11			

CUADRO No. 25. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA EL ÍNDICE DE OXIDACIÓN DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Virgen de Fátima	3	122.0000	X
Socorro	3	123.0000	X
Nitiluisa	3	133.0000	X
Chambo	3	133.0000	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Socorro VS Nitiluisa	*-10.0000	*0.0000
Socorro VS Chambo	*-10.0000	*0.0000
Socorro VS Virgen de Fátima	*1.0000	*0.0000
Nitiluisa VS Chambo	*0.0000	*0.0000
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	*11.0000	*0.0000
Chambo VS Virgen de Fátima	*11.0000	*0.0000

* Diferencia estadísticamente significativa.

CUADRO No. 26. ANOVA UN FACTOR PARA EL ÍNDICE DEL YODO DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

05/12/2013 21:05

Anova Un Factor

Variable Respuesta: **ÍNDICE DE YODO (%)**
 Variable Explicativa: **ZONAS APÍCOLAS**
 Número de Casos: **12**

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	9356.5604	3	3118.8535	616.4798	0.0008E-6
Dentro Grupos	40.4731	8	5.0591		
Total (corr.)	9397.0335	11			

CUADRO No. 27. PRUEBA DE TUKEY HSD AL 95 % PARA EL ÍNDICE DEL YODO DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

Método: Tukey HSD al 95.00%

ZONAS APÍCOLAS	N	Media	Grupos Homogéneos
Chambo	3	18.6767	X
Nitiluisa	3	27.7967	X
Virgen de Fátima	3	27.9067	X
Socorro	3	88.6967	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Socorro VS Nitiluisa	*60.9000	*5.8800
Socorro VS Chambo	*70.0200	*5.8800
Socorro VS Virgen de Fátima	*60.7900	*5.8800
Nitiluisa VS Chambo	*9.1200	*5.8800
Nitiluisa VS Virgen de Fátima	-0.1100	5.8800
Chambo VS Virgen de Fátima	*-9.2300	*5.8800

* Diferencia estadísticamente significativa.

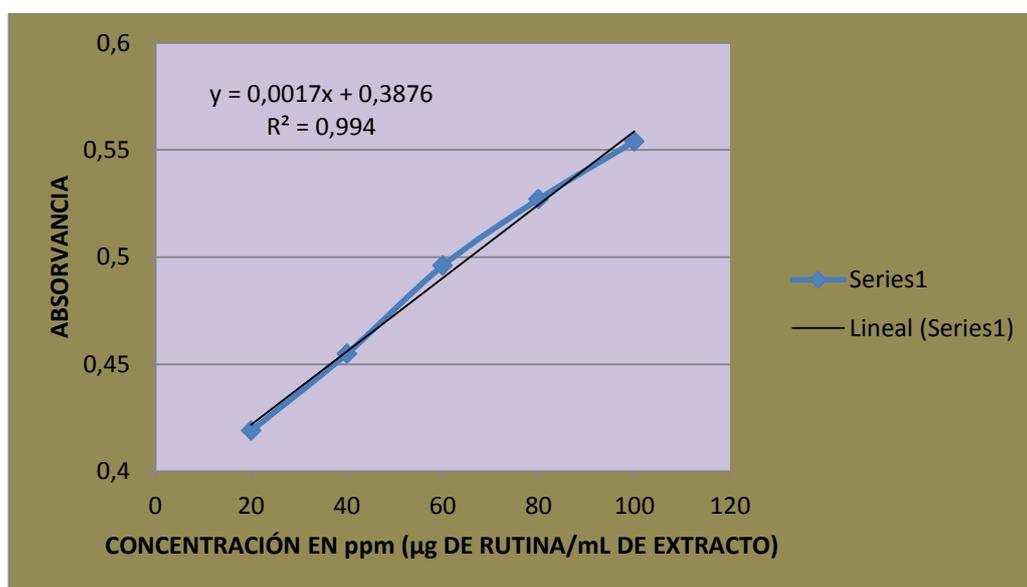
ANEXO No. 3. ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE RUTINA COMO PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.

