

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES Y CONTROL FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE SOLUCIONES ORALES DE PROPÓLEOS EXPENDIDOS EN CASAS NATURISTAS DEL DISTRITO DEL CUSCO

Presentado por:

Br. Noemi Apaza Llamocca

Br. Lidia Huamani Huayhua

**Para optar al título profesional de
Químico Farmacéutico**

Asesora:

Dra. Carla del Carpio Jiménez

Cusco - Perú

2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES Y CONTROL FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE SOLUCIONES ORALES DE PROPÓLEOS EXPENDIDOS EN CASAS NATURISTAS DEL DISTRITO DEL CUSCO

presentado por: NOEMI APAZA LLAMOCA con DNI Nro.: 46506612

presentado por: LIDIA HUAMANÍ HUAYHUA con DNI Nro.: 70480505

para optar el título profesional/grado académico de QUÍMICO FARMACÉUTICO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por ⁰³ veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de ⁹.....%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 28 de AGOSTO de 2023

Firma

Post firma... CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ

Nro. de DNI... 23945000

ORCID del Asesor... <https://orcid.org/0000-0001-7487-354X>

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid:27259:259121979

NOMBRE DEL TRABAJO

**TESIS FINAL LIDIA HUAMANÍ Y NOEMÍ A
PAZA V-2.pdf**

AUTOR

Carla Del Carpio

RECUENTO DE PALABRAS

29286 Words

RECUENTO DE CARACTERES

169204 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

142 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.2MB

FECHA DE ENTREGA

Aug 31, 2023 7:33 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Aug 31, 2023 7:36 PM GMT-5**● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 14 palabras)
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente

DEDICATORIA

✚ *A mi querida madre Tomasa Llamocca por ser mi fortaleza y ejemplo de esfuerzo a seguir, por alentarme en los momentos que más lo necesite, por creer en mí, por enseñarme a ser una mujer valiente, que nunca se rinde, porque eres el reflejo de amor de Dios y por darme la oportunidad de ser profesional.*

✚ *A mi padre Jenuario Apaza por ser el apoyo incondicional, por su comprensión y por ser un ejemplo de humildad y sacrificio que me permitió culminar exitosamente este proyecto.*

✚ *A mis hermanos Reyner, Yarita, Walker y Sheila, que son muy importantes para mí, por su cariño, apoyo incondicional, su comprensión y palabras de aliento que me incentivaron a culminar con este proyecto.*

✚ *A mis amigas Sol y Ruth por su apoyo incondicional, sus palabras de fortaleza y aliento cuando más lo necesitaba, por ser esas personas que sin esperar nada a cambio siempre me incentivan a ser una mejor persona.*

✚ *A todas las personas que aportaron palabras de aliento, conocimiento y apoyo de diferentes formas*

Noemi Apaza Llamocca

DEDICATORIA

✚ *La presente tesis está dedicada a Dios y a mis padres Macaria y Fabian ya que gracias a ellos pude concluir mi carrera y por brindarme consejos y apoyo incondicional para hacer de mí una mejor persona.*

✚ *A mis hermanos Aguedo, Eulalia, Percy, Aurelia y Erica por ser el sostén en mi formación, con sus consejos y apoyo incondicional que me brindaron en cada paso de mi formación profesional y personal.*

✚ *A mis hijos Thiago y Said por ser la fuerza e inspiración para lograr cada uno de mis objetivos.*

✚ *A Omar por sus palabras y confianza, por su amor y brindarme el apoyo en mi crecimiento profesional.*

✚ *A mis amigas y compañeros por haber compartido todo el desarrollo profesional y a todas las personas que de uno u otro modo han contribuido en el logro de mis objetivos.*

Lidia Huamani Huayhua

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A nuestra asesora Dra. Carla del Carpio Jiménez por su orientación, su experiencia, su tiempo brindado, la apertura de los laboratorios y materiales brindados para realizar este trabajo de investigación.

- ❖ Al Mgt. Ing. Químico Luis Enrique Cruz Gutiérrez por brindarnos los materiales y el apoyo incondicional que necesitamos para nuestra investigación.

- ❖ A todos los docentes de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica por su dedicación y enseñanza en el transcurso de nuestra formación académica.

- ❖ Al personal administrativo de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica por su apoyo en la orientación durante los trámites requeridos.

Índice

Índice.....	iv
Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
Abreviaturas	xiv
Introducción.....	1
Capítulo I.....	3
1. Generalidades.....	3
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Formulación del problema.....	4
1.4. Objetivos.....	4
1.4.1. Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos.....	4
1.5. Justificación.....	5
1.6. Hipótesis.....	6
Capítulo II. Marco teórico.....	7
2.1. Antecedentes del estudio.....	7
2.1.1. Antecedentes internacionales.....	7
2.1.2. Antecedentes nacionales.....	11
2.1.3. Antecedentes locales.....	12
2.2. Bases teóricas.....	14
2.2.1. Propóleo.....	14
2.2.2. Origen.....	14
2.2.3. Funciones del propóleo para las abejas.....	15
2.2.4. Composición química.....	15
2.2.5. Propiedades del propóleo.....	17
2.2.6. Propiedades terapéuticas.....	18
2.2.6.1. Capacidad antibacteriana.....	18
2.2.6.2. Capacidad antiviral.....	18
2.2.6.3. Capacidad cicatrizante y antiinflamatoria.....	19

2.2.6.4.	Capacidad inmunomoduladora.....	19
2.2.6.5.	Capacidad antioxidante.....	19
2.2.6.6.	Capacidad antifúngica.....	20
2.2.7.	Polifenoles.....	21
2.2.7.1	Estructura química y clases.....	21
2.2.7.1.1.	Biosíntesis.....	23
2.2.7.2.	Propiedades benéficas a nivel cardiocirculatorio.....	24
2.2.8.	Flavonoides.....	26
2.2.8.1.	Clasificación.....	26
2.2.8.2.	Farmacocinética.....	27
2.2.8.3.	Propiedades.....	28
2.2.8.4.	Actividad farmacológica.....	29
2.2.8.5.	Acción antioxidante.....	29
2.2.8.6.	Mecanismos antioxidantes.....	30
2.2.9.	Control de calidad.....	31
2.2.9.1.	Control de calidad microbiológico.....	31
2.2.10.	Microorganismos aerobios.....	33
2.2.10.1.	Hongos y levaduras.....	33
2.2.11.	Características organolépticas.....	33
2.2.12.	Control de calidad fisicoquímico.....	34
2.2.12.1.	pH.....	34
2.2.12.2.	Densidad.....	34
2.2.13.	Tiendas naturistas.....	35
2.3.	Glosario de términos.....	36
Capítulo III.	Materiales y métodos.....	38
3.1.	Materiales.....	38
3.1.1.	Material para evaluar.....	38
3.1.2.	Material de laboratorio.....	38
3.1.3.	Equipos de laboratorio.....	38
3.1.4.	Reactivos.....	39
3.1.4.1.	Reactivos para determinar polifenoles.....	39
3.1.4.2.	Reactivos para determinar flavonoides.....	39
3.1.4.3.	Reactivos para determinar la actividad antioxidante.....	39
3.1.5.	Medios de cultivo.....	39

3.2. Diseño metodológico	40
3.2.1. Nivel y tipo de investigación	40
3.2.2. Diseño de la investigación.....	40
3.3. Población y muestra	40
3.3.1. Población	40
3.3.2. Tamaño de muestra	40
3.4. Criterios de inclusión y exclusión.....	40
3.4.1. Criterios de inclusión	40
3.4.2. Criterios de exclusión	41
3.5. Variables implicadas.....	41
3.5.1. Actividad antioxidante	41
3.5.2. Cuantificación de polifenoles.....	41
3.5.3. Cuantificación de flavonoides.....	42
3.5.4. Control fisicoquímico	42
3.5.7. Control de calidad microbiológico	50
3.6. Operacionalización de variables.....	52
3.7. Procedimiento el procedimiento	53
3.7.1. Determinación de la actividad antioxidante con el radical libre DPPH	53
3.7.2. Determinación de la capacidad antioxidante.....	54
3.7.2.1. Determinación del porcentaje de captación del DPPH (%C).....	55
3.7.3. Identificación de compuestos fenólicos	56
3.7.3.1. Determinación de polifenoles	56
3.7.4. Identificación de compuestos flavonoides	57
3.7.5. Análisis fisicoquímico	58
3.7.5.1. pH.....	58
3.7.5.2. Densidad	58
3.7.5.3. Características organolépticas	59
3.7.5.4. Calidad del rotulo y envase	59
3.7.6. Control microbiológico.....	61
3.7.6.1. Preparación de la dilución de trabajo	61
3.7.6.2. Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	61
3.7.6.3. Recuento total combinado de hongos filamentoso y levaduras.	62
3.7.6.4. Identificación de Coliformes Totales (<i>E. coli</i>).....	62
Capitulo IV. Resultados	63

4.1.	De la actividad antioxidante.....	63
4.1.1.	Curva de calibración con Trolox.....	63
4.1.2.	Determinación del coeficiente de inhibición al 50% (IC₅₀) del trolox	64
4.1.3.	Porcentaje de captación de DPPH en soluciones de propóleo.....	64
4.2.	Del contenido de polifenoles totales.....	67
4.2.1.	Curva de calibración con ácido gálico.....	67
4.2.2.	Ensayos de cuantificación de polifenoles totales.....	69
4.3.	Del contenido de flavonoides totales.....	71
4.3.1.	Curva de calibración con quercetina dihidratada.....	71
4.3.2.	Ensayos de cuantificación de flavonoides totales.....	72
4.4.	De los ensayos fisicoquímicos.....	74
4.5.	Del control microbiológico.....	75
4.6.	Del análisis organoléptico.....	78
4.7.	De la verificación en la calidad de los rótulos y envases.....	80
	Conclusiones.....	85
	Recomendaciones.....	87
	Bibliografía.....	88
	Anexos.....	94
	Anexo 1: Registro de tiendas naturistas del distrito del Cusco.....	94
	Anexo 2: Formato de encuesta realizada a establecimientos farmacéuticos del distrito del Cusco.....	95
	Anexo 3: Formato de reporte de resultados de control organoléptico de soluciones orales de propóleos.....	96
	Anexo 4: Formato de reporte de resultados de la cuantificación de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante de las soluciones orales de propóleo.....	97
	Anexo 5: Formato de reporte de resultados de la evaluación microbiológica de las soluciones orales de propóleos.....	98
	Anexo 6: Formato de la relación de muestras de soluciones orales de propóleos por orden de adquisición.....	99
	Anexo 7: Norma IRAM 15935-1-Propóleos bruto.....	100
	Anexo 8: Norma mexicana NOM-003-SAG/GAN - 2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.....	102

Anexo 9: Norma Sanitaria que establece criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.....	111
Anexo 10: Resultados del análisis microbiológicos	114
Anexo 11: Archivo fotográfico.....	121

Índice de figuras

Figura 1: Principales unidades estructurales de compuestos fenólicos	22
Figura 2: Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles.....	23
Figura 3: Esquema de la ruta biocinética de los polifenoles en las plantas CoA-Coenzima A.....	24
Figura 4: Relaciones estructurales de algunos flavonoides distribuidos en la naturaleza y sus compuestos relacionados.....	28
Figura 5: Fundamento de la capacidad antioxidante	54
Figura 6: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón trolox versus sus valores de absorbancia	63
Figura 7: Gráfico de dispersión con los valores del porcentaje de captación de las soluciones orales de propóleo, de acuerdo a diversas concentraciones	65
Figura 8: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de los porcentajes de captación de DPPH versus diversas concentraciones de soluciones de propóleo	65
Figura 9: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón ácido gálico versus sus valores de absorbancia	68
Figura 10: Gráfico de dispersión mostrando los valores teóricos promedio del contenido de polifenoles totales para cada muestra.	70
Figura 11: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón quercetina dihidratada versus sus valores de absorbancia.....	71
Figura 12: Gráfico de dispersión mostrando los valores teóricos promedio del contenido de flavonoides totales para cada muestra.	73
Figura 13: Gráfico de barras con los porcentajes de cumplimiento de los indicadores microbiológicos, respecto a las muestras	76
Figura 14: Gráfico de barras con los porcentajes de cumplimiento de las especificaciones en cuanto a las características organolépticas.....	79
Figura 15: Porcentaje de las muestras evaluadas que cumplen con los parámetros de calidad en cuanto a la rotulación	81

Índice de tablas

Tabla 1: Alícuotas de las muestras de soluciones orales de propóleo	53
Tabla 2: Diluciones de las muestras para la capacidad antioxidante	55
Tabla 3: Procedimiento para la elaboración de curva patrón ácido gálico	56
Tabla 4: Porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de Trolox	63
Tabla 5: Resultados de porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de las soluciones orales de propóleo	64
Tabla 6: Ecuaciones usadas para determinar el IC ₅₀	66
Tabla 7: Valores de IC ₅₀ calculados para cada solución de propóleo analizado	66
Tabla 8: Resultados de las absorbancias del estándar de ácido gálico	67
Tabla 9: Valores de absorbancia de las soluciones orales de propóleo para determinar el contenido de polifenoles totales.	69
Tabla 10: Valores teóricos del contenido de polifenoles totales en las soluciones orales de propóleos.....	69
Tabla 11: Resultados de las absorbancias del estándar de quercetina dihidratada	71
Tabla 12: Valores de absorbancia de las soluciones orales de propóleo para determinar el contenido de flavonoides totales.	72
Tabla 13: Valores teóricos del contenido de flavonoides en las soluciones orales de propóleos.....	73
Tabla 14: Resumen de la evaluación del control fisicoquímico de las soluciones orales de propóleos.....	74
Tabla 15: Resultados de los controles microbiológicos de las soluciones de propóleo	75
Tabla 16: Resultados del cumplimiento de límites microbianos en las muestras	76
Tabla 17: Resumen de la evaluación del control organoléptico de las soluciones orales de propóleos.....	78
Tabla 18: Tabla de frecuencias del cumplimiento de las especificaciones en cuanto a las características organolépticas.....	78

Tabla 19: Evaluación de los parámetros de rotulación en las muestras de soluciones orales de propóleos.	80
Tabla 20: Frecuencia de los parámetros presentes en el rótulo de las muestras	81
Tabla 21: Evaluación del envase de las soluciones orales de propóleos	83
Tabla 22: Tabla de frecuencias donde se aprecia la cantidad de muestras que cumplen con parámetros en cuanto al envase	83

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante, cuantificar el contenido de polifenoles y flavonoides totales, evaluar parámetros fisicoquímicos, microbiológicos de las soluciones orales de propóleo que se expenden en casas naturistas del distrito del Cusco. Se planteó un estudio con alcance descriptivo, enfoque cuantitativo y diseño transversal. Se usaron los siguientes métodos: Para la actividad antioxidante se usó el método de DPPH, el contenido total de polifenoles el método de Folin-Ciocalteu, los flavonoides se usó el método modificado de Woisky y Salatino. En los parámetros fisicoquímicos, se evaluó la densidad y el pH. En los ensayos microbiológicos, se evaluó la presencia de microorganismos aerobios mesófilos viables, hongos y levaduras; e identificación de *Salmonella* spp y *Escherichia coli*.

Los resultados evidenciaron que la muestra C = 2.600, posee mayor capacidad antioxidante que las otras muestras de soluciones orales de propóleo; en cuanto a la cantidad de polifenoles la muestra A = 0.2280 es quien presenta mayor concentración y en cuanto a los flavonoides totales, la muestra A = 1.7626, presenta mayor concentración y las demás muestras alcanzaron niveles óptimos. Asimismo, para el control microbiológico no hubo crecimiento microbiano, los valores de pH son para la muestra A 5.23, B 4.84, C 4.72, D 4.65 y los valores de la densidad son A = 0.86, B=0.84, C=0.80, D=0.85. En cuanto a los análisis organolépticos de olor A, B, C son balsámico y D resinoso, en cuanto al color A y C son amarillos B marrón y D pardo; sabor A y D son amargos, B es fuerte picante y C es agradable y suave. En conclusión, se determinó que las soluciones orales de propóleos presentan actividad antioxidante por lo que las cantidades de polifenoles y flavonoides totales se encuentran dentro del rango aceptable establecido por la norma, en los ensayos fisicoquímico están dentro de las especificaciones para este tipo de soluciones. En el análisis organoléptico cumplen con lo establecido en la norma.

Palabras Clave: Actividad antioxidante, polifenoles, flavonoides, fisicoquímico, microbiológico

Abstract

The present research aimed to evaluate the antioxidant activity, quantify the total content of polyphenols and flavonoids, assess the physicochemical and microbiological parameters of the oral propolis solutions which are sold in health food stores in Cusco district. To achieve this, a descriptive study with a quantitative approach and cross-sectional design was conducted. The following methods were employed: the DPPH method was used for antioxidant activity assessment, the Folin-Ciocalteu method with gallic acid as a standard was used for quantifying the total content of polyphenols, and the modified Woisky and Salatino method with quercetin dihydrate as a standard was used for quantifying the total content of flavonoids. Regarding the physicochemical parameters, the density and pH of each sample were evaluated. Microbiological tests included assessing the presence of viable mesophilic aerobic microorganisms, fungi, yeasts, as well as identification of *Salmonella* spp and *Escherichia coli*.

The results showed that sample C = 2,600 has a greater antioxidant capacity than the other samples of oral propolis solutions; Regarding the amount of polyphenols, sample A = 0.2280 is the one with the highest concentration and in terms of total flavonoids, sample A = 1.7626, presents the highest concentration and the other samples reached optimal levels. Likewise, for the microbiological control there was no microbial growth, the pH values are for the sample A 5.23, B 4.84, C 4.72, D 4.65 and the density values are A = 0.86, B=0.84, C=0.80, D =0.85. Regarding the organoleptic analysis of odor, A, B, C are balsamic and D resinous, regarding to color A and C are yellow B brown and D brown; Taste A and D are bitter, B is sharp, and C is nice and smooth. In conclusion, it was determined that oral solutions of propolis have antioxidant activity, so the amounts of total polyphenols and flavonoids are within the acceptable range established by the standard, the physicochemical tests are within the specifications for this type of solutions. The organoleptic analysis fulfill the established in the regulation.

Keywords: Antioxidant activity, polyphenols, flavonoids, physicochemical, microbiological.

Abreviaturas

ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
DIGEMID	Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas
DIGESA	Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidracilo
FRAP	Poder Antioxidante de Reducción Férrica
HPLC-UV	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con detector ultravioleta
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IRAM	Instituto de Racionalización Argentino de Materiales
NSO	Notificación Sanitaria Obligatoria
OMS	Organización Mundial de la Salud
USP-NF	Farmacopea de los Estados Unidos – Formulario Nacional

Introducción

El uso del propóleo con fines curativos no es algo reciente, ya que las antiguas civilizaciones de Egipto y Grecia ya conocían sus propiedades antisépticas y cicatrizantes, utilizándolo para combatir diversas enfermedades. Incluso en su libro "Historia de Animales", Aristóteles menciona esta sustancia como un "remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones". En la mitología romana, el propóleo también tuvo gran importancia, y se cuenta que Júpiter transformó a la hermosa Melisa en una abeja para que pudiera producir una sustancia curativa milagrosa conocida como "Própolis".

En el antiguo Perú, los incas utilizaban esta sustancia para tratar la fiebre mucho antes de la llegada de los españoles a América. Durante las guerras de los Bóers en Sudáfrica en 1899 y la revolución rusa de 1917, se utilizó una mezcla de propóleo y vaselina llamada "propóleo vasógeno" para curar las heridas de guerra (1).

En los últimos estudios, principalmente llevados a cabo en China, se ha descubierto la efectividad del propóleo en el tratamiento de la hipertensión, la arterioesclerosis y las enfermedades cardíacas. También se han realizado investigaciones en América, Polonia y Rusia que han demostrado cómo el propóleo pudo tratar enfermedades como el herpes, la urticaria, el acné, la formación de abscesos y otras afecciones de la piel. Además, se encontró que el propóleo combatió ciertos tipos de hongos, levaduras y bacterias, convirtiéndolo en un aliado para tratar la otitis, la faringitis, la sinusitis, las infecciones urinarias y la periodontitis.

Los estudios realizados en las últimas décadas en todo el mundo para investigar las propiedades biológicas del propóleo han demostrado que los compuestos fenólicos presentes en él son responsables de su acción farmacológica, incluyendo propiedades antibióticas, fungicidas, antivirales y anticancerígenas. El objetivo de este estudio de investigación fue evaluar la calidad de los productos fitoterapéuticos que se elaboraron a base de propóleos y se comercializaron en las tiendas naturistas del distrito de Cusco. Se realizaron estudios de control fisicoquímico y microbiológico, además de cuantificar los principales metabolitos secundarios, polifenoles y flavonoides presentes en

dichos productos fitoterapéuticos. Estos componentes, responsables de la actividad antioxidante de los productos, brindaron información científica sobre su calidad a los consumidores, de acuerdo con el código alimentario argentino (2).

Capítulo I.

1. Generalidades

1.2. Planteamiento del problema

El propóleo, una sustancia compleja compuesta por diversos compuestos químicos, muestra una composición variable que depende de su origen. Se reconoce que uno de los aspectos más relevantes del propóleo es su capacidad antibacteriana, atribuida principalmente a los flavonoides. Tanto el propóleo como la miel han sido utilizados desde tiempos antiguos por distintas culturas con diferentes propósitos. Sin embargo, con los avances en farmacología y terapias herbales, ha surgido un renovado interés en su empleo. En consecuencia, en los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre los productos derivados de las abejas y sus posibles beneficios para la salud (3).