CUADRO No. 28. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES USANDO RUTINA COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 20, 40, 60, 80 Y 100 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

Concentración (ppm)	Absorbancia a 510 nm
20	0,419
40	0,455
60	0,496
80	0,527
100	0,554

ANGULO, J. (2013)

GRÁFICO No. 14. CURVA DE ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN DE RUTINA EN CONCENTRACIONES DE 20, 40, 60, 80 Y 100 PPM, PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.



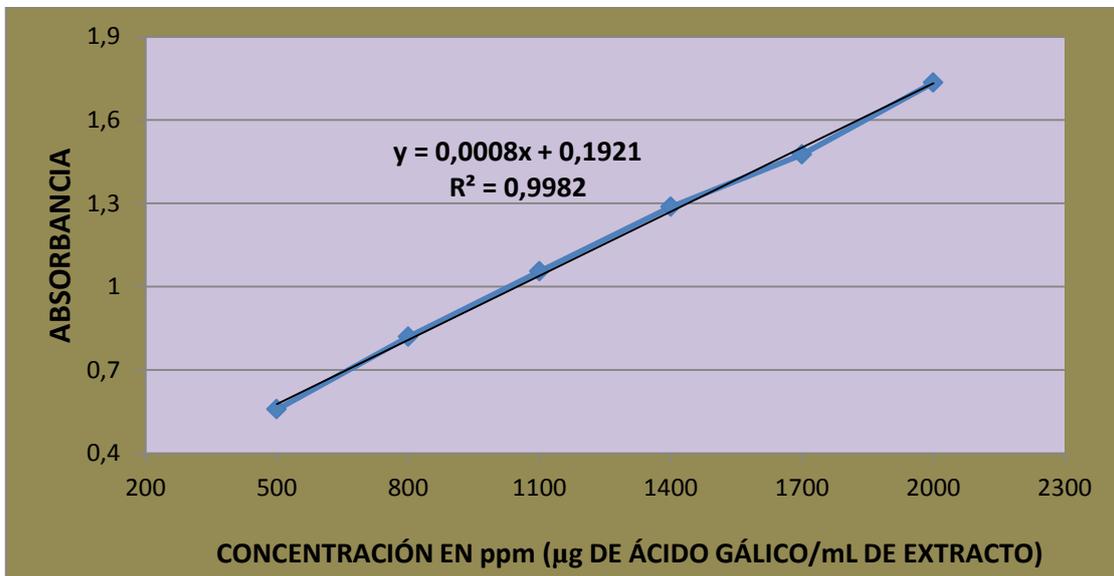
ANEXO No. 4. ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

CUADRO No. 29. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUNATIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES USANDO ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 Y 2 000 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

Concentración (ppm)	Absorbancia a 765 nm
500	0,558
800	0,819
1 100	1,055
1 400	1,287
1 700	1,476
2 000	1,735

ANGULO, J. (2013)

GRÁFICO No. 15. CURVA DE ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO EN CONCENTRACIONES DE 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 Y 2 000 PPM PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.



ANEXO No. 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES DE LAS MUESTRAS DE LAS ZONAS APÍCOLAS. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT 2.1.

CUADRO No. 30. ANOVA UN FACTOR PARA LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

05/12/2013 21:22

Anova Un Factor

Variable Respuesta: FLAVONOIDES TOTALES
Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	20483.3333	3	6827.7778	5852.3810	0.0001E-9
Dentro Grupos	9.3333	8	1.1667		
Total (corr.)	20492.6667	11			

ANEXO No. 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES DE LAS MUESTRAS DE LAS ZONAS APÍCOLAS. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT 2.1.

CUADRO No. 31. ANOVA UN FACTOR PARA LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES DE LAS ZONAS APÍCOLAS.

05/12/2013 21:45

Anova Un Factor

Variable Respuesta: COMPUESTOS FENÓLICOS
Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	2176713.5833	3	725571.1944	24665.3097	0.0003E-12
Dentro Grupos	235.3333	8	29.4167		
Total (corr.)	2176948.9167	11			

ANEXO No. 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 10 ppm. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT 2.1.

CUADRO No. 32. ANOVA UN FACTOR PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 10 ppm.

05/12/2013 22:01

Anova Un Factor

Variable Respuesta: % de Inhibición [10ppm]
Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	950.4684	3	316.8228	98.6337	0.0001E-2
Dentro Grupos	25.6969	8	3.2121		
Total (corr.)	976.1654	11			

ANEXO No. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 100 ppm. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT 2.1.

CUADRO No. 33. ANOVA UN FACTOR PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 100 ppm.

05/12/2013 22:08

Anova Un Factor

Variable Respuesta: % de Inhibición [100 ppm]
Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	568.6415	3	189.5472	60.9712	0.0007E-2
Dentro Grupos	24.8704	8	3.1088		
Total (corr.)	593.5119	11			

ANEXO No. 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 1 000 ppm. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT 2.1.

CUADRO No. 34. ANOVA UN FACTOR PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MUESTRA A 1 000 ppm.

05/12/2013 22:12

Anova Un Factor

Variable Respuesta: % de Inhibición [1000 ppm]
 Variable Explicativa: ZONAS APÍCOLAS
 Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	7276.7612	3	2425.5871	60.9744	0.0007E-2
Dentro Grupos	318.2435	8	39.7804		
Total (corr.)	7595.0047	11			

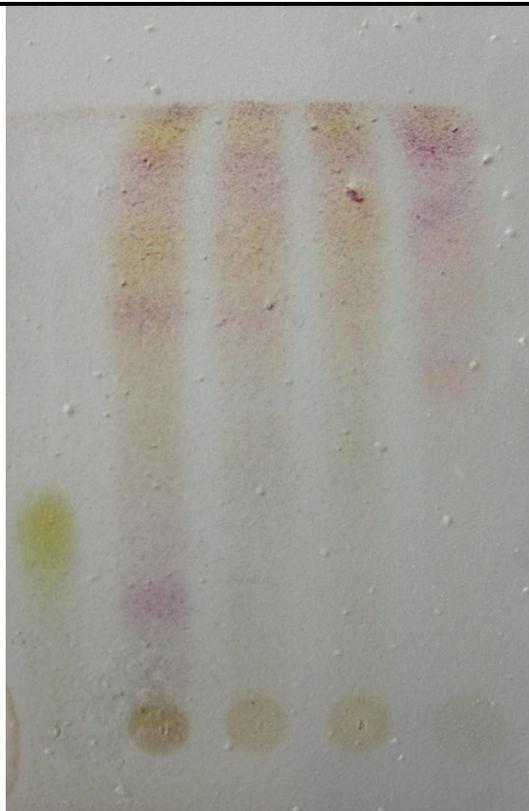
ANEXO No. 10. TAMIZAJE FITOQUÍMICO REALIZADO POR NURIA, Y., EN EL INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS

CUADRO No. 35. TAMIZAJE FITOQUÍMICO REALIZADO POR NURIA, Y., EN EL INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS

Tamizaje Fitoquímico		
Resinas	+	+
Liebermann-Burchard (Triterpenos y/o esteroides)	+	+
Espuma (Saponina)	-	-
Ninhidrina (Aminoácidos)	-	-
Dragendorff (Alcaloides)	-	-
Kedde (Cardiotónicos)	-	-
Fehling (Carbohidratos reductores)	+	+
Baljet (Coumarinas)	+	+
Tricloruro de Hierro (Fenoles y/o taninos)	+	+
Borntrager (Quinonas)	+	+
Shinoda (Flavonoides)	+	+
Antocianidinas (Estructuras de flavonoides de secuencia C6-C3-C6)	+	+

ANEXO No. 11. PLACA CROMATOGRÁFICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS. .