El Perú es sede de este evento con su enorme mercado de productos naturales. Estos productos son fabricados en un laboratorio fitofarmacéutico con el apoyo de distribuidores locales e internacionales. Las personas no autorizadas a menudo utilizan recursos peligrosos como herramientas y no han sido capacitados en esta área. Estas condiciones pueden cuestionar la calidad del producto y afectar la salud de las personas, por tal motivo la OMS ha desarrollado un marco regulatorio para el uso de los recursos naturales (4).

Es importante aclarar la base legal que actualmente regula el comercio de recursos naturales a nivel nacional e internacional. Muchos de estos productos a base de hierbas y productos naturales se venden y, en algunos casos, se venden de manera incorrecta e inadecuada. Los medicamentos a base de plantas y productos naturales deben supervisarse adecuadamente para garantizar que las personas que consumen estos productos no sean defraudadas mediante el uso de productos de origen desconocido, ni sufran daños materiales (4).

Si bien existen estudios realizados en nuestro país acerca de la composición del propóleo, el problema es que en el distrito del Cusco no existen estudios de la composición de los compuestos de distintos productos a base de propóleo, por lo

tanto existe la desconfianza que estos cumplan con los controles de calidad para su comercialización; además de garantizar y asegurar los estándares de calidad requeridos por la DIGEMID (5), el presente trabajo de investigación tuvo por finalidad la evaluación del cumplimiento de la calidad del producto, comprobando la existencia de estos principales metabolitos mediante la cuantificación de polifenoles y flavonoides, así como comprobar la actividad antioxidante mediante el método del radical libre DPPH, el control fisicoquímico se evaluó mediante distintos instrumentos de laboratorio y el control microbiológico, este se evaluó por distintos medios de cultivos, y así se pudo garantizar mediante los estudios la calidad del producto utilizando criterios de evaluación de normativa argentina referencial (6), y de esta forma se verificó la calidad y autenticidad del producto comercializado en el distrito del Cusco.

1.3. Formulación del problema

¿Cuáles serán los valores de la actividad antioxidante, cantidad de polifenoles y flavonoides, y los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las soluciones orales de propóleos expendidos en las casas naturistas del distrito del Cusco?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante, cuantificar los polifenoles y flavonoides y evaluar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las soluciones orales de propóleos expendidos en las casas naturistas del distrito del Cusco

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antioxidante de las soluciones orales de propóleos expendidos en las casas naturistas del distrito del Cusco.
2. Cuantificar el contenido total de polifenoles presentes en las soluciones orales de propóleos expendidos en las casas naturistas del distrito del Cusco
3. Cuantificar el contenido de flavonoides presentes en las soluciones orales de propóleos expendidos en las casas naturistas del distrito del Cusco

4. Realizar los ensayos fisicoquímicos de densidad y pH, análisis organoléptico y cumplimiento de la normativa vigente en materia de rótulos y envases, de las soluciones orales de propóleos expendidos en las casas naturistas del distrito del Cusco
5. Realizar el control microbiológico para determinar la ausencia de microorganismos aerobios mesófilos, hongos filamentosos y levaduras, *Escherichia coli* y *Salmonella*

1.5. Justificación

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antioxidante, medir los niveles de polifenoles y flavonoides, así como realizar un control fisicoquímico y microbiológico de las soluciones orales de propóleo. Estos productos se utilizan comúnmente como alternativa de tratamiento debido a sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, entre otras. Dichas propiedades están estrechamente vinculadas a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en la composición de estas soluciones, por lo que resulta fundamental demostrar su existencia para garantizar su actividad antioxidante.

La amplia utilización de este producto en la industria y la diversidad de su composición química han impulsado la implementación de controles de calidad y la estandarización de sus ingredientes activos. Para lograrlo, se han desarrollado diversos estándares internacionales, entre los que se incluyen el Estándar PCT Russian Branch 317-1977, la Norma del Ministerio de la Agricultura de Cuba-1994, las Normas técnicas del Ministerio de la Agricultura de Brasil-1999 para la determinación de la identidad y calidad del propóleo, y la Norma IRAM-NOA-2008 del Instituto Argentino de Normalización y Certificación, específicamente el Subcomité de Productos Agrícolas. Esta última es la versión más actualizada y se utiliza para evaluar la calidad química de los propóleos analizados.

De esta forma, brindar información sobre la composición de los productos que se expenden en las casas naturistas del distrito del Cusco contribuye a demostrar la actividad antioxidante de estos productos en nuestro distrito.

Nuestra investigación tuvo como objetivo principal analizar las soluciones orales de propóleos en relación con su control de calidad bajo diversos parámetros.

1.6. Hipótesis

La actividad antioxidante, cantidad de polifenoles y flavonoides, y el control de calidad fisicoquímico y microbiológico de las soluciones orales de propóleo expendidas en casas naturistas del distrito del Cusco, cumplen lo establecido en la normativa correspondiente.

Capítulo II. Marco teórico

2.1. Antecedentes del estudio

2.1.1. *Antecedentes internacionales*

Bueno Ramírez (2021). Perfil químico, actividades biológicas y criterios de calidad de propóleo recolectados en cuatro subregiones de Antioquia-Colombia para su oferta como ingrediente natural (7)

Objetivo: Se llevó a cabo la evaluación de propóleos provenientes de cuatro subregiones de Antioquia, Colombia, en base a las especificaciones de materia prima.

Metodología: Se realizaron pruebas de control de calidad y se analizó el perfil químico de los extractos etanólicos de propóleo mediante métodos cromatográficos para detectar seis compuestos fenólicos. Para determinar la calidad, se tomaron en cuenta diversas normativas que exigían pruebas de caracterización, evaluación cualitativa y cuantitativa. Para la identificación de los compuestos fenólicos, se utilizaron técnicas de cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV) y detector de arreglo de diodos.

Resultados: Se observó que ninguna de las muestras de propóleos cumplía con todos los estándares de calidad. La muestra P-Zona1 cumplió con la presencia de fenoles totales, mientras que la muestra P-Zona2 cumplió con la presencia de fenoles totales y flavonoides, así como con los porcentajes mínimos requeridos para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides. Por su parte, las muestras P-Zona3 y P-Zona4 cumplieron con las cinco especificaciones, que incluían la presencia de fenoles totales, flavonoides, porcentajes mínimos para la cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante.

Conclusiones: Ninguna de las muestras evaluadas cumplió con todas las especificaciones establecidas por las normativas internacionales utilizadas. Sin embargo, las muestras P-Zona2, P-Zona3 y P-Zona4 mostraron un nivel suficiente de control de calidad de acuerdo con las especificaciones de la norma mexicana, lo que las convierte en posibles opciones de materia prima para la industria. Por otro

lado, se identificó que dos de las cuatro subregiones de Antioquia obtienen propóleos con una calidad más cercana a las especificaciones requeridas como materia prima por las industrias.

Rodriguez Perez et al. (2018). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos (8)

Objetivo: Analizar la composición química de ocho propóleos mexicanos recolectados de diferentes municipios de los estados de México, Michoacán, Guanajuato, Veracruz y Puebla, para la evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana.

Metodología: Pruebas de contenido de compuestos fenólicos por el ensayo de Folin Ciocalteu, pruebas de contenido de flavonoides por el método colorimétrico del cloruro de aluminio, capacidad antioxidante por el método de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó empleando microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Resultados: Según las especificaciones químicas, se observó que las muestras del estado de México, Michoacán y Guanajuato, correspondientes a las categorías 1A, 2A, 3A y 4A, presentaron niveles elevados de fenoles y flavonoides. Se detectó la presencia de compuestos antioxidantes con valores inferiores a 100ug/ml en estas muestras. En cuanto a la actividad antimicrobiana, se observó que todas las muestras mostraron dicha actividad frente a los microorganismos evaluados.

Conclusiones: Las muestras del Estado de México y Michoacán exhibieron niveles elevados de flavonoides, lo cual resultó en la manifestación de propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana contra los microorganismos mencionados previamente. Por otro lado, las muestras provenientes de los municipios de Puebla, Guanajuato y Veracruz no presentaron cantidades adecuadas de fenoles y flavonoides, lo que implicó que no cumplieran con las especificaciones establecidas por la norma de calidad mexicana.

Irigoiti et al. (2019) Actividad antioxidante y características espectroscópicas de extractos etanólicos de propóleos líquido y liofilizado (9)

Objetivo: Se comparó el contenido de polifenoles, flavonoides, la actividad antioxidante y las características espectroscópicas de un extracto etanólico de propóleos con el mismo extracto liofilizado y luego suspendido en etanol.

Metodología: Para determinar los polifenoles totales, se utilizó el método de Folin Ciocalteu. Para los flavonoides totales, se empleó el método del tricloruro de aluminio. Para evaluar la actividad antioxidante, se utilizó el método de eliminación de radicales libres mediante DPPH. En cuanto al análisis espectroscópico, se utilizaron los espectros FT-IR y UV-Vis.

Resultados: En la tabla 1 de la investigación, se observó una disminución en el contenido de polifenoles en las muestras liofilizadas. Además, se encontró una variación significativa en los polifenoles totales. Por otro lado, la liofilización no afectó el contenido de flavonoides en la muestra. Respecto a la actividad antioxidante, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras liofilizadas y no liofilizadas, lo que sugiere que la liofilización no influye en la capacidad antioxidante del extracto. En cuanto al análisis espectroscópico, no se observaron diferencias en las señales IR, lo que indica que la liofilización no altera la composición química del extracto. Los espectros UV-Vis de las muestras con y sin liofilización mostraron que el máximo nivel de absorción se encontraba entre 280-310 nm para ambos extractos.

Conclusiones: No se encontraron diferencias en el contenido de flavonoides entre ambas muestras. Sin embargo, en el caso de los polifenoles totales, se observó una disminución en las muestras liofilizadas. En cuanto a la actividad antioxidante, no hubo diferencias significativas entre las muestras. Además, los perfiles espectroscópicos (UV-Vis y FT-IR) fueron similares para ambas muestras, lo que indica que no hubo cambios en la composición química de los extractos.

Angarita y Cobos (2017). Estudio Cromatográfico por HPLC-UV, Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Evaluación de la Capacidad Antioxidante en Miel de Abejas (10)

Objetivo: Determinar si se encontraban diferencias significativas en el contenido total de polifenoles, flavonoides y antioxidantes en las muestras de miel recolectadas en diferentes regiones de Colombia, así como en aquellas tratadas térmicamente y las que no lo fueron.

Metodología: Se empleó un método colorimétrico que implicó la reacción entre 2,4-dinitrofenilhidrazina y cloruro de aluminio. Se basó en el control del impacto oxidativo de los agentes oxidantes sobre sustratos susceptibles a la oxidación. La presencia de antioxidantes suprimió o redujo dicho daño. Se utilizaron los métodos: DPPH, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) para determinar la capacidad antioxidante. También se empleó el método de poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).

Resultados: Las correlaciones lineales negativas perfectas obtenidas en CFT-ABTS, DPPH-CFT, ABTS-CF, FRAP-DPPH, DPPH-CF y ABTS-FRAP indicaron una relación inversamente proporcional. Esto sugiere que a medida que aumenta la cantidad de fenoles, la media inhibitoria se alcanza más rápidamente, lo cual es favorable en términos de concentración inhibitoria media (IC_{50}).

Conclusiones: El coeficiente determinado por la correlación de Pearson del espectrofotómetro estableció una correlación muy lineal entre el contenido de flavonoides fenólicos y la capacidad antioxidante. Sin embargo, este estudio muestra que el contenido de fenol no es indicador de encontrar un contenido igual de flavonoides porque hay presencia de otros tipos de compuestos fenólicos según lo determinado por la prueba de Folin Ciocalteu, el tratamiento térmico que se realiza comúnmente para la venta de miel no arrojó diferencias en cuanto al contenido total de polifenoles, flavonoides y antioxidantes entre muestras de miel recolectadas y tratadas de las distintas regiones de Colombia.

2.1.2. Antecedentes nacionales

Araujo y Linares (2015). Cuantificación de flavonoides totales en extracto de propoleos (própolis) de la marca “Kaita” comercializado en la ciudad de Trujillo (11)

Objetivo: Cuantificar los flavonoides totales en extracto de propóleos (própolis) de la marca Kaita distribuido en la ciudad de Trujillo.

Metodología: La extracción de flavonoides fue por hidrolisis hasta obtener cristales. Para cuantificar los flavonoides se realizó mediante una reacción con acetato de plomo en conjunto con la reacción de magnesio con la presencia de ácido clorhídrico (reacción de Shinoda) y para cuantificar flavonoides totales del extracto de propóleos por espectrometría UV-visible.

Resultados: Para la identificar los flavonoides con acetato de plomo se observó una coloración amarilla y en caso de la reacción de Shinoda se observó una coloración rojo púrpura dando positivo en ambos casos para la cantidad de flavonoides totales por el método espectrofotométrico fue de 0.254 mg/ml expresados como quercetina con una desviación estándar de 0.0014 y un coeficiente de variación de 0.5%.

Conclusión: Se obtuvo que el extracto de propóleo de la marca Kaita distribuido en la ciudad de Trujillo, tiene una concentración de 0.254 mg/ml de flavonoides totales expresados como quercetina.

2.1.3. Antecedentes locales

Dueñas Zurita (2015). Control de calidad fisicoquímico – microbiológico y cuantificación de los alcaloides oxindólicos totales en capsulas y tabletas de uña de gato comercializados en el distrito de Cusco (12)

Objetivo: Realizar el control de calidad físico-químico y microbiológico y la cuantificación del alcaloide oxindol total en cápsulas y comprimidos en forma de uña de gato según los criterios de la Farmacopea de Estados Unidos.

Metodología: Para el control de calidad físico-químico realizando el porcentaje de humedad, el peso medio, la desintegración, la friabilidad y la dureza mostraron que el 70% de las muestras analizadas eran defectuosas a nivel del control físico-químico y analizadas

Resultados: El modelo 50% resulto ser un producto no escalable de control dimensional físico. No hubo defectos en la tasa de prueba de humedad y molienda, y se generaron 100% muestras. Se encontró que cuarenta porcientos de muestras eran productos de peso medio por debajo del peso normal. 100 muestras tenían puntuaciones de degradación y dureza muy bajas. Las pruebas microbiológicas realizadas informaron que un total de 40% de la muestra analizada se encontró con serias deficiencias debido al número total de microorganismos aeróbicos vivos y al número total de hongos filamentosos y levaduras demostraron tener efectos fuera de la especificación.

Conclusión: El control microbiológico para identificar microorganismos específicos como *E. coli* y *Salmonella* informó que el 40% estaban infectados con microorganismos *Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes* y *E. coli* dieron como resultando ser productos con deficiencias críticas porque componen un peligro para la salud. En cuanto a la cuantificación de alcaloides oxindol totales por HPLC de especiofilina, mitrafilina, uncarina F, pteropodina en cápsulas y tabletas de uña de gato, se informó que el 100% fueron positivos para la medición y cuantificación de alcaloides oxindol.

Sanchez y Atau (2011) Capacidad antioxidante in vitro, contenido en polifenoles y bioactividad del extracto etanólico de propóleos del Valle del Apurímac y de la Comunidad de Pacca - Anta - Cusco (13)

Objetivo: Determinar la capacidad antioxidante in vitro, el contenido total de polifenoles y determinar su bioactividad, de propóleos del Valle del Apurímac y de la comunidad de Pacca-Anta Cusco

Metodología: Para la determinación de la capacidad antioxidante in vitro se utilizó la técnica de captura de radicales libres DPPH, para el contenido total de polifenoles se determinó por el método de Folin Ciocalteau y el contenido total de flavonoides se determinó por el método de Woisky y Salatino y el contenido total de carotenoides por el método espectrofotométrico de beta-caroteno y finalmente a bioactividad por el ensayo en *Artemia salina*.

Resultados: La capacidad antioxidante del extracto etanólico de propóleos del valle del Apurímac el resultado fue 85.0 +/- 14.051% , con respecto al contenido total de polifenoles el valor fue 261+/-0.002 mg/g; el contenido total flavonoides fue de 43.731+/-0.069 mg/g y en cuanto al contenido total de carotenoides fue de 0.457+/-0.003 mg/g, en cuanto al extracto etanólico de propóleos de la comunidad de Pacca – Anta - Cusco los resultados fueron para la capacidad antioxidante el resultado fue de 82.90+/-17.04%, con respecto al contenido total de polifenoles fue de 198.30+/-0.002 mg/g, con respecto al contenido total de flavonoides fue 18.907+/-0.003 mg/g y en cuanto al contenido total de carotenoides fue de 0.764+/-0.003 mg/g.

Conclusiones: De acuerdo a los resultados obtenidos nos permite evidenciar la capacidad antioxidante de los propóleos estudiados y por lo cual se consideran bioactivos.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Propóleo

El término "propóleo" o "própolis" tiene su origen etimológico en las palabras griegas "pro" que significa "antes" y "polis" que significa "ciudad". Esto se debe a que esta sustancia se encuentra tanto en la entrada como en el interior de la colmena. El propóleo está compuesto por varias resinas y exudados secretados por la corteza y las yemas de ciertas plantas. Estos materiales se mezclan con las secreciones glandulares de las abejas melíferas, dando como resultado el producto final conocido como propóleo. Las abejas utilizan el propóleo para diversas necesidades en la colmena, como sellar grietas, reducir el acceso, cubrir y aislar los cadáveres de animales que ingresan a la colmena, reforzar estructuras básicas, pintar y desinfectar las celdas internas para evitar vibraciones. (14).

El propóleo, generado por las abejas, es una sustancia gomo-resinosa que se forma a partir del procesamiento de diversas resinas vegetales. Su composición es altamente compleja, ya que varía según el origen botánico de las resinas y las condiciones geográficas y climáticas en las que se encuentran las plantas productoras (15).

2.2.2. Origen

Existen dos teorías sobre el origen del propóleo producido por las abejas. Según una de estas teorías, las abejas mayores de 15 días recolectan partículas resinosas de los brotes de varios árboles, como álamos, sauces, abedules, cipreses, alisos, castaños de bosque, pinos y algunas hierbas. Utilizando sus mandíbulas, las abejas recogen la resina y luego la mueven hacia atrás para separarla y almacenarla en una canasta de polen que llevan en sus patas. Durante este proceso, también intervienen enzimas orales para prevenir adherencias. Una vez que llegan a la colmena con su carga, otras abejas las ayudan a descargar el propóleo, lo cual puede llevar alrededor de una hora. Si el material recolectado no es lo suficientemente maleable, las abejas se posarán en un lugar soleado, como un tronco, para permitir que el propóleo se enfríe y sea más fácil de manipular. El vuelo desde la colmena hasta las fuentes de resina dura aproximadamente de 15 a 20

minutos, y la temporada de recolección alcanza su punto máximo a fines del verano. La otra teoría sobre su origen dice que es un producto de la digestión del polen, en la que las abejas tienen lugar en el órgano pequeño entre la planta y el intestino. (16).

2.2.3. Funciones del propóleo para las abejas

La función principal del propóleo siempre ha sido proteger la colmena de factores externos, pero también posee otras características igualmente importantes, como las siguientes:

- Cubre y sella el interior de las celdas para garantizar la higiene y calidad dentro de ellas.
- Cierra grietas y agujeros en la colmena para prevenir la entrada de intrusos no deseados.
- Reemplaza la estructura interna de los paneles para evitar posibles daños.
- Aísla cambios bruscos de temperatura y sonidos externos que podrían afectar la vida normal de la colmena.
- Disuelve objetos extraños que no pueden ser expulsados de la colmena, especialmente potenciales enemigos como roedores e insectos (17).

2.2.4. Composición química

Dado que no hay dos tipos de propóleos que sean iguales, la composición del propóleo es variable dependiendo de su origen geográfico entre otros factores.

Las condiciones de extracción y beneficio igualmente inciden en la calidad final de producto. En términos químicos resulta casi imposible establecer una clasificación universal para los distintos tipos de propóleos ya que se ha demostrado que las abejas son muy selectivas en la recolección de exudados de planta ya que esta dependerá de la flora predominante según sean las condiciones de entorno. (18)

Sus características son: que es frágil por debajo de los 15 °C, tiene un punto de fusión de 65 °C y es completamente soluble en acetona, benceno y cloroformo.

El estudio de los componentes del propóleo reporta hasta 300 compuestos distintos principalmente flavonoides.

La proporción de las sustancias básicas que lo conforman son las siguientes:

- 40-45% Resinas y bálsamos
- 10% Aceites esenciales
- 20-30% Ceras
- 5% Polen, influye mucho la época de la floración
- 20% Cenizas y otras impurezas.
- Compuestos fenólicos
- Ácidos fenólicos: ácido benzoico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumarico.
- Crisina: que le da el color característico a la cera y al propóleo

Los componentes del propóleo dependen mucho de estos factores:

- Ambiente geográfico, flora local.
- La estación y la temporada del año dependen en gran medida de la floración de las estaciones del año.
- También depende del tipo de microorganismo.
- Puede haber escasez frecuente de ingredientes y deben obtenerse de sustancias atípicas distintas de las verduras. (18)

Otra finalidad es la de embalsamar a algún animal muerto en el interior de la colmena, con la finalidad de aislarlo, ante la dificultad que supondría sacarlo fuera debido a su tamaño (en ocasiones se han encontrado perfectamente embalsamados ratones, lagartos e incluso serpientes).

Las abejas emplean también el propóleos con la misión de encolar o pegar las partes móviles de la colmena. Por último, las abejas emplean el propóleos para recubrir los panales antes de la puesta de los huevos, con vistas a una desinfección de la zona de puesta (16).

2.2.5. Propiedades del propóleo

Se ha documentado el uso del propóleo en la Medicina a lo largo de la historia. El propóleo ha demostrado poseer efectos destacados como bactericida y bacteriostático, lo cual ha permitido confirmar la integridad de los cadáveres de abejas que se encuentran cubiertos por la colmena, evitando su descomposición. La experiencia ha comprobado que el propóleo presenta propiedades antibióticas efectivas contra cocos grampositivos como *Sarcina lutea* y *Staphylococcus aureus*, así como contra bacilos grampositivos como *Bacillus subtilis* y *Bacillus larvae*. También se ha observado su eficacia contra mohos como *Aspergillus oryzae* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. (16).

Otros estudios investigaron el efecto inhibitor del propóleo en varios virus de plantas. Se observó una mayor sensibilidad en los virus necróticos. Se ha comprobado que el propóleo no solo redujo la cantidad de daños en las hojas infectadas, sino que también impidió la propagación del microorganismo en toda la planta. En el campo de la medicina humana, el propóleo se utilizó con resultados positivos en el tratamiento de afecciones como resfriados del tracto respiratorio superior, influenza, sinusitis, laringitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía crónica y tuberculosis pulmonar (enfermedades del sistema respiratorio). En odontología, se empleó para tratar abscesos orales. En dermatología, el propóleo tuvo numerosas aplicaciones, especialmente en procesos de abscesos, heridas diversas, quemaduras, laceraciones, verrugas, forúnculos, callosidades, eczemas y psoriasis. En medicina veterinaria, se demostraron efectos positivos en el tratamiento de la fiebre aftosa, la necrosis bacteriana, la bronconeumonía, los trastornos gastrointestinales adictivos, la fiebre paratifoidea, la mastitis y las mastitis. Por último, el propóleo se utilizó como anestésico local y se valoró por sus propiedades cicatrizantes y antihemorrágicas (16).

2.2.6. Propiedades terapéuticas

2.2.6.1. Capacidad antibacteriana

Esta fue una de las primeras propiedades verificadas. Numerosos estudios bacteriológicos in vivo e in vitro han confirmado sus efectos bacteriostáticos y bactericidas. La principal causa de esta actividad es el flavonoide galangina y pinosembrina, así como los derivados del ácido benzoico, ácido ferúlico y ácido cafeico. Un estudio publicado en *Microbiologie Research* del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford encontró que la actividad del ácido cinámico y ciertos flavonoides neutralizan la energía de la membrana celular, bloquean la actividad bacteriana y las hacen vulnerables al ataque inmunológico. Evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes propóleos contra el *Helicobacter pylori*. Existen mucha evidencia de que este microorganismo es la responsable de gastritis, úlcera gastroduodenal hasta del cáncer gástrico. Se encontró que las muestras de Argentina eran las más resistente a esta bacteria que es el primordial responsable del flavonoide: primero pinocembrina y luego galangina y crisina. Los procedimientos actuales incluyen el uso de uno o varios antibióticos, que son costosos, cuestionables y no están libres de efectos secundarios (19).

2.2.6.2. Capacidad antiviral

El propóleo ha demostrado ser un antiviral de amplio espectro que muestra una excelente actividad contra el Poliovirus y los Virus del Herpes 1 y 2. En este caso, se logra reducir la síntesis del ADN viral. Los flavonoides son los responsables de esta acción y actúan en sinergia con los ésteres del ácido cafeico y ácido ferúlico. Cuando se aplica tópicamente, ya sea en forma de loción o crema, el propóleo provoca una mejoría notable en el caso del condiloma acuminado y el *Herpes zóster*. Además, el tratamiento temprano de los pacientes con lesiones secundarias durante el periodo eruptivo reduce el tiempo de recuperación y alivia el dolor en un plazo de 8 horas después de la aplicación (19).

2.2.6.3. Capacidad cicatrizante y antiinflamatoria

El propóleo ha adquirido una relevancia significativa en la cicatrización de heridas debido a su destacada actividad antibacteriana, cicatrizante y antiinflamatoria. Estas propiedades se asemejan a las de los medicamentos sintéticos, como el diclofenaco. Se ha comprobado que el ácido cafeico desempeña un papel en la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa, lo cual reduce la producción de interleucinas y prostaglandinas.

En 1996, el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford publicó un estudio en el que los autores sugirieron que este efecto del propóleo se debe a la presencia de un éster de ácido cafeico, así como al ácido cafeico y la quercetina. El propóleo actúa sobre los macrófagos y bloquea la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Mediante modelos experimentales tanto in vivo como in vitro, se descubrió que el propóleo interrumpe la vía de la lipoxigenasa del ácido araquidónico (19).

2.2.6.4. Capacidad inmunomoduladora

Los estudios han revelado que el propóleo tiene la capacidad de estimular tanto la inmunidad inespecífica como la específica, tanto a nivel celular (linfocitos T) como humoral (linfocitos B). Se ha observado que los ratones infectados con el virus de la influenza tipo A y tratados con propóleos presentan un aumento en el número de linfocitos T, un incremento en la actividad fagocítica y una reducción en la tasa de mortalidad en comparación con el grupo de control. Los investigadores han afirmado que se promueve la liberación de factores que impiden la migración de los leucocitos (19).

2.2.6.5. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los propóleos ha contribuido significativamente a su creciente uso en la prevención de enfermedades. Durante décadas, se ha debatido acerca de las propiedades antioxidantes de la miel, el polen y en particular, el propóleo. Sin embargo, en la década

de los noventa se comenzaron a utilizar metodologías científicas para investigar este aspecto. Las propiedades antioxidantes del propóleo pueden atribuirse a su capacidad para neutralizar diversos tipos de radicales libres, incluyendo los aniones superóxido. (19)

En los últimos años, se ha evidenciado el papel crucial de los antioxidantes, especialmente los de origen natural, en la prevención de enfermedades importantes como la aterosclerosis, el reumatismo y el cáncer. Los antioxidantes presentes en la vitamina E, como el alfa-tocoferol, ayudan a prevenir la oxidación de los lípidos (la conversión del LDL en HDL), reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares e inactivan los radicales libres responsables del envejecimiento celular. El propóleo, con su potente actividad antioxidante, ofrece perspectivas de crecimiento prometedoras (19).

2.2.6.6. Capacidad antifúngica

En un estudio realizado con el extracto etanólico de propóleo al 15% *Apis mellifera*, inhibió el desarrollo de levaduras *Candida albicans* (ATCC 14055) y *Cryptococcus neoformans* y además del hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, Esto se demostró mediante dos ensayos de sensibilidad, difusión en agar y micro dilución. Esto muestra el potencial del propóleo en el tratamiento de enfermedades provocados por los hongos filamentosos y levaduras (19).

2.2.6.7. Dosis recomendada de los propóleos

Varios autores difieren en este asunto. El Dr. McEwan (alergólogo) recomienda una dosis mínima de 1.5 gr de propóleo refinado por día. Sin embargo, el Dr. Murat sugiere que las dosis que se debería tomar ronda los 25-30 g. Mientras que el Dr. Russian con demasiados años de experiencia en el uso de propóleo, prescribe alrededor de 9 g de propóleo por día sin que se observe ningún tipo de efecto secundario. (19)

2.2.6.8. Efectos adversos y toxicidad del propóleo

Las personas que han hecho uso del propóleo como medicina durante los últimos 300 años no han dejado reflejado en la literatura ningún reporte de efectos adversos y tóxicos, pero sin embargo a lo largo de los años la contaminación medioambiental dio nuevas preocupaciones. El plomo, los pesticidas y la radioactividad han sido reconocidos como problemas potenciales debido a pueden por lo cual en el proceso de tratamiento de propóleos se encarga de eliminar y testar la presencia de estos elementos. (19)

2.2.7. Polifenoles

Los compuestos fenólicos o fenilpropanoides se sintetizan en las plantas, específicamente en sus frutos, hojas, tallos, raíces, semillas y otras partes. La característica estructural principal de los polifenoles es que contienen uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a uno o más anillos bencénicos. Aunque se les reconoce principalmente por sus propiedades antioxidantes, la mayoría de los polifenoles también exhiben otras actividades biológicas beneficiosas para la salud. Estos compuestos constituyen el grupo más amplio de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal.

Recientemente, se ha demostrado que las dietas ricas en polifenoles vegetales mejoran la salud y reducen la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Los polifenoles tienen la capacidad de regular la actividad de diversas enzimas, convirtiéndose así en mecanismos de transducción de señales e interfiriendo en varios procesos celulares. Esta propiedad fisicoquímica del compuesto les permite participar en diferentes reacciones, incluyendo el metabolismo redox de las células. (20).

2.2.7.1 Estructura química y clases

En la naturaleza, existen diversos tipos de compuestos caracterizados por la presencia de uno o más anillos fenólicos, y se les conoce como polifenoles. Estos

polifenoles se clasifican en diferentes clases y subclases según la cantidad de anillos fenólicos y las estructuras que poseen.

La subdivisión de los polifenoles en taninos, ligninas y flavonoides se basa en la variedad de unidades simples de polifenoles derivados de los metabolitos secundarios de las plantas en la ruta del ácido shikímico. También se utilizan divisiones clásicas basadas en la importancia relativa de cada componente en diferentes áreas de estudio. Además, los polifenoles se agrupan y clasifican según el tipo y número de subcomponentes fenólicos presentes. (20).

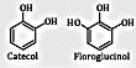

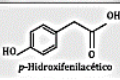
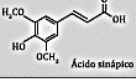
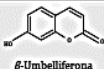
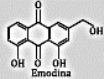
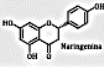
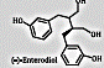
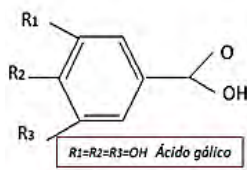
Unidad estructural	Estructura funcional	Moléculas modelo
C_6	Fenol	 Catecol Firoglicolal
C_6-C_1	Ácidos fenólicos	 Ácido 2-Hidroxi benzoico
C_6-C_2	Á. fenilacéticos	 p-Hidroxi fenilacético
$*C_6-C_3$	Á. hidroxicinámicos	 Ácido sinápico
	Cumarinas	 β -Umbelliferona
$C_6-C_1-C_6$	Antraquinonas	 Emodina
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides	 Narigenina
$(C_6-C_3)_2$	Lígnanos	 (+)-Zenodiol
$(C_6-C_3)_n$	Lígninas	-
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados	-

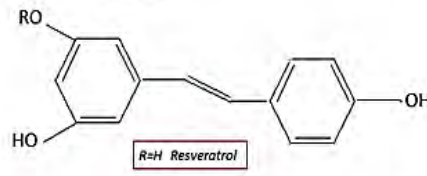
Figura 1: Principales unidades estructurales de compuestos fenólicos

Fuente: Salamanca, 2017 (10)

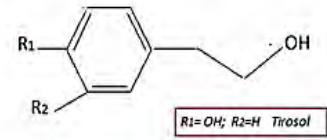
Derivados del ácido hidroxibenzoico



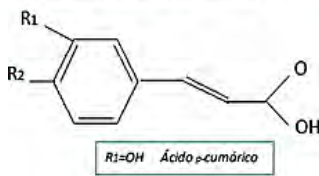
Estilbenos



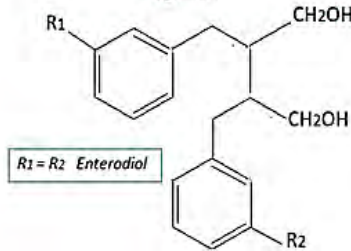
Alcoholes fenólicos



Derivados del ácido hidroxicinámico



Lignanós



Flavonoides

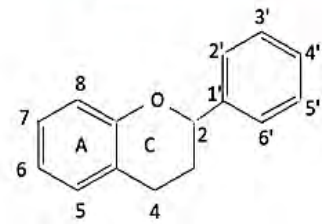


Figura 2: Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles

Fuente: Quiñones, 2012 (20)

2.2.7.1. Biosíntesis

Los polifenoles se sintetizan a través del metabolismo secundario de las plantas, y esto ocurre mediante dos vías principales: la vía del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos. La vía del ácido shikímico es responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina o la tirosina, así como la síntesis de ácidos cinámicos y sus derivados, que incluyen fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano. Por otro lado, la ruta de los poliacetatos es responsable de la formación de quinonas y xantonas. (20).

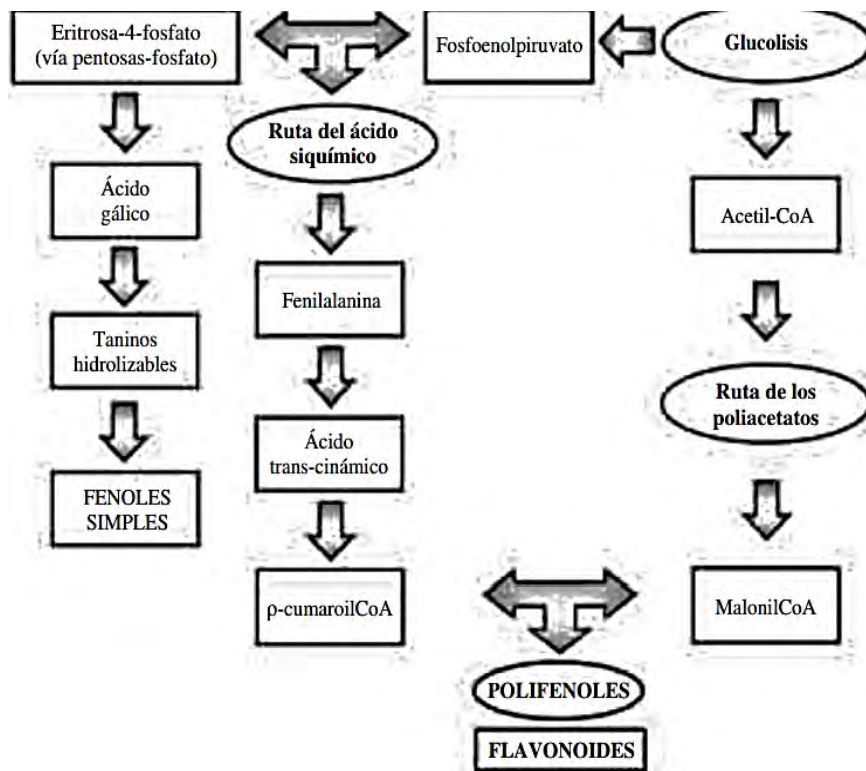


Figura 3: Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas CoA-Coenzima A.

Fuente: Quiñones, 2012 (20)

2.2.7.2. Propiedades benéficas a nivel cardiocirculatorio

Dentro de los diversos compuestos fenólicos, los flavonoides son los más abundantes en la naturaleza, y dentro de esta categoría, los flavonoles destacan por su alta actividad antioxidante. Estudios epidemiológicos han demostrado que una ingesta rica en flavonoides se asocia con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular, y se ha observado que estos compuestos actúan en diferentes niveles.

Por un lado, los flavonoides reducen los niveles de colesterol y de LDL oxidada debido a sus propiedades antioxidantes, que les permiten quelar metales y donar hidrógeno a través de sus grupos hidroxilo. En general, la actividad antioxidante se correlaciona con la cantidad de grupos hidroxilo presentes en la molécula. Por lo tanto, los ortodifenoles son antioxidantes eficaces, mientras que los compuestos monofenólicos, como el tirosol,

tienen una menor capacidad antioxidante. Algunos flavonoides, como el hidroxitirosol o la oleuropeína, también actúan como captadores de radicales libres.

Por otro lado, los flavonoides pueden inhibir la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, lo que resulta en una reducción en la formación de tromboxano y leucotrienos. Esto contribuye a disminuir la reacción inflamatoria en la placa de ateroma. Además, algunos flavonoides, como el hidroxitirosol, tienen la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria y estabilizar las fibras de colágeno en las paredes arteriales.

Por último, es importante destacar que dos subclases de compuestos fenólicos, las isoflavonas y los lignanos, tienen una estructura muy similar a los estrógenos, lo que las clasifica como fitoestrógenos. (20).

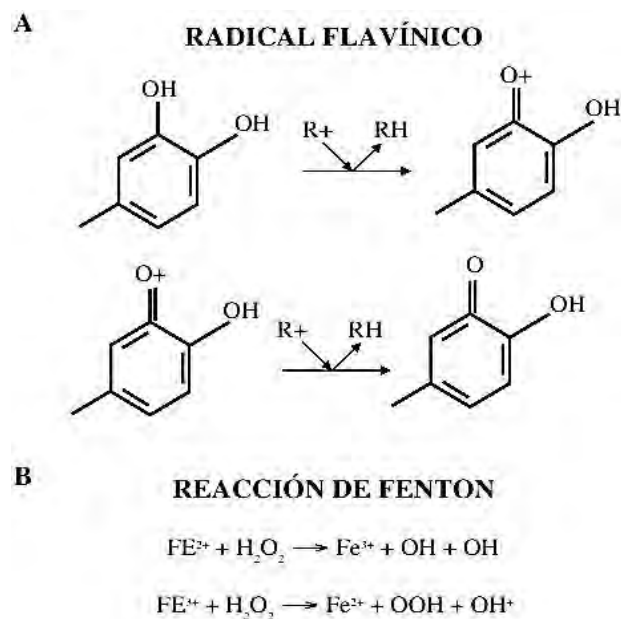


Figura 4: Formación del radical flavínico por la captura de radicales libres por los polifenoles (A) Reacción de Fenton (B)

Fuente: M. Quiñones y M. Miguel, 2013.

2.2.8. Flavonoides

El término "flavonoide" proviene del latín "flavus", que significa "amarillo". Los flavonoides constituyen una subclase de polifenoles que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Estos compuestos son pigmentos naturales presentes en las plantas y desempeñan un papel importante en la protección del cuerpo contra el daño causado por oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental y los productos químicos presentes en los alimentos. (20).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en plantas superiores, y se pueden encontrar en varias familias, incluyendo Rutáceas, Polygonáceas, Compuestas y Umbelíferas. Estos compuestos son especialmente abundantes en las partes aéreas de las plantas que están expuestas al sol, como las hojas, los frutos y las flores, ya que la síntesis de flavonoides se ve favorecida por la luz solar. Los flavonoides desempeñan un papel importante en las plantas, ya que contribuyen a la coloración de muchas flores, frutos y hojas, y también intervienen en procesos como la polinización al atraer insectos y otros polinizadores (21).

2.2.8.1. Clasificación

De acuerdo con la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada pueden clasificarse, según su esqueleto y vía metabólica:

- **Flavonoides**, derivados de la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona).
- **Isoflavonoides**, derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona).
- **Neoflavonoides**, derivados de la estructura 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirona) (21).

2.2.8.2. Farmacocinética

Los flavonoides no tienen afinidad por los lípidos y su eliminación se ve favorecida por la presencia de grupos fenólicos en forma de sulfatos o glucósidos. Antes de ser absorbidos, los flavonoides se descomponen en una aglicona y un glicósido. El glicósido, al tener una mayor solubilidad en agua, se absorbe rápidamente, mientras que la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida. En promedio, las concentraciones máximas de flavonoides se alcanzan aproximadamente a las 1.75 horas. (22).

Una vez absorbidos, los flavonoides se distribuyen de manera uniforme en todos los tejidos del cuerpo, incluso atraviesan la barrera hematoencefálica. Esto permite que los flavonoides más lipofílicos, como la naranjina, puedan ser transportados a través de los receptores correspondientes. Los flavonoides experimentan un proceso inicial de metabolismo en el organismo y sus metabolitos se eliminan a través de la bilis. Aunque existe la posibilidad de que sean reabsorbidos, pierden su capacidad funcional. Como resultado, la biodisponibilidad de los flavonoides se limita aproximadamente al 1.5%. (22).