**TLC - EXTRACTO DE PROPÓLEO DE CHIMBORAZO Y
GUAYAS.**



Fase Estacionaria: Sílica gel 60 HF₂₅₄

Muestra: Extracto etanólico de Propóleo

Solventes: Cloroformo – Acetona – Ácido fórmico (75:16,5:8,5 en v/v)

Revelador: Vainillina – Ácido sulfúrico

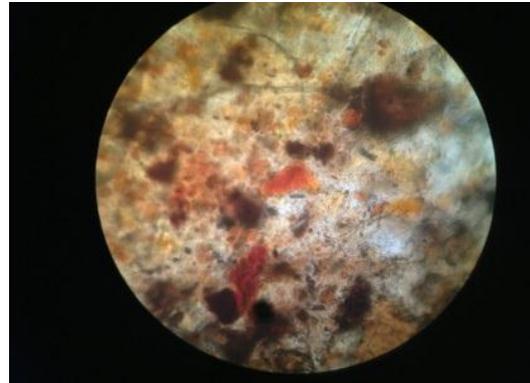
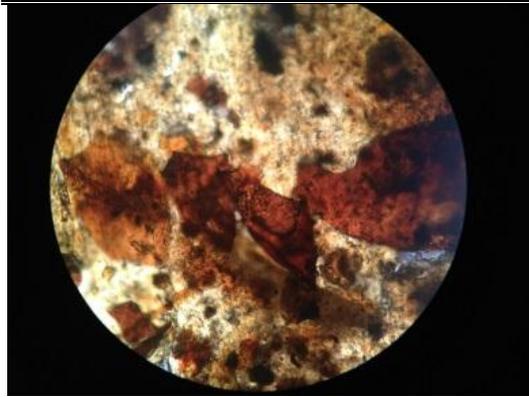
FOTOGRAFÍA No. 5. PLACA CROMATOGRÁFICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

ANEXO No. 12. RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO.



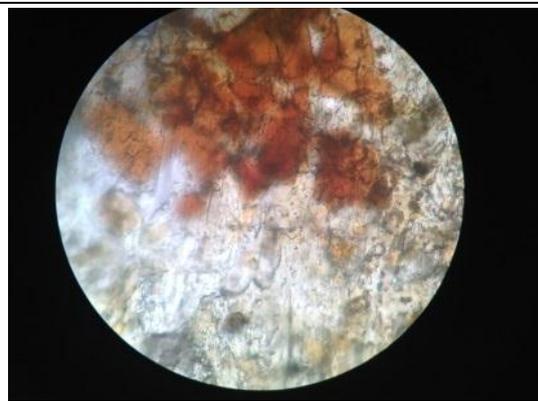
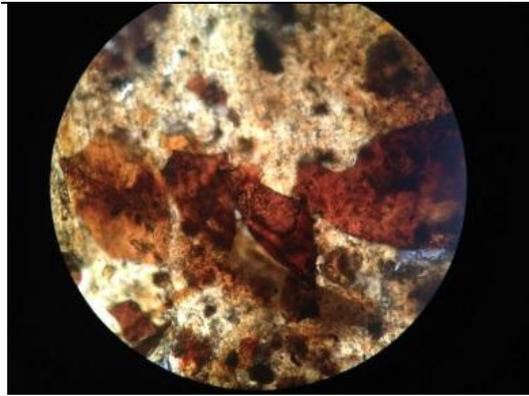
FOTOGRAFÍA No. 6. RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO

ANEXO No. 13. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEOS DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS.



SOCORRO

NITILUISA



CHAMBO

VIRGEN DE FÁTIMA

FOTOGRAFÍA No. 7. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO DE LAS CUATRO ZONAS APÍCOLAS CON EL LENTE DE 40 X

ANEXO No. 14. CONTROL DE CALIDAD DEL PROPÓLEO.