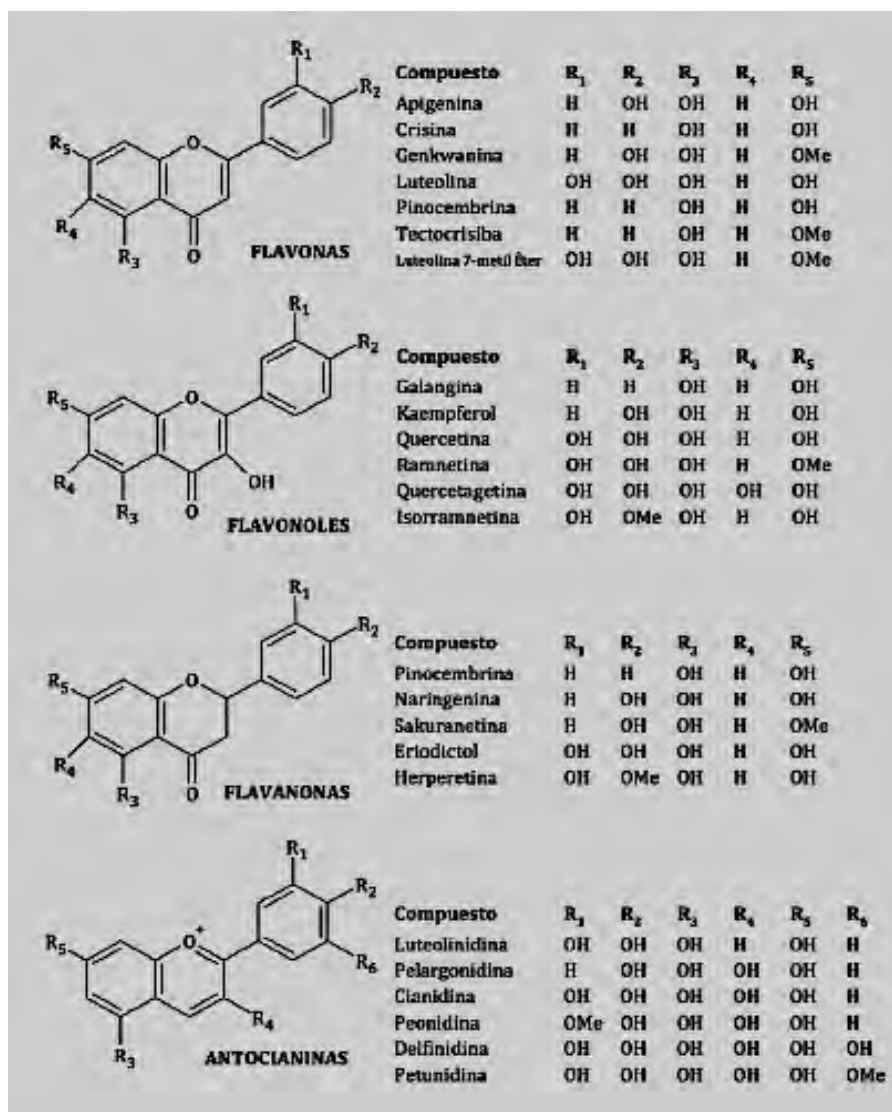


Figura 5: Relaciones estructurales de algunos flavonoides distribuidos en la naturaleza y sus compuestos relacionados.

Fuente: Salamanca, 2017 (18)

2.2.8.3. Propiedades

Los flavonoides son sólidos cristalinos blancos o ligeramente amarillos. Sus heterósidos son solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares, y es insoluble en sustancias apolares. Sin embargo, cuando están en estado libre, son menos solubles en agua, pero son más solubles en disolventes orgánicos más o menos oxigenados, dependiendo de su polaridad. Por otra parte, ya es una sustancia que se oxida fácilmente

oxidables y, por consiguiente, tienen efecto antioxidante, debido a que se oxidan más rápido que otras sustancias.(21).

2.2.8.4. Actividad farmacológica

Los flavonoides consumidos por el hombre le protegen del daño de los oxidantes, como los rayos UV (cuya cantidad aumenta en verano); la polución ambiental (minerales tóxicos como el plomo y el mercurio); algunas sustancias químicas presentes en los alimentos (colorantes, conservantes, etc.). Como el organismo humano no tiene la capacidad de sintetizar estas sustancias químicas, las obtiene enteramente de los alimentos que ingiere.

Desde un punto de vista farmacológico, los flavonoides se distinguen por su baja toxicidad y con frecuencia tienen actividad en el sistema vascular con el efecto de la vitamina P (efecto vaso protector de la pared vascular, debida a su permeabilidad reducida y al incremento de la resistencia de los capilares) (21).

2.2.8.5. Acción antioxidante

La actividad antioxidante de los flavonoides se deriva de una combinación de propiedades, como la capacidad de quelar el hierro, capturar radicales libres y la inhibición de enzimas oxidativas como la lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa. Esto evita la formación de especies reactivas de oxígeno y peróxidos orgánicos. Además, se ha observado que los flavonoides también pueden inhibir enzimas indirectamente involucradas en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2, y estimular otras enzimas con propiedades antioxidantes conocidas, como la catalasa y la superóxido dismutasa. (22).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la extensa investigación de su actividad farmacológica. Estos compuestos tienen la capacidad de interactuar con polímeros biológicos como enzimas, transportadores hormonales y ADN. Además, pueden quelar iones metálicos transitorios como Fe^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , catalizar transferencias de electrones y reducir la

formación de radicales libres. Debido a estas propiedades, se ha observado que los flavonoides tienen efectos protectores en enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedades cardíacas, cáncer, infecciones virales, úlceras duodenales y estomacales, e inflamación.(23).

Los flavonoides poseen criterios químicos para fijar la capacidad antioxidante de son:

- Tienen estructura O-dihidroxi en el anillo B; esto le da superior estabilidad en 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 la máxima capacidad antioxidante.

Desde esta perspectiva, la quercitina es uno de los flavonoides que mejor cumple con la condición de ejercer una acción antioxidante eficaz. Se ha determinado que posee una capacidad antioxidante medida por el valor Trolox de 4,7 mm, lo cual es cinco veces mayor que las vitaminas E y C. Además, la quercitina es altamente soluble en agua, al igual que la vitamina C, y su acción antioxidante se ha demostrado que es sinérgica con esta vitamina.(23).

2.2.8.6. Mecanismos antioxidantes

Existe un consenso en cuanto a que la acción antioxidante de los flavonoides se debe a una combinación de propiedades, como la capacidad de quelar el hierro y captar radicales libres. Varios estudios también han mencionado la inhibición de enzimas oxidativas, como lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa, lo que ayuda a prevenir la producción de especies reactivas de oxígeno y peróxidos orgánicos en el organismo. Además, se ha observado que los flavonoides inhiben enzimas indirectamente involucradas en el proceso oxidativo, como la fosfolipasa A2, al mismo tiempo que estimulan enzimas con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la

superóxido dismutasa. De esta manera, los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación del radical libre y en la formación misma del radical (24).

2.2.9. Control de calidad

El departamento de Control de Calidad en la industria farmacéutica es responsable de llevar a cabo una serie de procedimientos, técnicas y actividades operativas para asegurar que los productos farmacéuticos cumplen con las especificaciones y características requeridas (5).

2.2.9.1. Control de calidad microbiológico

En el contexto del control de calidad microbiológico, es importante realizar pruebas para evaluar el contenido microbiano de las muestras y garantizar la ausencia de microorganismos patógenos. Esto se puede lograr mediante el uso de medios de cultivo óptimos y pruebas de promoción de crecimiento. Aquí hay una descripción de estos procesos:

Medio de cultivo óptimo (Control de medios - Pruebas de Promoción de crecimiento): Se utilizan soluciones que no contienen bacterias y que son adecuadas para estimular el crecimiento microbiano en presencia de los microorganismos de interés. Estos medios se preparan y analizan para asegurarse de que no haya inhibidores del crecimiento microbiano presentes en la formulación. La falta de desarrollo de microorganismos en la muestra puede indicar la presencia de agentes inactivantes en la formulación que están impidiendo el crecimiento microbiano. (25)

Medios de cultivo: Se emplean medios de cultivo que son evaluados para asegurar que estén libres de bacterias antes de su uso. Las muestras se incuban en estos medios durante un período de tiempo determinado, como 48 horas, y se observa si hay algún crecimiento microbiano. Si no se observa desarrollo de microorganismos, esto indica que la muestra está libre de contaminación microbiana. Por otro lado, si se detecta crecimiento

microbiano, se procede a realizar pruebas adicionales para identificar y caracterizar los microorganismos presentes. (25)

El control de calidad microbiológico es esencial para garantizar la seguridad y la calidad de los productos farmacéuticos. Estos procedimientos permiten detectar la presencia de microorganismos patógenos y evaluar el contenido microbiano dentro de los límites establecidos. Además, aseguran que los medios de cultivo utilizados sean adecuados para el crecimiento y la promoción de microorganismos de interés, facilitando la detección y el análisis microbiológico en las muestras.(25)

La prueba posee varias partes:

- a. Recuento Total de microorganismos aerobios. (necesitan O₂ para su desarrollo): TSA (Trypticase soya agar)
- b. Recuento total combinado de Hongos Filamentosos y Levaduras: Sabouraud agar
- c. Identificación de patógenos. Las muestras se siembran en caldo TSB tripticas soya borth y se transfiere a medios selectivo o diferenciales.
- d. Determinación de patógenos. La muestra se cultiva en caldo TSB tripticas soya borth y esta pasa a los medios diferenciación o medios selectivos.
- e. Muestra en TSB 1 g: - Manitol salado *Staphylococcus aureus*, Agar Cetrimide *Pseudomona aeruginosa* y MacConkey T E. Coli.
- f. Muestra en TSB 10 g: Caldo Rappaport / XLD *Salmonella* sp.
- g. Muestra en TSB 10 g: Caldo Mosel VRD Bacterias gram negativas resistentes a la bilis (25).

2.2.10. Microorganismos aerobios

El método generalmente se basa en contar el número de colonias que crecen en una placa de agar nutritivo. Estas placas se inoculan previamente con cantidades conocidas de muestras diluidas y se incuban en condiciones ambientales específicas. Aunque a veces se les llama incorrectamente "recuentos totales en placa", en realidad solo se pueden contar los microorganismos que pueden crecer en las condiciones ambientales seleccionadas. Por ejemplo, la incubación a temperaturas de 0°C y 7°C favorece el crecimiento de microorganismos psicrótrofos, mientras que la temperatura óptima para el crecimiento de microorganismos mesófilos, tanto patógenos como saprófitos, es de 30°C a 35°C. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se utiliza con mayor frecuencia para evaluar la calidad sanitaria y microbiológica de medicamentos y alimentos. [(26).

2.2.10.1. Hongos y levaduras

Los hongos son microorganismos protistas no fotosintéticos que crecen en forma de masas ramificadas y entrelazadas conocidas como "micelios". Estos micelios están compuestos por hifas, que son estructuras filamentosas con membranas transversales perforadas que permiten el paso libre del núcleo y el citoplasma. Por lo tanto, a estos microorganismos se les llama "cenocitos", ya que consisten en una masa multinucleada de citoplasma continuo confinado en una red de tubos ramificados. Estos tubos están formados por polisacáridos de quitina y se asemejan a las células madre. Algunas especies, como las levaduras, no forman micelio, pero se reconocen fácilmente como hongos debido a su reproducción sexual y la presencia de formas de transición. (26)

2.2.11. Características organolépticas

El análisis organoléptico es una evaluación cualitativa que se realiza en una muestra, basándose exclusivamente en la apreciación de los sentidos. Aunque este tipo de valoración puede ser subestimado por los principiantes, en realidad son expertos en análisis de laboratorio quienes llevan a cabo y supervisan estos análisis, proporcionando posteriormente la interpretación de los resultados. Los parámetros

organolépticos se refieren a las características y percepciones sensoriales que se evalúan directamente en el campo y a menudo se vuelven a medir en el laboratorio utilizando técnicas de validación estándar más precisas (27).

2.2.12. Control de calidad fisicoquímico

2.2.12.1. pH

La valoración de la acidez o alcalinidad de una muestra se basa en el pH, que es un valor absoluto obtenido a partir del logaritmo decimal negativo de la concentración de iones de hidrógeno. El pH se utiliza como indicador para determinar si una sustancia es ácida ($\text{pH} < 7$) o alcalina ($\text{pH} > 7$). El pH es capaz de medir la concentración de iones de hidrógeno presentes en una sustancia. Los ácidos fuertes tienen una alta concentración de iones de hidrógeno, mientras que los ácidos débiles tienen una baja concentración de estos iones. En resumen, el pH es un valor numérico que refleja la concentración de iones de hidrógeno en una sustancia.(28).

2.2.12.2. Densidad

La densidad, también conocida como densidad absoluta, es una medida que representa la relación entre la masa y el volumen de un objeto o sustancia. Se simboliza con la letra ρ y se expresa en el Sistema Internacional de Unidades como kilogramos por metro cúbico (kg/m^3), aunque también se puede utilizar gramos por centímetro cúbico (g/cm^3). Para convertir entre estas unidades, simplemente se divide o se multiplica por 1000. Por ejemplo, la densidad del agua es de 1000 kg/m^3 , o 1 g/cm^3 .(28)

La densidad es una propiedad inherente a la materia y su valor no depende del tamaño del objeto o la cantidad de sustancia. La fórmula general para calcular la densidad es la siguiente:

$$\rho=m/V$$

Donde:

- ρ : densidad,
- m: masa
- V: volumen del determinado cuerpo. (28)

2.2.13. Tiendas naturistas

Se trata de un establecimiento que se especializa en la venta al por menor de productos destinados exclusivamente al uso humano. Estos productos incluyen alimentos obtenidos de la producción agropecuaria, productos ecológicos que están debidamente envasados y etiquetados. También se ofrecen productos como té, infusiones de hierbas, semillas, nueces y frutos secos, los cuales están empacados y etiquetados correctamente. Además, se comercializan productos cosméticos, productos fitoterapéuticos de venta libre, suplementos dietarios, medicamentos homeopáticos de venta libre, así como esencias florales y minerales.(29)

El listado de casas naturistas de la ciudad del Cusco, se muestran en el anexo 1

2.3. Glosario de términos

- Catalasa: Enzima presente en los organismos vivos, descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua mediante una reacción de catálisis (31).
- Oxindol: También conocido como 2-indolona, es un compuesto orgánico aromático heterocíclico. Posee una estructura bicíclica que consiste en un anillo de benceno de seis miembros fusionado con un anillo de cinco miembros que contiene nitrógeno. El oxindol se caracteriza por ser una variante de la indolina, donde se ha sustituido un grupo carbonilo en la segunda posición del anillo de cinco miembros de la indolina (30).
- Exudados: Los exudados son líquidos, células u otras sustancias celulares que son liberados gradualmente desde los vasos sanguíneos de los tejidos inflamados (30).
- Resinas: La resina es una sustancia obtenida de forma natural a partir de la secreción orgánica de ciertas plantas, y puede presentarse en forma pastosa o sólida. Debido a sus propiedades químicas, las resinas son utilizadas en la fabricación de una variedad de productos, como perfumes, adhesivos, barnices y aditivos alimentarios, entre otros (30).
- Ácido ferúlico: Presente principalmente en hortalizas, legumbres, frutas, cereales y semillas, es un antioxidante potente. Su función principal es proporcionar estabilidad a la estructura de los vegetales donde se encuentra, protegiéndolos de daños causados por factores externos (30).
- Quelar: La quelación es el proceso mediante el cual un compuesto químico forma complejos solubles con iones metálicos. Los agentes quelantes, también conocidos como antagonistas o secuestradores de metales pesados, son sustancias que facilitan la formación de múltiples enlaces con un solo ion metálico, formando así un complejo (32).
- Antioxidante: En términos generales, se puede definir un antioxidante como cualquier molécula que tenga la capacidad de prevenir o retrasar la oxidación

(que implica la pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, especialmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (31).

- Levaduras: Es una masa compuesta por hongos unicelulares que tienen la capacidad de fermentar la sustancia con la que se mezclan. Estos hongos unicelulares tienen una forma ovoide y se reproducen mediante gemación o división, formando cadenas. Además, producen enzimas que son capaces de descomponer una variedad de compuestos orgánicos, especialmente azúcares, en otros compuestos más simples (33).
- Radical: Es una especie, ya sea orgánica o inorgánica, que se caracteriza por su inestabilidad y alto poder reactivo (32).
- Liofilización: Es un método para deshidratar sustancias, como alimentos, con el fin de prolongar su duración. En este proceso, la sustancia se congela y posteriormente se somete a un proceso de deshidratación al vacío (34).

Capítulo III. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material para evaluar

Soluciones orales de propóleos expendidos en el distrito del Cusco

3.1.2. Material de laboratorio

- Vasos precipitados de 50mL y 100mL
- Probeta de 50mL
- Tubos de ensayo
- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Pipetas volumétricas 1 mL y 5 mL
- Bagueta
- Embudo
- Fiolas de 25 mL
- Papel filtro
- Gradillas
- Picnómetros
- Bombillas de succión
- Papel craft
- Asa y aguja de siembra de alambre de micrón
- Placas de Petri

3.1.3. Equipos de laboratorio

- Balanza de precisión H.W. KESSEL S.D GR206
- Espectrofotómetro UV - VIS EVOLUTION 300
- Cocina eléctrica BRUDER
- Autoclave INDUMELAD AT – TM 50
- Potenciómetro ORIÓN
- Centrifuga DM 0412 DELCA
- Horno de esterilización BINDER

- Estufa MEMMERT
- Baño maría H.W. KESSEL S.D PRECISDIG

3.1.4. Reactivos

3.1.4.1. Reactivos para determinar polifenoles

- Reactivo de Folin Ciocalteu (1:10)
- Ácido gálico
- Metanol 90%
- Ácido acético 0.5%
- Bicarbonato de sodio 7.5%

3.1.4.2. Reactivos para determinar flavonoides

- Quercetina deshidratada
- Etanol 80%
- Cloruro de aluminio 10%
- Acetato de sodio 1M

3.1.4.3. Reactivos para determinar la actividad antioxidante

- DPPH
- Etanol 80%
- Etanol 96%

3.1.5. Medios de cultivo

- Caldo MacConkey
- Agar MacConkey
- Caldo digerido de Caseína y Soja
- Agar Sabouraud Dextrosa

3.2. Diseño metodológico

3.2.1. Nivel y tipo de investigación

Investigación descriptiva con enfoque cuantitativo, descriptiva, ya que tiene como objetivo principal describir y analizar las características de soluciones de propóleo expendidos en el distrito del Cusco.

3.2.2. Diseño de la investigación

Diseño: Transversal, ya que los datos de la investigación se recolectarán en un solo momento, en un tiempo único.

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

Soluciones orales de propóleo expendidas en casas naturistas del distrito del Cusco

3.3.2. Tamaño de muestra

Dado que no se conocía la variedad de soluciones orales de propóleo que se expenden en casas naturistas, ni tampoco existe un registro oficial de aquellos que se expenden en el distrito; se decidió aplicar una encuesta en las casas naturistas previstas en el Anexo 1, para determinar las 04 soluciones orales de propóleos que contengan sólo propóleo como principio activo y que sean las más expendidos en el distrito del Cusco (Anexo 2).

3.4. Criterios de inclusión y exclusión

3.4.1. Criterios de inclusión

- Soluciones orales de propóleos adquiridas en casas naturistas del distrito de Cusco registradas en la Dirección de Medicamentos Insumos y Drogas.
- Soluciones orales de propóleos que contengan solamente propóleo como principio activo.

3.4.2. Criterios de exclusión

- Soluciones orales de propóleos que no sean comercializadas en casas naturistas.
- Soluciones orales de propóleos que contengan el principio activo de propóleo más otros componentes como miel y otros aditivos.

3.5. Variables implicadas

3.5.1. Actividad antioxidante

Definición conceptual: Los antioxidantes se denominan antioxidantes de cadena corta porque afectan principalmente la capacidad de reaccionar con los radicales libres e inhibir la degradación oxidativa (35).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cuantitativa
- **Forma de medición:** indirecta
- **Escala de medición:** razón
- **Instrumento:** Espectrofotómetro UV- Vis
- **Expresión final:** porcentaje de inhibición de radicales libres

3.5.2. Cuantificación de polifenoles

Definición conceptual: El análisis del contenido de compuestos polifenólicos es muy importante debido a que estos compuestos tienen varias actividades biológicas relacionadas con sus propiedades antioxidantes. Puede detectarse a pH alcalino mediante la prueba de Folin-Ciocalteu, que da un color azul y puede medirse espectrofotométricamente a 775nm. (20).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cuantitativa
- **Forma de medición:** indirecta
- **Escala de medición:** razón
- **Instrumento:** Espectrofotómetro UV-Vis

- **Expresión final:** nm

3.5.3. *Cuantificación de flavonoides*

Definición conceptual: Desde el punto de vista de la reacción, los flavonoides forman complejos con el tricloruro de aluminio y pueden analizarse mediante espectrofotometría UV. El método consiste en la formación de un complejo aluminio-flavonoide en un medio alcalino que da un color rosa salmón que se absorbe a 490nm, es decir, se basa en la formación de complejos coloreados entre los grupos fenólico y cetónico del flavonoide con el tricloruro de aluminio en medio básico y con la presencia de nitrito de sodio para formar un complejo de coloración roja.(36).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cuantitativa
- **Forma de medición:** indirecta
- **Escala de medición:** razón
- **Instrumento:** Espectrofotómetro UV- Vis
- **Expresión final:** nm

3.5.4. *Control fisicoquímico*

Definición conceptual: Son las medidas, incluido el ajuste de las especificaciones, el muestreo, los informes de análisis y pruebas para garantizar la materia prima, el producto intermedio, el material de embalaje y por último el producto terminado. Cumplimiento de los criterios establecidos de las características de identidad y autoridad (37)

Indicadores

Densidad

Definición conceptual: Es una cantidad que representa la relación entre la masa y el volumen de una sustancia, y la unidad en el Sistema Internacional es Kg/m³, así como su subunidad en mg/ml (38)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cuantitativo
- **Forma de medición:** indirecta
- **Escala de medición:** razón
- **Instrumento:** densímetro
- **Procedimiento:** Pesamos un picnómetro vacío de un volumen determinado, y lo registramos. Luego añadimos la solución de propóleo hasta llenar el picnómetro y volvemos a pesarlo. Se calcula la diferencia entre el peso del picnómetro vacío y con la solución. El peso obtenido se dividió entre el volumen del picnómetro, y así obtenemos la densidad.
- **Expresión final:** mg/ml

pH

Definición conceptual: Un indicador de cuán ácida o alcalina es una solución (38)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cuantitativo
- **Forma de medición:** indirecto
- **Escala de medición:** razón
- **Instrumento:** tiras reactivas de pH y potenciómetro.
- **Procedimiento:** introducir la tira reactiva de pH en la muestra y hacer la lectura de acuerdo a los patrones de colores. De igual forma, con el potenciómetro se realizará la lectura en los valores de pH de las soluciones de propóleo.
- **Expresión final:** Valor de Ph

3.5.5. Características organolépticas

Definición conceptual: Las propiedades organolépticas de un producto son todas las descripciones de las propiedades físicas de un producto que pueden ser percibidas por los sentidos, como el sabor, la textura, el olor y el color. Existen diferentes perfiles sensoriales según el tipo de producto. (39)

Sabor: Las papilas gustativas de la lengua reconocen cuatro sabores: dulce, amargo, salado y ácido. Aunque todas las papilas detectan cada sabor, cada parte de la lengua reconoce mejor uno u otro. (39)

Color: Este parámetro es un indicador de las reacciones químicas que ocurren después de cierto tratamiento térmico de los alimentos. Muchas variaciones de color son normales y no afectan su seguridad. (39)

Olor: Esta propiedad es considerada una de las más difíciles de definir y caracterizar, y viene dada por diversas sustancias volátiles que se encuentran en los alimentos tanto de forma natural como durante su elaboración. (39)

Indicadores

Olor

Definición conceptual: La sensación produce una liberación evaporativa de ciertas cosas y se percibe a través de la sensación del olfato (38)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativo
- **Forma de medición:** directa
- **Escala de medición:** nominal
- **Instrumento:** nariz
- **Procedimiento:** captación por el sentido del olfato
- **Expresión final:** conforme/no conforme

Sabor

Definición conceptual: La naturaleza de la sustancia que se percibe por el gusto (38).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativa
- **Forma de medición:** directa
- **Escala de medición:** nominal
- **Instrumento:** boca
- **Procedimiento:** captación por el sentido del gusto.
- **Expresión final:** conforme/no conforme

Color

Definición conceptual: Las sensaciones producidas por los rayos que son percibidas por los órganos visuales y dependen de la longitud de onda (38).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativa
- **Forma de medición:** directa
- **Escala de medición:** nominal
- **Instrumento:** ojos
- **Procedimiento:** captación por el sentido de la vista
- **Expresión final:** conforme/no conforme

3.5.6. Calidad del rotulo y envase

Definición conceptual: Sobre la calidad del rotulado, hace referencia a la información que se imprime o adhiere al envase de medicamentos o productos biológicos, la cual está sujeta a la autorización otorgada mediante el registro sanitario condicional, así la como la calidad del envase que debe garantizar la protección del medicamento de factores externos como la luz o temperatura, y garantizar el recorrido seguro del medicamento. (41).

Nombre del Producto

Definición conceptual: El nombre reconoce un grupo de productos que tienen características comunes y representan cada uno de los diferentes tipos o grupos de productos que se pueden pedir (40).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Instrumento:** Lectura por medio de la vista
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista
- **Expresión final:**
 - Conforme: Presenta el nombre del producto.
 - No conforme: No presenta el nombre del producto

Contenido Nominal

Definición conceptual: El contenido del fármaco se indica en la etiqueta del paquete como porcentaje, microgramo, miligramo o gramo del fármaco o su fracción terapéuticamente activa (41)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cualitativa.
- **Forma de medición:** Indirecta.
- **Escala de medición:** De Razón.
- **Instrumento:** Balanza / Probeta graduada.
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista.
- **Expresión final:**
 - Conforme: Contenido nominal igual al informado en la etiqueta con la discrepancia máxima de $\pm 5\%$

No conforme: Contenido nominal distinto al informado en la etiqueta con una discrepancia mayor de $\pm 5\%$.

Número de Lote

Definición conceptual: Es una agrupación especificada de números y letras que corresponde a la codificación y puede detallar lotes, meses, años de fabricación y números de serie (42)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cualitativa.
- **Forma de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Nominal.
- **Instrumento:** Lectura por medio de la vista.
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista.
- **Expresión final:**

Conforme: Presenta el número de lote.

No conforme: No presenta el número de lote.

Número de Notificación Sanitaria Obligatoria (NSO)

Definición conceptual: Los productos naturales requieren la presentación de dictámenes de higiene obligatorios a la autoridad nacional competente para su comercialización o venta en una subregión (42)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cualitativa.
- **Forma de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Nominal.
- **Instrumento:** Lectura por medio de la vista.
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista.
- **Expresión final:**

Conforme: Presenta el número de NSO declarada en el registro de datos virtuales de la DIGEMID

No conforme: No presenta el número de NSO informado en el registro de datos virtuales de la DIGEMID.

Laboratorio Fabricante

Definición conceptual: Empresas dedicadas a actividades tales como fabricación, envasado, pruebas, reempaquetado y / o re etiquetado de productos farmacéuticos (41).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cualitativa.
- **Forma de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Nominal.
- **Instrumento:** Lectura por medio de los ojos.
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista.
- **Expresión final:**

Conforme: Presenta el nombre del laboratorio fabricante.

No conforme: No presenta el nombre del laboratorio fabricante.

Instrucciones de uso

Definición conceptual: Conjunto de directivas acerca del período de tiempo y la cantidad de un producto que puede consumirse sin peligro, así como otras instrucciones especiales acerca de cómo usar el producto (42)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cualitativa.
- **Forma de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Nominal.
- **Instrumento:** Lectura por medio de los ojos.
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista.
- **Expresión final:**

Conforme: Presenta instrucciones de uso

No conforme: No presenta instrucciones de uso

Integridad del Envase

Definición conceptual: Totalmente moldeado por el producto y el empaque es el primer aspecto que experimenta el consumidor. El empaque aumenta el valor de un producto al proteger, comunicar y preservar sus propiedades (42)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Instrumento:** Lectura por medio de la vista
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista
- **Expresión final:**
Conforme: El producto terminado se encuentra en buen estado.
No conforme: El producto terminado no se encuentra en buen estado

Hermeticidad del Envase

Definición conceptual: Esta prueba está diseñada para comprobar el cierre o sellar productos que contienen diferentes formas de dosificación y para dispositivos médicos (42)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Instrumento:** Lectura por medio de la vista
- **Procedimiento:** Captación por el sentido de la vista
- **Expresión final:**
Conforme: Correcto sellado hermético del envase al abrir y cerrar.
No conforme: Incorrecto sellado hermético del envase al abrir y cerrar.

3.5.7. Control de calidad microbiológico

Definición conceptual: Un procedimiento que permite la evaluación y registro de resultados cualitativos de una muestra. Verificamos la correcta elección del sistema de almacenamiento, el estado de los ingredientes de la formulación, sus posibles interacciones y la calidad de procesamiento del producto desde el desarrollo. Hasta que llegue al usuario (43,44).

Indicadores

Recuento total de microorganismos aerobios, mesófilos viables

Definición conceptual: Se consideró que el número total de organismos aeróbicos termófilos era equivalente al número de unidades formadoras de colonias encontradas (44).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cuantitativa
- **Forma de medición:** directa
- **Escala de medición:** razón
- **Instrumento:** cultivo en placas Petri y el contador de colonias.
- **Expresión final:** UFC/g

Recuento total de hongos filamentosos y levaduras

Definición conceptual: Se refiere a la cuantificación de la población de estos microorganismos presentes en una muestra determinada. Se utiliza en microbiología y control de calidad, y se realiza mediante técnicas de cultivo en medios de agar específicos que favorecen su crecimiento. (44).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cuantitativa
- **Forma de medición:** directa
- **Escala de medición:** razón
- **Instrumento:** Contador de colonias.

- **Expresión final:** UFC/g

Identificación de *Escherichia coli*

Definición conceptual: E. coli es un bacilo gramnegativo, una bacteria común que se encuentra en los intestinos de los humanos y diferentes animales de sangre caliente. La mayor parte de las cepas son inofensivas, pero existen algunas que pueden causar un envenenamiento alimentario grave. La infección por E. coli generalmente se transmite al consumir alimentos y agua contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda (43).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativa
- **Forma de medición:** directa
- **Escala de medición:** nominal
- **Instrumento:** siembra en placa Petri y un contador de colonias.
- **Expresión final:** presencia/ausencia

Identificación de salmonella

Definición conceptual: Género Salmonella Pertenece a la familia Enterobacteriácea. Son bacilos anaerobios gramnegativos Salmonella. Se clasifican en serotipos basados en lipopolisacárido (O), proteína estrella (H) y en algunos casos antígeno capsular (Vi). Hay más de 2500 serotipos conocidos. Puede haber varias cepas dentro del serotipo con diferentes grados de toxicidad (44).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** cualitativa
- **Forma de medición:** directa
- **Escala de medición:** nominal
- **Instrumento:** siembra en placa Petri y un contador de colonias.
- **Expresión final:** presencia/ausencia

3.6. Operacionalización de variables

Variables • <i>Indicadores</i>	Naturaleza	Forma de medición	Escala	Instrumento	Expresión final de la variable
Actividad antioxidante	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro UV-Vis	Porcentaje de inhibición de DPPH
Polifenoles	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro UV-Vis	Absorbancia
Flavonoides	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro UV-Vis	Absorbancia
Control fisicoquímico					
• <i>Densidad</i>	Cuantitativo	Indirecta	Razón	Picnómetro	g/ml
• <i>pH</i>	Cuantitativo	Indirecta	Razón	Potenciómetro	Valor de pH
Características organolépticas					
• <i>Aroma</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Nariz	Conforme / No conforme
• <i>Color</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Vista	Conforme / No conforme
• <i>Sabor</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Boca	Conforme / No conforme
Calidad del rotulo y envase					
• <i>Nombre del producto</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Vista	Indica / No indica
• <i>Contenido nominal</i>	Cualitativo	Indirecta	Razón	Balanza / Probeta graduada	Conforme / No conforme
• <i>Número de lote</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Vista	Indica / No indica
• <i>Número de notificación sanitaria obligatoria</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Base de datos de la DIGEMID	Conforme / No conforme
• <i>Laboratorio fabricante</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Vista	Indica / No indica
• <i>Instrucciones de uso</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Vista	Indica / No indica
• <i>Integridad del envase</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Vista	Conforme / No conforme
• <i>Hermeticidad del envase</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Vista	Conforme / No conforme
Control microbiológico					
• Microorganismos aerobios mesófilos	Cuantitativo	Directa	Razón	Contador de colonias	UFC/g
• Hongos filamentosos y levaduras	Cuantitativo	Directa	Razón	Contador de colonias	UFC/g
• <i>Escherichia coli</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Contador de colonias	Presencia / Ausencia
• <i>Salmonella</i>	Cualitativo	Directa	Nominal	Contador de colonias	Presencia / Ausencia

3.7. Procedimiento el procedimiento

3.7.1. Determinación de la actividad antioxidante con el radical libre DPPH

Recolección de muestra

Para recolectar las muestras de investigación, visitamos varias casas naturistas en el centro de Cusco, tomamos muestras al azar de cada casa naturista y descubrimos que el propóleo se expendía como solución oral.

	N° de establecimientos que presentan el producto	N° de establecimientos que no presentan el producto
Productos con propóleo	19	0
Productos de soluciones orales de propóleo	4	15

Fuente: Elaboración propia.

Preparación de la muestra

Como se tiene ya las muestras de soluciones orales de propóleo se midieron las siguientes alícuotas de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 1: Alícuotas de las muestras de soluciones orales de propóleo

N° de muestras	Alícuota (mL)	Volumen aforado (mL)	Concentración (%v/v)
1°	1	10	10
2°	2	10	20
3°	3	10	30
4°	4	10	40
5°	5	10	50

Fuente: Sánchez, 2011 (45)

Este procedimiento se realiza para cada muestra de extracto de propóleo tomada de las casas naturistas.

Preparación del reactivo

Se pesó 1.2 mg de DPPH y se disolvió en etanol de 96°GL, luego se aforo a 100mL, obteniéndose una concentración 0,012 mg/ml.

3.7.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Fundamento: El método de la presente se basó en la captura estable de radicales DPPH. Los radicales DPPH tuvieron un color violeta intenso y se redujeron en presencia de antioxidantes y otros radicales.

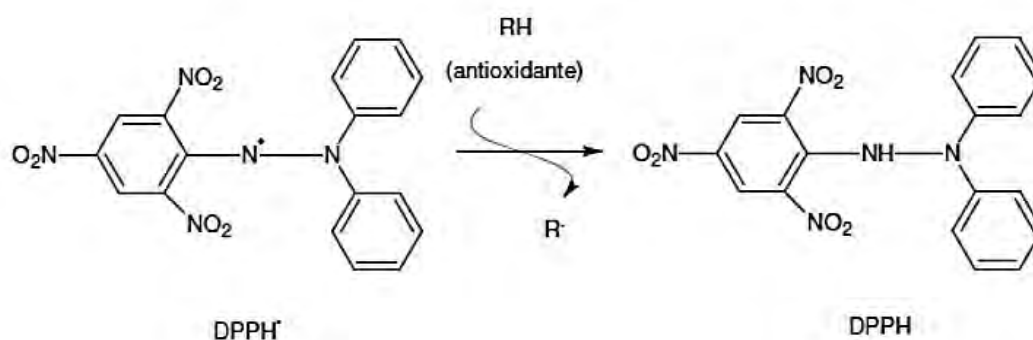


Figura 6: Fundamento de la capacidad antioxidante

Fuente: Sánchez, 2011 (45)

Así, la actividad antioxidante de una muestra se cuantifico midiendo el grado de decoloración causado por los antioxidantes presentes en diferentes muestras de propóleos a diferentes concentraciones, reduciendo así el reactivo y por tanto su absorbancia va disminuyendo (45).

Tabla 2: Diluciones de las muestras para la capacidad antioxidante

Sistema N°	Volumen de reactivos (mL)							
	Agua	Etanol	DPPH	Muestra				
				1	2	3	4	5
1	1.1							
2		0.1	1					
3			1	0.1				
4			1		0.1			
5			1			0.1		
6			1				0.1	
7			1					0.1

Fuente: Sánchez, 2011 (45)

Las lecturas de absorbancia del sistema formado se realizaron a temperatura ambiente, protegido de la luz y a 517 nm.

El espectrofotómetro se calibró con agua destilada, sistema N° 1.

Se comprobó la absorbancia del blanco, sistema N° 2.

Se monitorizó las absorbancias de los sistemas 3,4,5, 6 y 7 a partir de los primeros 30 minutos (t_0-t_{30}) (45).

3.7.2.1. Determinación del porcentaje de captación del DPPH (%C)

Luego de obtener las lecturas de absorbancia, se evaluó la capacidad antioxidante de la muestra de propóleo. Se expresa como porcentaje de captación (%C) de DPPH según la siguiente ecuación (45):

$$\%Captación (\%C) = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

Donde:

A: absorbancia del blanco.

A₁: absorbancia del sistema.

3.7.3. Identificación de compuestos fenólicos

Se utilizó el método espectrofotométrico Folin Ciocalteu descrito por Kumasawa con algunas modificaciones para determinar el número total de fenoles (13).

Fundamento: En base a sus propiedades reductoras, se utilizó una solución de ácido fosfowolfrámico y ácido fosfomolibdico como reactivo en el medio básico y se redujo mediante la oxidación de compuestos fenólicos, obteniendo óxidos azules de wolframio (WO_3) y el molibdeno (MoO_3). La absorbancia del azul revelado se midió a una longitud de onda de 765nm. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico (13).

3.7.3.1. Determinación de polifenoles

Se elaboró una curva patrón utilizando ácido gálico como compuesto fenólico de referencia (500 ug/mL). Se adiciono en orden, ácido gálico, agua, bicarbonato 7.5% y por último el reactivo de Folin Ciocalteu 1:10, esta mezcla se homogenizo con un vórtex después de adición de cada reactivo, como se muestra en el cuadro. Esta solución se colocó en un baño de agua a 45 °C por un periodo de 20 minutos. Luego se realizó la lectura de la absorbancia a 765nm, contra el blanco (13).

Tabla 3: Procedimiento para la elaboración de curva patrón ácido gálico

Agua (mL)	Ácido gálico (mL)	Ácido gálico (mg/L)	Folin Ciocalteu (mL)	Na ₂ CO ₃ (mL)	Solucion de propoleo (mL)
0.88	0.12	60	2.5	2	0
0.90	0.10	50	2.5	2	0
0.92	0.08	40	2.5	2	0
0.94	0.06	30	2.5	2	0
0.96	0.04	20	2.5	2	0
1	0	0	2.5	2	0
0.95	0	0	2.5	2	0.05
0.95	0	0	2.5	2	0.05

Fuente: Sánchez y Atau 2008 (13)

3.7.4. Identificación de compuestos flavonoides

Para la determinación de flavonoides se realizó de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Woisky y Salatino con algunas modificaciones (46).

Fundamento

El catión aluminio formo complejos estables con los flavonoides en solución etanólico, siendo posible un análisis espectrofotométrico a mayores longitudes de onda (415 nm), e incremento la absorción. De esta manera fue posible establecer la cantidad de flavonoides para prevenir la interferencia de diferentes sustancias primordialmente los ácidos fenólicos (13).

Procedimiento

Se tomaron las concentraciones necesarias de la solución oral de propoleo para el análisis colorimétrico (13).

La quercetina di hidratada 97%, fue usado para hacer la curva de calibración, se pesó 50 mg y se disolvió en 50 mL de etanol al 80% (100 ug/mL), se prepararon seis soluciones de quercetina a concentraciones en el rango de 5 a 30 ug/mL en etanol. Las soluciones estándares diluidas fueron mezcladas con etanol 95%, 0.1 mL cloruro de aluminio 10%, 0.1 mL acetato de sodio 1M y 2.8 mL de etanol 80%. Posteriormente de una incubación a T ambiente por 30 minutos, se cuantifico la absorbancia a 415 nm con el espectrofotómetro 300 la cantidad de cloruro de aluminio al 10% fue sustituido por la misma cantidad de agua destilada en el blanco. De la misma manera se hizo reaccionar 0.5 mL de cada extracto de propóleos por duplicado (13).

Tabla N° 7: Procedimiento para la elaboración de la curva patrón de quercetina dihidratada

Quercetina dihidratada (mL)	Etanol 95% (mL)	Cloruro de aluminio 10% (mL)	Acetato de sodio 1M (mL)	Etanol 80% (mL)	Extracto etanólico (mL)
0.05	1.95	0.1	0.1	2.8	-
0.1	1.9	0.1	0.1	2.8	-
0.15	1.85	0.1	0.1	2.8	-
0.2	1.8	0.1	0.1	2.8	-
0.25	1.75	0.1	0.1	2.8	-
0.3	1.7	0.1	0.1	2.8	-
-	2	0.1 mL (H ₂ O)	0.1	2.8	-
-	1.5	0.1	0.1	2.8	0.5
-	1.5	0.1	0.1	2.8	0.5

Fuente: Sánchez y Atau (13)

En conjunto la valoración se registró en el informe de reporte de resultados de la cuantificación de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante de las soluciones orales de propóleo en el anexo 4 (47)

3.7.5. *Análisis fisicoquímico*

3.7.5.1. pH

Se midió con un potenciómetro y esta fue calibrada antes con una solución amortiguadora o tampón de pH 4 y 7. Se retiró los electrodos del buffer, se limpió con H₂O destilada y se secó con papel de filtro.

3.7.5.2. Densidad

Pese un picnómetro seco vacío y registre su volumen. Llenar una porción de la muestra a analizar, almacenar a temperatura ambiente, llevar la muestra a un nivel utilizable, extraer el exceso con un papel y dejar secar fuera del picnómetro.

Para calcular la densidad se utiliza la fórmula siguiente: $\rho = \frac{P_1 - P_2}{VP}$

P₁: Masa de picnómetro vacío (g)

P₂: Masa de picnómetro con muestra (g)

VP: Volumen contenido del picnómetro (mL)

3.7.5.3. Características organolépticas

- **Olor:** Se vertió 5 mL del extracto en un vaso precipitado y se apreció el olor directamente.
- **Color:** Se vertió 5 mL en una placa Petri y se comparó el color con un fondo blanco.
- **Sabor:** Se puso 2 gotas de extracto en el medio de la lengua. (2)

3.7.5.4. Calidad del rotulo y envase

Evaluación de la rotulo o etiqueta

Las etiquetas o rótulos para materiales de envasado de productos farmacéuticos en el mercado deben contener datos importantes y tener en cuenta los siguientes parámetros:

- **Nombre del producto y contenido nominal: En peso y volumen**

Para determinar el peso del contenido, se pesó el contenedor integro al inicio del estudio y se registró el peso, y al final del estudio el volumen del contenedor está completamente vacío; se pesó el contenedor vacío registrando los datos.

Para comprobar la cantidad del contenido, se tomó una medida directamente en una probeta. Estos datos tuvieron una diferencia máxima de $\pm 5\%$ del contenido indicado en el recipiente (5).

- **Número de lote, fabricante, instrucciones**

La información correspondiente a número de lote, laboratorio que elaboró el producto e instrucciones de uso, será revisados mediante inspección visual en la etiqueta y/o rotulo del producto. Una vez verificado, estos serán registrados.