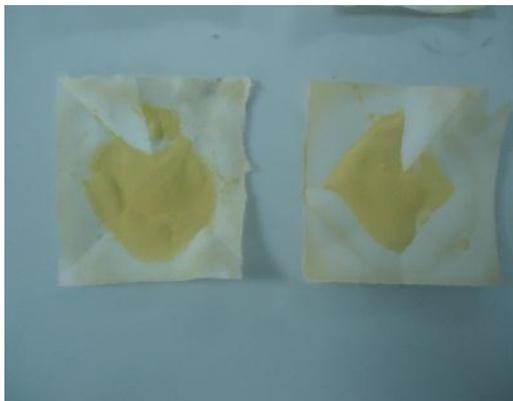
CERAS

IMPUREZAS MECÁNICAS



ÍNDICE DE OXIDACIÓN

FLAVONOIDES



CONTENIDO DE FLAVONOIDES

ÍNDICE DE YODO

FOTOGRAFÍA No. 8. PRUEBAS FÍSICO – QUÍMICAS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DEL PROPÓLEO.

ANEXO No. 15. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.



EXTRACTOS ETANÓLICOS



CENIZAS TOTALES



**CENIZAS SOLUBLES EN H₂O E
INSOLUBLES EN HCl**



ÍNDICE DE REFRACCIÓN



DENSIDAD RELATIVA



pH

FOTOGRAFÍA No. 9. PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

ANEXO No. 16. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.



ENSAYO DE RESINAS



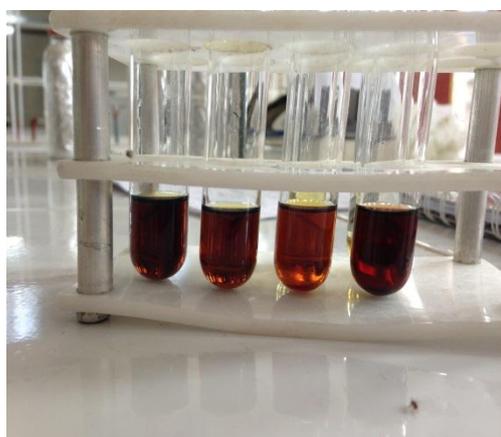
ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS



ENSAYO DE BORNTRAGER



ENSAYO DE FEHLING



ENSAYO DE FeCl₃



ENSAYO DE CATEQUINAS

FOTOGRAFÍA No. 10. ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LOS EXTRACTOS.

ANEXO No. 17. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES.



PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS



ENSAYO DE FOLIN-CIOCALTEAU



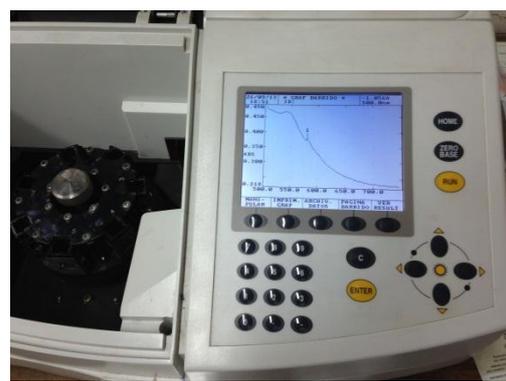
PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN



ENSAYO DE AlCl₃



PATRÓN DE RUTINA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN



MEDICIÓN DE LA ABSORVANCIA A 765 nm PARA FOLIN Y 520 nm PARA AlCl₃

ANEXO No. 18. EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA PPO



**EXTRACCIÓN DE LA PULPA DE LA
MANZANA**



**PESADO DE LA PULPA DE LA
MANZANA**



FILTRACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO



MANTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO EN BAÑO DE HIELOS

FOTOGRAFÍA No. 12. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LA PPO.