- **Número de Notificación Sanitaria Obligatoria (NSO)**

Se cotejó el NSO señalada en la etiqueta de cada una de las muestras para ver si esta es conforme a la inscrita y al reporte en el directorio de datos de la DIGEMID (5)

Evaluación del envase o empaque

La estabilidad y compatibilidad del producto con los materiales de embalaje son definiciones distintas y complementarios a un producto antes de que pueda venderse. Esta prueba evaluó diferentes alternativas a los materiales de empaque para determinar cuál es la mejor para su producto.

El producto no puede sufrir ningún cambio físico o químico que afecte su calidad de los límites aceptables o permisibles.

La evaluación tiene en cuenta lo siguiente:

- **Integridad del envase**

Se verifico todos los daños y cambios, deformaciones, roturas, grietas, perforaciones, etc. Todas estas verificaciones se realizaron en el cuerpo del envase (47).

- **Hermeticidad**

Se confirmó el sellado del contenedor principal, y este control aseguro la estabilidad y el almacenamiento del producto, de la misma forma aseguro que no entren o salgan materias extrañas del producto (47).

La evaluación completa se registró en el formulario de informe de la prueba de Control Organoléptico, descrito en el anexo 2.

3.7.6. Control microbiológico

3.7.6.1. Preparación de la dilución de trabajo

Se pesó 1 g de cada una de las muestras en frascos estériles y se les añadió 8 mL de caldo digerido de Caseína y Soja. Para favorecer la disolución, se adiciono 1 mL de tween 80 y mover constantemente hasta obtener una solución homogénea, de esta manera se logró conseguir la dilución 10-1, esta dilución se empleó inmediatamente para el conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables y para el conteo total combinado de hongos filamentosos y levaduras para posteriormente incubar a 30-35 °C por 24 horas y ser empleada para la identificación de microorganismos específicos (47).

3.7.6.2. Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables

De la dilución 10:1 se sembró en Agar Digerido de Caseína y Soja por el procedimiento de vertido de placa, se puso 1 mL de la dilución 10:1 y se añadió 20 mL del agar, se mezcló seguidamente por movimientos de rotación y vaivén de la Placa Petri. Una vez gelificado el Agar se incubó de manera invertida de 30- 35 °C durante 24 a 48 horas. Se preparó al menos 2 placas por cada medio.

Lectura de resultados: el resultado fue equivalente al número de colonias encontradas en Agar Caso (si se detectan hongos filamentosos, contarlos como recuento total de microorganismos aerobios, que se expresa como UFC/gr (47).

Límite de aceptación: máximo 1×10^3 UFC/g o mL.

3.7.6.3. Recuento total combinado de hongos filamentoso y levaduras

De la dilución 10-1 se sembró en Agar Sabouraud por el procedimiento de vertido de placa, se puso 1 mL de la dilución 10-1 y adicionar 20 mL del Agar, se mezcló en seguida por movimientos de rotación y vaivén de la Placa Petri. Una vez gelificado el agar se incubo a una temperatura de 20 – 25 C de forma invertida por 5 a 7 días. Se preparó al menos 2 placas por cada medio.

Lectura de resultados: Fueron equivalentes a la cantidad de colonias ubicadas en Agar Caso (en el caso que se detecten bacterias contarlos como hongos) y estas se expresan como UFC/gr (47).

Límite de aceptación: máximo 1×10^2 UFC/g o mL.

3.7.6.4. Identificación de Coliformes Totales (*E. coli*)

Después de incubar por 24 horas la dilución 10-1, se tomó una muestra de la dilución de 1 mL y se transvaso a un envase con contenido de 100 mL de Caldo MacConkey, se mezcló y luego se incubo de 42 a 44 °C durante 24 a 48 horas. Se procedió a sub cultivar en una placa de Agar MacConkey e incubar de 18 a 72 horas a 30 a 35 °C. Se preparó por lo menos 2 placas para cada uno de los medios.

Lectura de resultados: Fue positiva para *E. coli* si en esta se observó el crecimiento de colonias bien desarrolladas de un color rojo bordeadas por una zona turbia y algún crecimiento para el resto de Coliformes Totales. Se procedió a realizar la bacteria bioquímica para enterobacterias que nos permitió identificar al microorganismo (47).

Límite de aceptación: Ausencia de coliformes totales en 1 g o ml

Capítulo IV. Resultados

4.1. De la actividad antioxidante

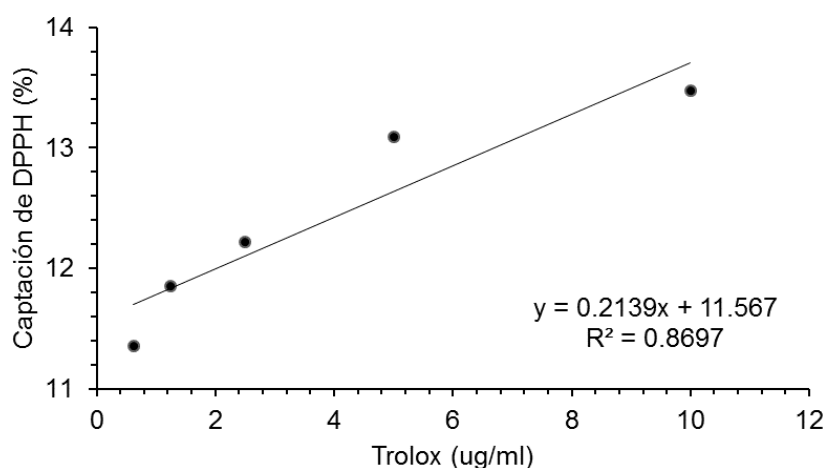
4.1.1. Curva de calibración con Trolox

Tabla 4: Porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de Trolox

Concentración de Trolox (ug/mL)	Captación de DPPH (%)
0.625	11.35
1.25	11.85
2.5	12.22
5	13.09
10	13.47

Fuente: Elaboración propia

Figura 6: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón trolox versus sus valores de absorbancia



Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

En la figura 6 se muestra la curva de calibración del trolox obtenido a partir de los datos de la tabla 4, donde se establece la relación de entre los diferentes porcentajes de captación de DPPH a diversas concentraciones del patrón. En la figura se aprecia la ecuación de la regresión lineal $y = 0.2139x + 11.567$, con un R^2 (coeficiente de determinación) igual a 0.8697, lo cual significa que esta ecuación de la recta

establece un 86.97% de relación directa entre el porcentaje de captación de DPPH y la concentración de trolox, mediante la ecuación mencionada.

4.1.2. **Determinación del coeficiente de inhibición al 50% (IC₅₀) del trolox**

El IC₅₀ representa la concentración de un compuesto que se necesita para reducir la actividad del DPPH en un 50%. Se mide espectrofotométricamente, midiendo el cambio en la absorbancia de la solución de DPPH a medida que se añade el compuesto antioxidante (trolox) en diferentes concentraciones.

Con ello presente, para calcular el IC₅₀ teórico, se puede usar la ecuación de regresión lineal de la figura 6 para calcular que concentración de trolox (x) alcanza un porcentaje de captación del 50% de DPPH (y). Así, despejando x en la ecuación, tenemos:

$$x = \frac{y - 11.567}{0.2139}$$

Con lo cual, reemplazando “y” por el valor de 50, nos da un valor de “x” igual a 179.677 ug/mL de trolox. Siendo este la concentración necesaria para que se reduzca la actividad del DPPH en un 50%.

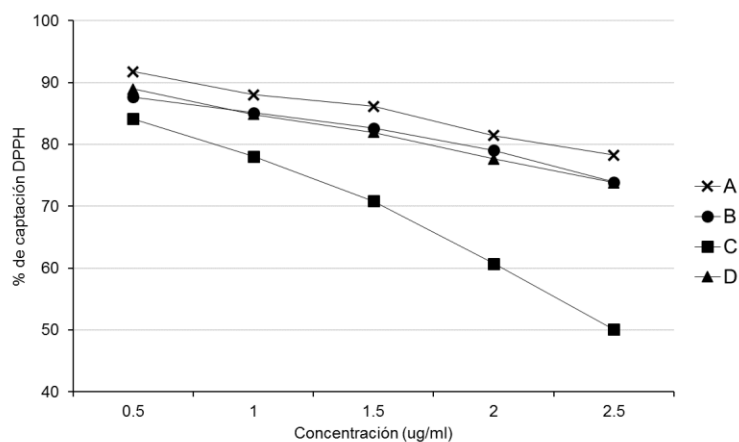
4.1.3. **Porcentaje de captación de DPPH en soluciones de propóleo**

Tabla 5: Resultados de porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de las soluciones orales de propóleo

Concentraciones de propóleo (ug/mL)	% de captación de las muestras			
	A	B	C	D
0.5	91.740	87.670	84.120	88.940
1	88.050	85.130	78.060	84.870
1.5	86.150	82.630	70.870	81.950
2	81.450	79.030	60.740	77.630
2.5	78.270	73.900	50.110	73.810
Promedio del % de captación	85.132	81.672	68.780	81.440
Desviación estándar	5.335	5.391	13.592	5.937

Fuente: Elaboración propia

Figura 7: Gráfico de dispersión con los valores del porcentaje de captación de las soluciones orales de propóleo, de acuerdo a diversas concentraciones

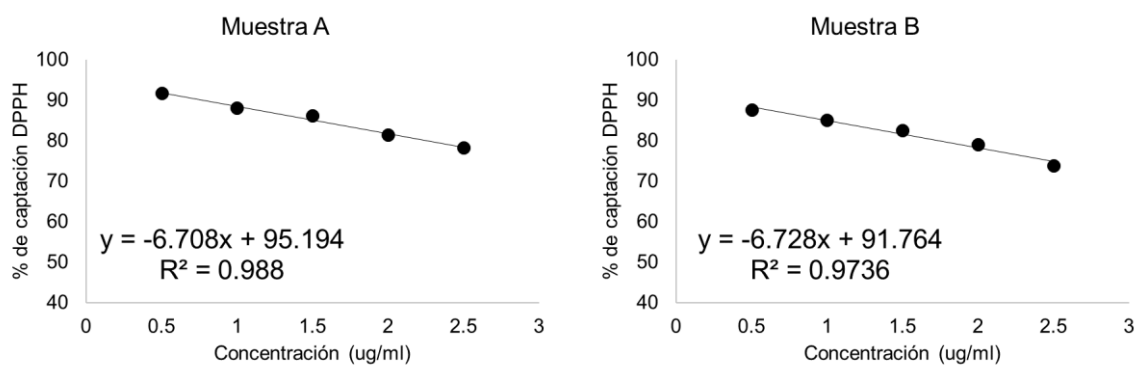


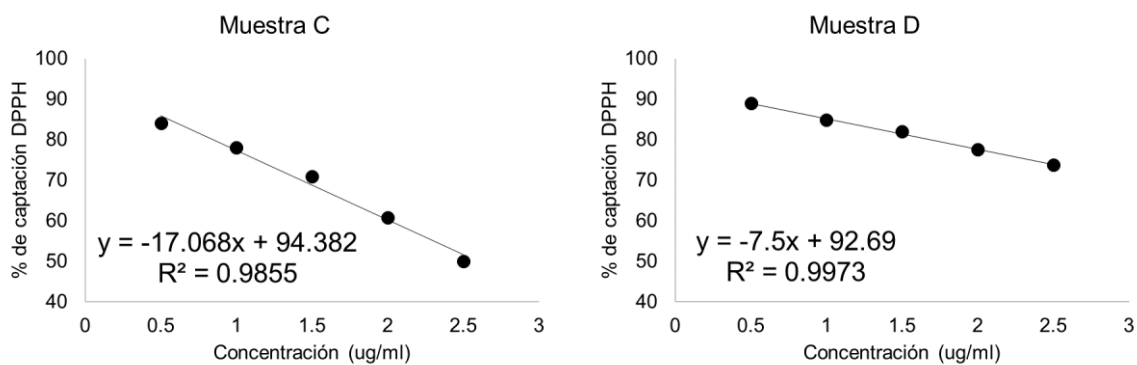
Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

Se aprecia que el mayor porcentaje de captación de DPPH a menor concentración es para la muestra A.

Figura 8: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de los porcentajes de captación de DPPH versus diversas concentraciones de soluciones de propóleo





Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

Para determinar la IC₅₀ de las diversas soluciones orales de propóleo, se consideró las ecuaciones de regresión lineal calculadas y mostradas en la figura 8. Teniendo en cuenta que para determinar que concentración de soluciones orales de propóleo alcanza un porcentaje de captación igual al 50%, se reorganizó las ecuaciones tal que se despeje la variable “x” correspondiente a las concentraciones, como se muestra en la tabla 6

Tabla 6: Ecuaciones usadas para determinar el IC₅₀

Muestra			
A	B	C	D
$x = \frac{95.194 - y}{6.708}$	$x = \frac{91.764 - y}{6.728}$	$x = \frac{94.382 - y}{17.068}$	$x = \frac{92.69 - y}{7.5}$

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7: Valores de IC₅₀ calculados para cada solución de propóleo analizado

Muestra	IC ₅₀ (ug/mL)
A	6.737
B	6.207
C	2.600
D	5.692

Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

De acuerdo a los datos de la tabla 7, se concluye que el extracto que presenta una mejor capacidad antioxidante es aquella solución oral de propóleo con el menor valor de IC₅₀, concordando con lo señalado por Verdugo y Tola en su estudio sobre composición química de propóleos en Ecuador (48). Considerando ello, la solución de propóleo con mejor actividad antioxidante corresponde a la muestra C (IC₅₀ = 2.6 ug/mL), superando al valor de IC₅₀ del trolox (179.677 ug/mL). También, contrastando los resultados versus la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, "Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento", donde indican que la actividad antioxidante mínima en propóleos de consumo humano debe ser de 100 ug/mL, por lo que los propóleos evaluados en nuestro distrito si cumplirían con ese criterio, debido a que superan este rango en el especial la muestra C.

4.2. Del contenido de polifenoles totales

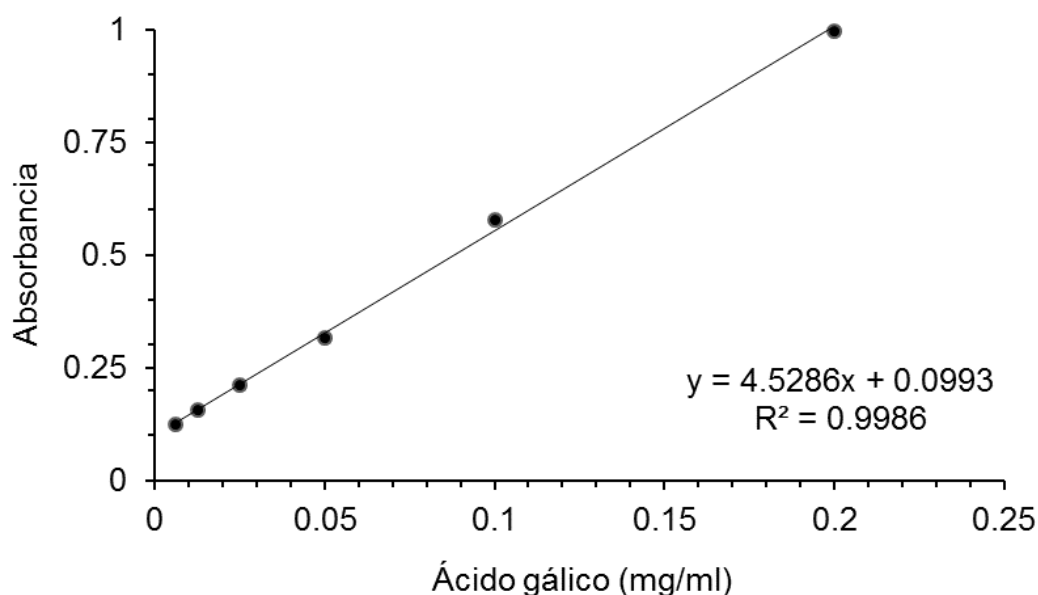
4.2.1. Curva de calibración con ácido gálico

Tabla 8: Resultados de las absorbancias del estándar de ácido gálico

Concentración de ácido gálico (mg/L)	Absorbancia
60	0.125
50	0.155
40	0.212
30	0.315
20	0.576
0	0.996

Fuente: Elaboración propia

Figura 09: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón ácido gálico versus sus valores de absorbancia



Fuente. Elaboración propia

Análisis e interpretación

En la figura 9 se muestra la curva de calibración del ácido gálico obtenido a partir de los datos de la tabla 8, donde se establece la relación de entre las diferentes concentraciones de polifenoles totales en las soluciones orales de propóleos donde se consideró la absorbancia a 760 nm para el espectrofotómetro y diversas concentraciones de ácido gálico obteniéndose concentraciones proporcionales a partir de esta solución, de las cuales se calculó la ecuación de la regresión lineal $y = 4.5286x + 0.0993$, con un R^2 (coeficiente de determinación) igual a 0.9986, lo cual significa que esta ecuación de la recta establece un 99.86% de relación directa entre las absorbancias y la concentración del ácido gálico mediante la ecuación mencionada. Asimismo, nos permite predecir las concentraciones del contenido de polifenoles totales basándonos en los valores de absorbancia de las muestras de las soluciones orales de propóleos, expresado en equivalentes de ácido gálico.

4.2.2. Ensayos de cuantificación de polifenoles totales

Tabla 9: Valores de absorbancia de las soluciones orales de propóleo para determinar el contenido de polifenoles totales.

		Muestra			
		A	B	C	D
Valores de absorbancia	Lectura 1	1.132	0.689	0.523	0.987
	Lectura 2	1.132	0.697	0.527	0.983
	Lectura 3	1.133	0.692	0.525	0.985

Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

La ecuación obtenida en la figura 9 muestra una regresión lineal ($y = 4.5286x + 0.0993$), donde el eje Y representa los valores de absorbancia y el eje X representa las concentraciones de ácido gálico en mg/mL. Para determinar la concentración teórica de ácido gálico a partir de los valores de absorbancia, podemos despejar la variable X en la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - 0.0993}{4.5286}$$

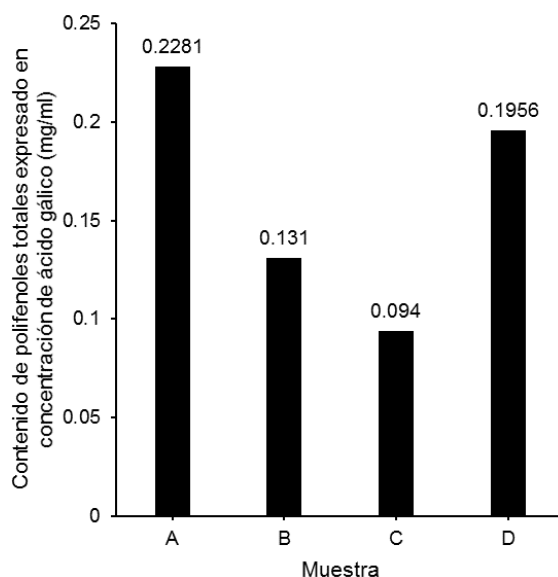
Con esta nueva ecuación, reemplazamos los valores de las absorbancias medidas, y así se obtiene los valores de concentración de ácido gálico teórico, que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 10: Valores teóricos del contenido de polifenoles totales en las soluciones orales de propóleos.

	Muestra			
	A	B	C	D
Concentración 1	0.2280	0.1302	0.0936	0.1960
Concentración 2	0.2280	0.1320	0.0944	0.1951
Concentración 3	0.2283	0.1309	0.0940	0.1956
Concentración promedio	0.2281	0.1310	0.0940	0.1956
Desviación estándar	0.0002	0.0009	0.0004	0.0005

Fuente: Elaboración propia

Figura 10: Gráfico de dispersión mostrando los valores teóricos promedio del contenido de polifenoles totales para cada muestra, expresado en mg de ácido gálico.



Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

La tabla 10 expresa el valor teórico del contenido total de polifenoles que están presentes en las soluciones orales de propóleos. Este valor fue calculado por medio de la fórmula de la ecuación de regresión que es obtenido de acuerdo al estándar de ácido gálico. La variabilidad en los resultados es mínima, como así puede ser confirmado por los valores de desviación estándar, y estas se encuentran dentro del rango de la especificación señalada para propóleos en la Norma Argentina IRAM-INTA 15935 1/2 (6), donde señalan que la cantidad mínima de polifenoles totales debe representar al menos un 0.25% del total de la muestra, y de acuerdo a nuestros resultados, en todos los casos supera la cantidad de polifenoles, supera ese porcentaje por cada miligramo de muestra. De igual forma, la concentración de polifenoles alcanza valores similares a los reportados en la investigación de cuantificación de polifenoles de Ruiz et al., para muestras analizadas de propóleo de las ciudades mexicanas de Jalisco, Sinaloa, Baja California y Aguascalientes (49)

Asimismo, en la figura 10 de dispersión, se aprecia que quien presenta más y menos contenido total teórico de polifenoles son las muestras A y C, respectivamente.

4.3. Del contenido de flavonoides totales

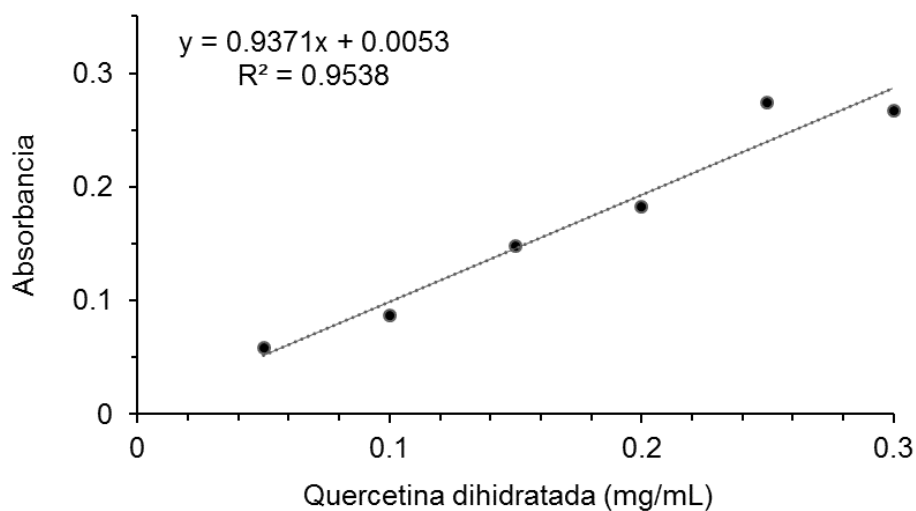
4.3.1. Curva de calibración con quercetina dihidratada

Tabla 11: Resultados de las absorbancias del estándar de quercetina dihidratada

Concentración de quercetina dihidratada (mg/mL)	Absorbancia
0.05	0.058
0.1	0.087
0.15	0.148
0.2	0.182
0.25	0.274
0.3	0.267

Fuente: Elaboración propia

Figura 7: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón quercetina dihidratada versus sus valores de absorbancia.



Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

En la figura 11 se muestra la curva de calibración de la quercetina dihidratada obtenido a partir de los datos de la tabla 11, donde se consideró la absorbancia a 415 nm para el espectrofotómetro y diversas concentraciones de quercetina dihidratada obteniéndose concentraciones proporcionales a partir de esta solución, logrando como resultado la ecuación de la recta $y = 0.9371x + 0.0053$, con un R^2 (coeficiente de determinación) igual a 0.9538, lo cual significa que esta ecuación de la recta establece un 95.38% de relación directa entre las absorbancias y la concentración de quercetina dihidratada mediante la ecuación mencionada. Asimismo, nos permite predecir las concentraciones del contenido de flavonoides totales basándonos en los valores de absorbancia de las muestras de las soluciones orales de propóleos, expresados en equivalentes de quercetina dihidratada, en este caso que esta expresado en 50 mg de solución oral de propóleos.

4.3.2. Ensayos de cuantificación de flavonoides totales

Tabla 12: Valores de absorbancia de las soluciones orales de propóleo para determinar el contenido de flavonoides totales.

		Muestra			
		A	B	C	D
Valores de Absorbancia	Lectura 1	1.693	0.386	0.369	0.540
	Lectura 2	1.653	0.371	0.375	0.540
	Lectura 3	1.625	0.385	0.372	0.549
Promedio de absorbancias		1.657	0.380	0.372	0.543

Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

Conforme a la ecuación obtenida en la figura 11, se observa que la ecuación de la regresión lineal ($y = 0.9371x + 0.0053$) contiene en su eje "y" a los valores de absorbancia, y en el eje "x" a los valores de las concentraciones de quercetina dihidratada en mg/mL. Así, para determinar la concentración de flavonoides teórico a partir de los valores de absorbancia despejamos la variable X en la ecuación, obteniendo:

$$x = \frac{y - 0.0053}{0.9371}$$

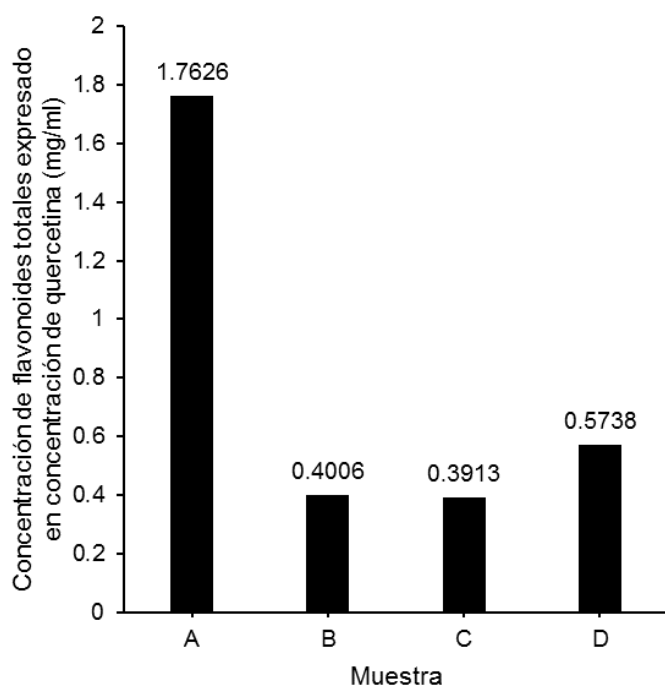
Con esta nueva ecuación, reemplazamos los valores de las absorbancias medidas, y así se obtiene los valores teóricos de concentración de flavonoides, que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 13: Valores teóricos del contenido de flavonoides en las soluciones orales de propóleos.

Valores de Absorbancia	Muestra			
	A	B	C	D
Lectura 1	1.8010	0.4063	0.3881	0.5706
Lectura 2	1.7583	0.3902	0.3945	0.5706
Lectura 3	1.7284	0.4052	0.3913	0.5802
Concentración promedio	1.7626	0.4006	0.3913	0.5738
Desviación estándar	0.0365	0.0089	0.0032	0.0055

Fuente: Elaboración propia

Figura 12: Gráfico de dispersión mostrando los valores teóricos promedio del contenido de flavonoides totales para cada muestra.



Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

La tabla 13 expresa el valor teórico del contenido total de flavonoides que están presentes en las soluciones orales de propóleos. Este valor fue calculado por medio de la fórmula de la ecuación de regresión que es obtenido de acuerdo al estándar de quercetina dihidratada. La variabilidad en los resultados es mínima, como así puede ser confirmado por los valores de desviación estándar, y estas también se encuentran dentro del rango de la especificación señalada para propóleos en la Norma Argentina IRAM-INTA 15935 1/2 (6), donde señalan que la cantidad mínima de flavonoides totales debe representar al menos un 0.25% del total de la muestra, y de acuerdo a nuestros resultados, en todos los casos supera la cantidad de polifenoles y se supera ese porcentaje por cada miligramo de muestra.

Verificando nuestros resultados contra los obtenidos por Araujo y Linares (11), en donde obtuvieron una concentración promedio de 0.254 mg/mL de flavonoides totales para muestras comerciales de propóleos expendidos en la ciudad de Trujillo; podemos afirmar que el contenido de flavonoides en las muestras de Cusco superan ese estudio previo.

Asimismo, en la figura 12 de dispersión se aprecia que quien presenta más y menos contenido teórico de flavonoides totales son las muestras A y C, respectivamente. Observándose el mismo patrón para el caso del contenido de polifenoles totales.

4.4. De los ensayos fisicoquímicos

Tabla 14: Resumen de la evaluación del control fisicoquímico de las soluciones orales de propóleos.

Parámetros	Rango de aceptación	Método	Muestra			
			A	B	C	D
pH	3.8 - 5.9	Tiras reactivas	5.00	5.00	5.00	5.00
		Potenciómetro	5.23	4.84	4.72	4.60
Densidad	0.831 - 0.889 g/mL	Picnómetro	0.86	0.84	0.80	0.85
Conforme a rango de aceptación			Si	Si	Si	Si

Fuente. Elaboración propia

Análisis e interpretación

Los valores de pH obtenidos mediante los métodos de tiras reactivas y potenciómetro para las diversas muestras de soluciones propóleo, se aproximan al valor de 4.9 obtenido por Aquino y Arroyo (50). Mientras que los valores de densidad obtenidos oscilan entre 0.8, lo cual concuerda con los valores descritos por Bueno (7). Cabe mencionar que, si bien estos parámetros no se encuentran de manera oficial en normativa, nuestros resultados concuerdan con trabajos previos.

4.5. Del control microbiológico

Tabla 15: Resultados de los controles microbiológicos de las soluciones de propóleo

Indicadores Microbiológicos	Límites Microbianos	Muestra			
		A	B	C	D
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	$\leq 10^4$ UFC/gr o mL	10^2 UFC/gr o mL	10^2 UFC/gr o mL	10^2 UFC/gr o mL	10^2 UFC/gr o mL
Recuento de hongos y levaduras	$\leq 10^3$ UFC/gr o mL	10 UFC/gr o mL	10 UFC/gr o mL	10 UFC/gr o mL	10 UFC/gr o MI
Identificación de <i>Salmonella</i> spp	Ausencia	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Identificación de <i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Resultados en conformidad a límites establecidos	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

Fuente: Elaboración propia, validado por el Hospital Regional del Cusco Anexo 10

Análisis e interpretación

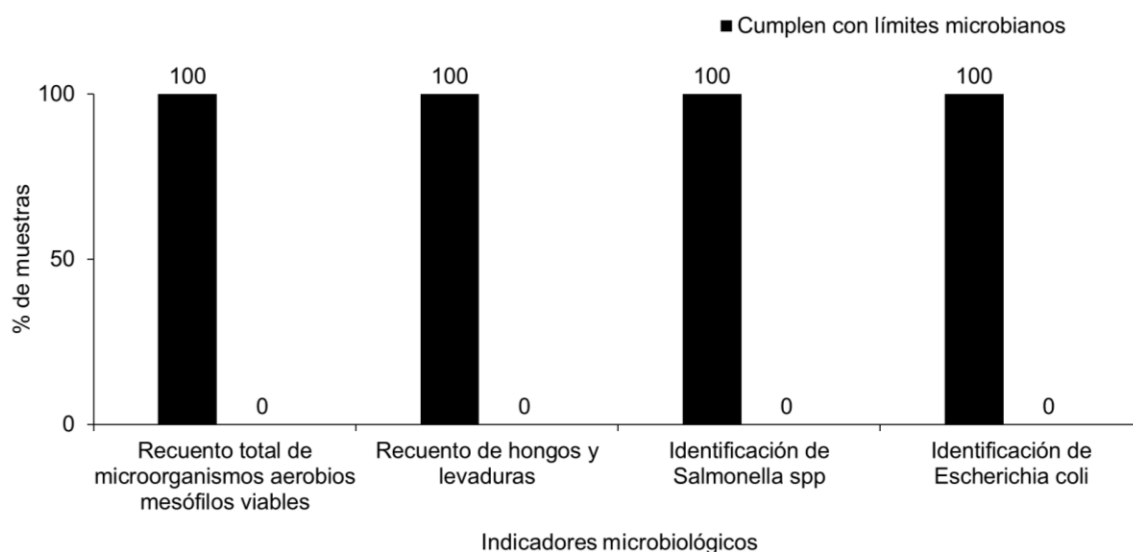
La Tabla 15 muestra los resultados de las pruebas microbiológicas de las 4 muestras de soluciones orales de propóleos. Los resultados indican que las soluciones orales no presentaron contaminación, cumpliendo así con las especificaciones establecidas por la "Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano" (50), en donde señala que para los propóleos, se establecen límites para aerobios mesófilos (10^3 UFC/gr), hongo y levaduras (10 UFC/gr) y *E. coli* (3 UFC/gr); y de acuerdo a los resultados obtenidos, las muestras analizadas cumplen los criterios microbiológicos.

En tanto que para *Salmonella* spp, la Norma Argentina IRAM-INTA 15935 1/2 (6) establece un límite de 10 UFC/gr, pero en nuestras muestras se evidencia ausencia de dicho microorganismo, con lo cual también se cumple con esta normativa.

Tabla 16: Resultados del cumplimiento de límites microbianos en las muestras

Indicadores microbiológicos	Cumplen con límites microbianos		No cumplen con límites microbianos	
	Cantidad de muestras	%	Cantidad de muestras	%
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	4	100	0	0
Recuento de hongos y levaduras	4	100	0	0
Identificación de <i>Salmonella</i> spp	4	100	0	0
Identificación de <i>Escherichia coli</i>	4	100	0	0

Figura 13: Gráfico de barras con los porcentajes de cumplimiento de los indicadores microbiológicos, respecto a las muestras



Fuente: Elaboración propia

Análisis y discusión

La tabla 16 muestra los resultados obtenidos en la evaluación del control microbiológico realizado en las 4 muestras de las soluciones orales de propóleo. En dicha tabla se especifica la presencia o ausencia de cada parámetro evaluado,

expresados en porcentajes. Estos porcentajes indican que las muestras no presentaron ningún tipo de crecimiento microbiológico.

En la figura 13, se observa que todas las muestras analizadas cumplieron con un 100% de conformidad en cuanto al conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables, el conteo total de hongos y levaduras, así como en la identificación de *Salmonella* spp y *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

En el estudio de calidad microbiológica realizado por Talero et al. (52) sobre propóleos crudos y extractos sólidos solubles de propóleos de *Apis mellífera* en Colombia, se informó que más del 50% de los extractos etanólicos de propóleo colombiano cumplían con los estándares establecidos por las normas de Brasil, Argentina y Japón, lo que los considera aceptables.

En cuanto a las muestras de propóleos crudos, se encontró que el 4% de ellas resultaron positivas para coliformes fecales, y de ese 4%, el 2% también presentaron presencia de *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, en el estudio de Almira y Ubillús (53) sobre la estandarización de propóleos de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco, como materia prima para su uso industrial, se llevó a cabo la identificación de la concentración mínima inhibitoria de las muestras de propóleos. Se observó que las muestras de propóleos en soluciones al 3% y 5% lograron inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404. Sin embargo, no se detectó crecimiento de cepas Gram negativas como *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en la muestra.

4.6. Del análisis organoléptico

Tabla 17: Resumen de la evaluación del control organoléptico de las soluciones orales de propóleos

Pruebas organolépticas	Especificación	Muestra			
		A	B	C	D
Olor	<ul style="list-style-type: none"> Resinoso Balsámico 	Balsámico fuerte agradable	Balsámico agradable	Balsámico	Resinoso
Color	<ul style="list-style-type: none"> Amarillo Pardo Verdoso Rojizo Marrón y sus tonalidades 	Amarillo pardo	Marrón	Amarillo	Pardo
Sabor	<ul style="list-style-type: none"> Variable, de suave a fuerte, amargo y picante. 	Amargo	Fuerte picante	Agradable suave	Amargo

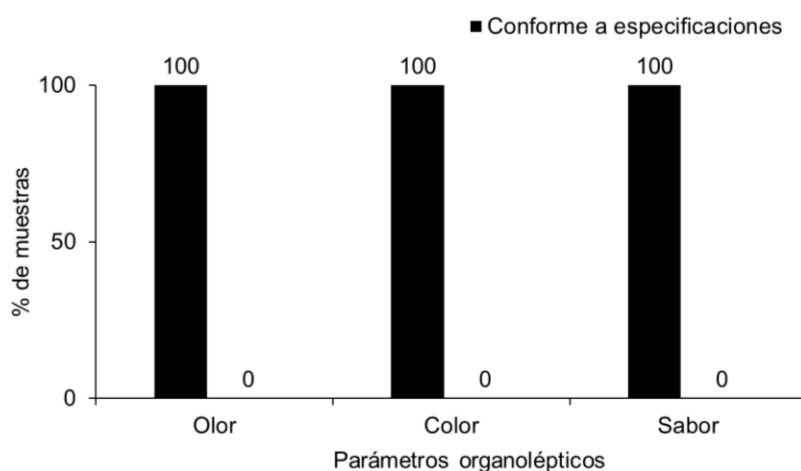
Fuente: Elaboración propia

Tabla 18: Tabla de frecuencias del cumplimiento de las especificaciones en cuanto a las características organolépticas

Parámetros	Conforme a especificaciones		No conforme a especificaciones	
	Cantidad de muestras	%	Cantidad de muestras	%
Olor	4	100	0	0
Color	4	100	0	0
Sabor	4	100	0	0

Fuente: Elaboración propia

Figura 14: Gráfico de barras con los porcentajes de cumplimiento de las especificaciones en cuanto a las características organolépticas



Fuente: Elaboración propia

Análisis y discusión

Las tablas 17 y 18, y la figura 14 presentaron los resultados del control organoléptico realizado a las muestras de soluciones orales de propóleos. Se observó una conformidad del 100% en cuanto a olor, color y sabor. Las muestras evaluadas cumplieron con la Norma Argentina IRAM-INTA 15935 1/2 (6) sobre propóleos, que también se aplican a los extractos de propóleos. Estos productos semielaborados contienen principalmente propóleos, alcohol etílico y agua. Según esta norma, el extracto de propóleos posee un olor resinoso y balsámico, un color que varía entre amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y sus diferentes tonalidades, y un sabor variable, de suave a fuerte, amargo y picante. Estas características organolépticas dependen del origen botánico.

En la tesis "Control de calidad del extracto de propóleos etanólico comercializado en los centros naturistas de la ciudad de Trujillo", escrita por Portal y Avendaño (54), se encontró que los resultados del control organoléptico de las muestras de extractos se ajustaron a las normas técnicas: Norma Rusa, Norma Salvadoreña y las normas IRAM. Según estas normas, la coloración varía entre amarillo verdoso en las muestras de la casa naturista Honey Bee, mientras que para la casa naturista Kaita y Santa Natura el color es castaño rojizo. En cuanto al aroma, las muestras

del extracto de propóleo de Honey Bee son levemente balsámicas, mientras que las muestras de Kaita y Santa Natura poseen un aroma balsámico moderado. En cuanto al sabor, los extractos presentaron un sabor variante de suave a fuerte y ligeramente picante.

Las tinturas y extractos líquidos y preparaciones similares son generalmente oscuras debido a que son preparaciones concentradas. Por lo tanto, es importante examinarlas cuidadosamente para detectar precipitación, conforme lo señala la USP 40. (47).

4.7. De la verificación en la calidad de los rótulos y envases

Tabla 19: Evaluación de los parámetros de rotulación en las muestras de soluciones orales de propóleos.

Evaluación de la etiqueta o rotulo	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D
Nombre del producto	Licor de propóleo	Tintura de propóleo	Tintura de propóleo	Macerado de propóleo
Número de Lote	171212	----	112020	109528
Fecha de vencimiento	12/2020	12/2021	12/2020	09/2020
Número de NSO	P9300212N/GAAIDR	F110081999	F6003315N/ NANTIT	P9307217N/NADASJL
Contenido nominal	20 mL	----	30 mL	30 MI
Laboratorio fabricante	Apicola y Derivados E.I.R.L.	Farmagel S.A.C	Natural Internacional E.I.R.L	Jalk E.I.R.L
Instrucciones de uso	-----	Asma, colesterol malo, laringitis, trastorno digestivo, estreñimiento. Uso externo: hemorroides, hongos de los pies, cicatrizante de heridas.	Reforzar el sistema inmunológico, fortalece las vías respiratorias. Ayuda a mejorar: asma tos, bronquios, faringitis, laringitis, sinusitis. Antibacteriano y antiinflamatorio	Aftas bucales, anginas, faringitis, sinusitis, abscesos dentales, resfriados, gripe, tos.

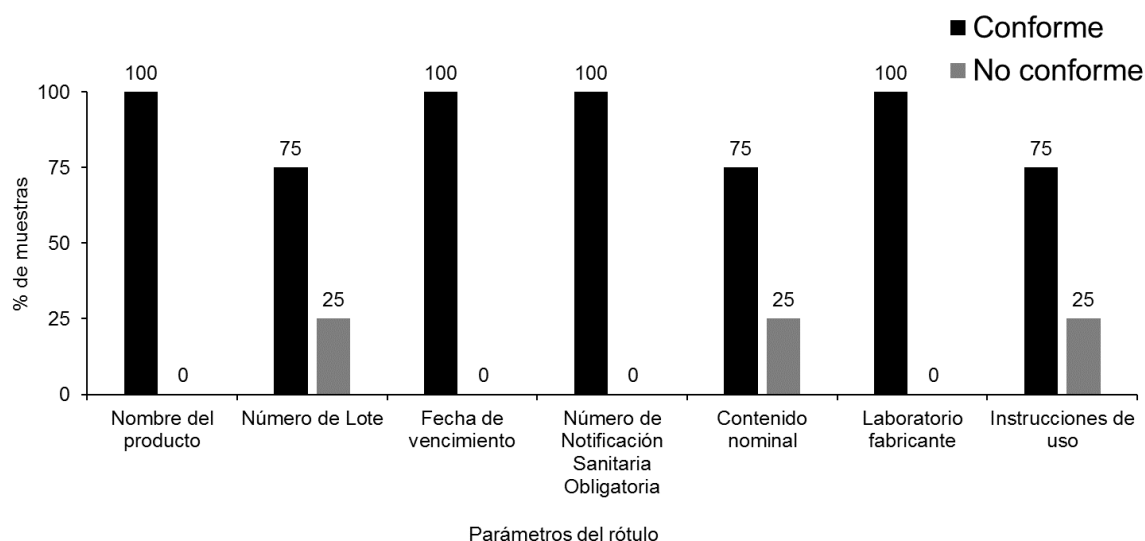
Fuente: Elaboración propia

Tabla 20: Frecuencia de los parámetros presentes en el rótulo de las muestras

Parámetros	Conforme		No conforme	
	Cantidad de muestras	%	Cantidad de muestras	%
Nombre del producto	4	100	0	0
Número de lote	3	75	1	25
Fecha de vencimiento	4	100	0	0
Número de NSO	4	100	0	0
Contenido nominal	3	75	1	25
Laboratorio fabricante	4	100	0	0
Instrucciones de uso	3	75	1	25

Fuente: Elaboración propia

Figura 15: Porcentaje de las muestras evaluadas que cumplen con los parámetros de calidad en cuanto a la rotulación



Fuente: Elaboración propia

Análisis y discusión

La tabla N° 19 muestra los resultados de la evaluación realizada a las muestras de soluciones orales de propóleos en relación a las etiquetas o rótulos de los productos. En ella se detalla la conformidad y no conformidad de cada parámetro evaluado, expresado como un porcentaje. También se incluye información como la fecha de vencimiento, número de notificación sanitaria y laboratorio fabricante. Sin embargo,

se observa que un 25% de las soluciones orales de propóleos no presentan el número de lote, contenido nominal e instrucciones de uso.

Se realizó una consulta en la base de datos del registro sanitario de la DIGESA, y se encontró que las muestras A, C y D están registradas, mientras que la muestra B no figura en dicha base de datos. Esto indica que el producto B no cumple con la característica de tener un registro sanitario obligatorio, lo que sugiere que se trata de un producto alterado que no cumple con las normas establecidas por la DIGESA.

De acuerdo con el Decreto Supremo N° 010-97 SA, que establece la normativa sobre el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos y Afines, los productos galénicos deben incluir en su etiqueta la siguiente información: nombre del producto, forma farmacéutica, vía de administración, usos, dosificación, precauciones, advertencias, contenido neto por envase, nombre y país del laboratorio fabricante, nombre del director técnico, número de registro sanitario, número de lote y fecha de caducidad.

Según los requisitos establecidos por USP-NF 40 (47), tanto para medicamentos como suplementos, es obligatorio que el rótulo incluya la fecha de caducidad. Es importante que esta fecha sea claramente visible y legible para los consumidores en el momento de la compra y el uso. La fecha de vencimiento debe ser presentada en un lugar destacado, con un contraste adecuado respecto al fondo de la etiqueta, o grabada en relieve de forma clara, de manera que resulte fácil de entender (47).

Según los resultados de la evaluación realizada por Segura y Mamani (55) sobre el etiquetado o rotulado del envase, se observa que el 92% de las características del NSO cumplen con los requisitos establecidos.

Según los resultados obtenidos por Quillahuamán (56) sobre el contenido nominal especificado en la etiqueta o rotulado, se determinó que el 100% de los productos cumplían con el contenido nominal declarado en la etiqueta, con una diferencia máxima de $\pm 5\%$.

Tabla 21: Evaluación del envase de las soluciones orales de propóleos

Evaluación del envase	Muestra			
	A	B	C	D
Integridad	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Hermeticidad	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación

Durante el análisis del envase, se pudo determinar que este se encuentra en conformidad, ya que no muestra ninguna alteración en su integridad. No se observaron quiebres, rajaduras ni manchas en el envase, lo que indica que se mantuvo íntegro y no sufrió ninguna alteración.

En cuanto a la hermeticidad del envase, se verificó que cumple con la característica de presentar una cinta de hermeticidad. Además, no se encontraron fugas ni derrames del contenido al abrir el envase. Se percibió una resistencia adecuada al abrirlo, lo cual indica un sellado correcto y la ausencia de fugas.

Tabla 22: Tabla de frecuencias donde se aprecia la cantidad de muestras que cumplen con parámetros en cuanto al envase

Parámetros	Conforme		No conforme	
	Cantidad de muestras	%	Cantidad de muestras	%
Integridad	4	100	0	0
Hermeticidad	3	75	1	25

Fuente: Elaboración propia

Análisis y discusión

En la tabla 22 se presentan los resultados de la evaluación de las características del envase o empaque primario de las muestras de las soluciones orales de propóleos. Se observa que todas las muestras analizadas cumplen al 100% con los criterios de conformidad establecidos.

En la evaluación de la integridad del envase, se constató que no se encontraron manchas, suciedad ni decoloración en los envases, lo que indica que cumplen con las normas de calidad exigidas para productos farmacéuticos.

En cuanto a la hermeticidad del envase, se verificó que todas las muestras presentaban un sellado correcto, sin evidencia de derrames o fugas del contenido. Al abrir y cerrar los envases en condiciones normales de uso, se constató que se cerraban completamente sin alteraciones en la tapa.

Es importante destacar que, de acuerdo con las normas de la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (Digemid), todos los productos deben contar con un sellado adecuado de los envases.

Según la norma USP-NF 40 sobre Envasado y Almacenamiento de extractos botánicos (46), estos deben ser almacenados en envases impermeables y resistentes a la luz. Asimismo, la misma farmacopea establece que los materiales de envasado no deben interactuar física o químicamente con el producto, de manera que comprometan los requisitos de calidad, pureza, seguridad, identidad y contenido.

En otro estudio realizado por Quillahuaman (56)., se evaluaron 11 muestras de geles de sábila (*Aloe barbadensis* Miller) y se encontró que todas las muestras cumplían con los criterios de conformidad del envase o empaque primario. La evaluación de la integridad del envase no mostró manchas, suciedad externa ni decoloración. En cuanto a la hermeticidad, todas las muestras alcanzaron el 100% de conformidad.

Conclusiones

1. Se determinó que las soluciones orales de propóleos presentan actividad antioxidante, siendo la muestra C (IC=2.6ug/mL) la que mostró mejor actividad antioxidante, pero aun así se encuentra por debajo del límite establecido por la norma mexicana sobre propóleos.
2. Se cuantificó polifenoles en todas las soluciones orales de propóleos, siendo aquellas con mayor a menor concentración de polifenoles, las muestras A=0.2281, D=0.1956, B=0.1310 y C=0.0940 respectivamente.
3. Se cuantificó flavonoides totales en todas las muestras de soluciones orales de propóleo, siendo aquellas con mayor a menor concentración de polifenoles, las muestras A=1.7626, D=0.5738, B=0.4006 y C=0.3913 respectivamente.
4. De los ensayos fisicoquímicos de: (i) densidad y pH, se determinó que los valores obtenidos concuerdan con normativas y trabajos previamente publicados, considerándose por este motivo resultados dentro de las especificaciones para este tipo de soluciones orales; (ii) en cuanto a los análisis organolépticos, si bien cada muestra tenía sus particularidades en cuanto a sabor, olor y color en forma individual, estos se encontraban dentro de los rangos que se podrían considerar adecuados y, (iii) respecto a la verificación en la calidad de los rótulos y envases revelan que un 25% de las soluciones orales de propóleo no cumplen con los estándares de etiquetado y registro sanitario establecidos por la DIGESA. Además, se identificó que la muestra B no cuenta con registro sanitario en la base de datos oficial. Mientras que, en cuanto a la calidad de los envases, todos presentaron conformidad con los parámetros evaluados.

5. Respecto a los ensayos de control de calidad microbiológico para recuento de: microorganismos aerobios mesófilos viables, hongos y levaduras; e identificación de *Salmonella* spp y *Escherichia coli*; todos los valores permanecieron dentro de los límites aceptables establecidos por normativa.

Recomendaciones

- Promover la realización de ensayos de comparación entre productos de propóleos envasados industrialmente y productos envasados artesanalmente en casas naturistas, con el objetivo de identificar la cantidad de polifenoles, flavonoides y evaluar la actividad antioxidante.
- Se sugiere realizar ensayos para evaluar la concentración del componente propóleo en distintas presentaciones de este producto.
- Se sugiere que los investigadores y estudiantes realicen ensayos para determinar y verificar su uso, teniendo en cuenta la cantidad de polifenoles, flavonoides y la acción antioxidante del propóleo en el sistema inmunológico.
- Se plantea comparar la eficacia de los productos que contienen únicamente propóleo con aquellos que incorporan otros ingredientes, con el objetivo de mejorar la salud de la población y garantizar una mejora en la calidad de vida.
- Se sugiere que antes de realizar la parte experimenta de la investigación dar mantenimiento a los equipos de laboratorio para que tengan un buen funcionamiento y además estas no se malogren durante su uso en los proyectos de investigación.
- Se sugiera capacitar a los estudiantes en el manejo de los equipos de laboratorio para que puedan tener un buen uso y funcionamiento durante su investigación.

Bibliografía

1. González Padrón A, Naranjo Domínguez AA, Díaz JJ, Llera Almenteros RE, González APAP, Domínguez AAN, Gallardo JJD, Almenteros REL. El propóleo una alternativa de todos los tiempos. Univ Médica Pinareña. 2012 Jan;8(1).
2. Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. Código Alimentario Argentino - Resolución Conjunta 94/2008 y 357/2008 [Internet]. Buenos Aires; 2008. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resolución-357-2008-140547/texto>
3. Mayta Tovalino F, Contreras SS, Ceccarelli Calle J, Alania Mallqui J, Mayta-Tovalino F, Contreras SS, Calle JC, Mallqui JA. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. Rev Estomatológica Hered. 2012 Jul;22(1):50.
4. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. Recursos naturales, medio ambiente y sostenibilidad. 70 años de pensamiento de la CEPAL. 2019.
5. DIGEMID. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. 1990.
6. Instituto Argentino de Normalización y Certificación. Norma argentina IRAM-INTA 15935-1/2. 2008.
7. Bueno Ramírez AZ. Calidad, perfil químico y actividad biológica de propóleos antioqueños. 2022.
8. Rodríguez Pérez B, Canales Martínez MM, Penieres Carrillo JG, Cruz Sánchez TA. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. Acta Univ. 2020 Jan 15;30:1–30.
9. Irigoiti Y, Navarro AS del R, Yamul DK. Actividad antioxidante y características espectroscópicas de extractos etanólicos de propóleos líquido y liofilizado. In: XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios; 2023.
10. Angarita Salamanca LX, Cobos Torres DM. Estudio Cromatográfico por HPLC-UV, Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Evaluación de la Capacidad Antioxidante en Miel de Abejas. Tesis en Licenciatura de Química

- Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2017.
11. Araujo Gutiérrez JD, Linares Ruiz DA. Cuantificación de flavonoides totales en extracto de propoleos (própolis) de la marca “Kaita” comercializado en la ciudad de Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo; 2015.
 12. Dueñas Zurita JA, Jimenez CDC. Control de calidad fisicoquímico-microbiológico y cuantificación de alcaloides oxindólicos totales en cápsulas y tabletas de uña de gato comercializados en el distrito del Cusco. 2015.
 13. Sanchez Valenzuela L, Atau Santa Cruz JC. Capacidad Antioxidante in vitro, Contenido en Polifenoles y Bioactividad del Extracto Etanòlico de Propòleos del Valle del Apurimac y de la Comunidad de Paccha-Anta-Cusco. 2008.
 14. Saiz Cayuela M, Serrano J. Propóleo: aplicaciones terapéuticas. Nat Medicat Rev médica para el Estud y difusión las Med Altern ISSN 0212-9078, Vol 21, Nº 2, 2003, págs 94-104. 2003;21(2):94–104.
 15. Hernandez SM. Características Organolépticas y Físico-Químicas de Propóleos de la Provincia de Ñuble, VIII Región-Chile. Arch Latinoam Nutr. 2005;
 16. ARQUILLUE CP. El propoleo de las abejas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2018 Aug; 7(87)..
 17. Agrotendencia. Conoce qué es el propóleo, para que sirve y sus beneficios [Internet]. ¿Qué es el propóleo? 2022 [cited 2023 Jun 10]. Disponible en: <https://agrotendencia.tv/agropedia/apicultura/propoleo-el-tesoro-de-las-abejas/>
 18. Salamanca Grosso G. Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. Ibagué : Sello Editorial Universidad del Tolima, 2017; 2017.
 19. Noriega Salomón V. El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. Universida. 2014.
 20. Quiñones M, M. M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr Hosp. 2012;27(1):76–89.
 21. Aprile C, Hernández M, Almeida Torres ME. Compuestos fenólicos alimentarios y su relación con biomarcadores de inflamación en personas con enfermedades cardiometabólicas. 2017.

22. Jiménez CIE, Martínez EYC, Fonseca JG. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev la Fac Med.* 2009;52(002).
23. Martínez Flórez S, González Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;271–8.
24. Trueba, Perez G, Trueba Gilberto P. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. 2003;22.
25. Herrera ML, Campos M. Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología. In 2005.
26. Creus EG. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Elsevier. JUNIO 2004; VOL 23 NÚM 6. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>
27. Pérez PS. ¿Qué es y cómo se utiliza la evaluación sensorial? Scielo - Mexico. 2019 septiembre–diciembre; Volumen 7 (número 19, (47-68))
28. Pineda-Caro DY, Medina-Vargas ÓJ, Falla-Rocha G. Enseñanza del concepto de pH desde la perspectiva del pensamiento científico: una revisión sistemática exploratoria. *Pensam y Acción.* 2020 Dec 13;(30):37–51.
29. Garzón M de L, James GA, Romero A. La comercialización de medicamentos naturistas en la Ciudad de México. *J Mex Chem Soc [Internet].* 1999 Jun 20;43(2):75–8. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47543107>
30. Bruneton J, Villar del Fresno A, Carretero Accame E, Rebuelta Lizabe M. *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales.* Editorial Acribia; 2001.
31. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger. Principios de Bioquímica.* Séptima. Omega; 2018. 1304 p.
32. Raimong Chang KAG. *Química.* 11th ed. Vázquez PER, editor. China: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.; 2013.
33. ROGER Y. STANIER , JOHN L. INGRAHAM , MARK L. WHEELIS , P. R. PAINTER. *Microbiología.* In edición s, editor. *Metodos de la Microbiología.* España: Editorial Reverté; 1992. p. 1020.
34. Surco-Laos F, Tipiana R, Torres Y, Valle M, Panay J. Efectos de liofilización sobre composición química y capacidad antioxidante en pulpa de cuatro variedades de *Mangifera indica*. *Rev la Soc Química del Perú.*

- 2017;83(4):412–9.
35. Londoño Londoño JA, Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In: Garcés Giraldo LF, editor. Biblioteca Digital Lasallista BIDILA. Corporación Universitaria Lasallista; 2012. p. 9–21.
 36. Estrada Reyes R, Ubaldo Suárez D, Araujo Escalona AG. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Lab Fitofarmacología, Dir Neurociencias, Inst Nac Psiquiatr Ramón la Fuente Muñiz. 2012;35(5):375–84.
 37. Caballero Hernandez YT. Manual de Análisis Químico e Instrumental. Técnicas de Análisis Físicoquímico. Tomo 2. Instituto Universitario de la Paz, editor. 2018.
 38. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española [Internet]. versión 23.6 en línea. 2022 [cited 2023 Jun 1]. Disponible en: <https://dle.rae.es>
 39. Alvarez J. características organolepticas de los alimentos ¿Qué son los criterios organolepticos ? los criterios o propiedades organolepticas de productos son todas. SENA Colombia, 2021.
 40. Secretaría de Salud - Estados Unidos Mexicanos. Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios. Diario Oficial de la Federacion. 2012 Nov.
 41. Ministerio de Salud. D.S.- N° 002-2021-SA Decreto Supremo que aprueba el Reglamento para el Registro Sanitario Condicional de Medicamentos y Productos Biológicos. 2021.
 42. Ministerio de Salud. Decreto Supremo N° 010-97-SA - Reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos y afines. 1997.
 43. Organización Panamericana de la Salud. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos - Guía de autoevaluación de BPL. 2010.
 44. Romero Aguirre LA, Luna Lazo RE. Control de calidad Físicoquímico-microbiológico y cuantificación de Bencilglicosinolatos en cápsulas, tabletas y polvo de maca comercializados en los establecimientos farmacéuticos del Distrito del Cusco. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico - Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2013.
 45. Sánchez Muños ML, Vallejos Vigo FK. Capacidad antioxidante in vitro del

- extracto etanólico de propóleos comercializado en las casas naturistas Kaita, Santa Natura y Honey Bee de la ciudad de Trujillo”. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico - Universidad Nacional de Trujillo; 2011.
46. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res.* 1998 Jan 24;37(2):99–105.
 47. USP-NF. United State Pharmacopeia (USP) - National Formulary (NF) 40. Ed. 40. USP-NF; 2017.
 48. Verdugo Torres MA, Tola Álvarez BE. Capacidad antioxidante y composición química de varios extractos de propóleos de la zona sur del Ecuador. Tesis para la obtención del grado de Magister en Ciencias y Tecnología Cosméticas - Universidad Politécnica Salesiana; 2017.
 49. Ruiz A, Martínez G, Marroquin A. Cuantificación de proteínas y polifenoles totales de propóleo comercial mexicano. In: *II Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina.* 2015.
 50. Aquino Colachagua WJ, Arroyo Cajacuri NR. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico de propóleos en bacterias gram positiva (*staphylococcus aureus*) y gram negativa (*salmonella typhi*) a diferentes concentraciones [Internet]. Universidad Nacional del Centro del Perú. Universidad Nacional del Centro del Perú; 2015 [cited 2023 Jun 27]. Disponible en: <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/1931>
 51. Ministerio de Salud. Resolución Ministerial 591-1998-MINSA - Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano -. 1998.
 52. Talero C, Hernández D, Figueroa J. Calidad microbiológica de propoleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *apis mellifera* en Colombia. *Rev la Fac Med Vet y Zootec.* 2012;59(II):109–18.
 53. Almira López Del Villar J, Ubillús Celi MM. Estandarización del propóleos del valle de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
 54. Alfaro Portal CA, Avendaño Jave P del R. Control de calidad del extracto etanólico de propóleos comercializado en las casas naturistas de la ciudad de trujillo. 2009.

55. Mamani Huaraya A, Segura Villegas LD. Control de la calidad fisicoquímico, microbiológico y determinación del factor de protección solar (SPF) de bloqueadores solares expendidos en los establecimientos farmacéuticos y centros comerciales del distrito de Wanchaq Cusco - 2015. Tesis para optar al título profesional de químico farmacéutico - Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2016.
56. Quillahuaman Gutierrez Y. Control de calidad y cuantificación de antraquinonas en geles de Sábila (*Aloe barbadensis* Miller) expendidos en establecimientos farmacéuticos y centros naturistas del distrito de Cusco. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2018.

Anexos

Anexo 1: Registro de tiendas naturistas del distrito del Cusco

N°	NOMBRE DE LA CASA O CENTRO NATURISTA	DIRECCIÓN	DISTRITO
01	Casa naturista Mi salud	Tres cruces de oro N°233	Cusco
02	Natural products "Vida Nueva"	Av. Sol N° 761	Cusco
03	Consortios carmelitas	Tres cruces de oro N° 360	Cusco
04	Consortios carmelitas	Ayacucho N° 248	Cusco
05	Consortios carmelitas	Tres cruces de oro N° 383	Cusco
06	Carmelita's	Av. Sol N° 345	Cusco
07	Carmelita's	Calle cruz verde N° 129 – int. 110	Cusco
08	Productos naturales kaíta	Centro comercial Sol Plaza tienda N° 113 Av. Sol N° 948	Cusco
09	Centro bionaturista Salud y Vida	Calle tecte s/n	Cusco
10	Natura Qosqo	Calle Saphi N° 726	Cusco
11	El panal	Tres cruces de oro N° 368	Cusco
12	Cusco natura	Tres cruces de oro s/n	Cusco
13	Matrix máxima nutrición	Tres cruces de oro N° 354	Cusco
14	Multiservicios "SIBEL"	Tres cruces de oro s/n	Cusco
15	Centro naturista "Sandro"	Calle monjaspata N° 743	Cusco
16	Medicina andina "Apu Sacsayhuaman"	Calle monjaspata N° 700 - C	Cusco
17	Inka Hampi	Tres cruces de oro s/n	Cusco
18	FILADELFIA	Tres cruces de oro N° 310	Cusco
19	Centro de medicina natural	Av. Sol N° 789 - A	Cusco

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2: Formato de encuesta realizada a establecimientos farmacéuticos del distrito del Cusco

CONTROL DE CALIDAD DE SOLUCIONES ORALES DE PROPÓLEO

Encuesta para determinar los productos más comercializados de soluciones orales de mayor comercialización en el distrito del Cusco

Nombre del Establecimiento:

Dirección:

1 ¿Cuáles son las presentaciones de los productos de propóleos que usted expende?

.....

2 ¿Cuántos productos de soluciones orales de propoleos son expendidos en su establecimiento?

.....

.....

3 ¿Cuál es de los productos de soluciones orales de propóleos tiene mayor demanda comercial?

.....

.....

4 ¿Qué usos tiene el propóleos?

.....

¡MUCHAS GRACIAS!

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3: Formato de reporte de resultados de control organoléptico de soluciones orales de propóleos

Nombre del producto: N° de muestra:

Laboratorio fabricante:

Fecha de vencimiento: Fecha de análisis:

CARACTERÍSTICA	CONFORME	NO CONFORME
ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO		
Color		
Olor		
Sabor		
EVALUACIÓN DE LA ETIQUETA O ROTULO		
Nombre del producto		
Contenido nominal (volumen)		
Número de lote		
Fecha de vencimiento		
Laboratorio fabricante		
Número de NSO		
Ingredientes		
Instrucciones de uso		
EVALUACIÓN DEL ENVASE O EMPAQUE		
Integridad del envase inmediato		
Integridad del envase mediato		
Hermeticidad del envase		

OBSERVACIONES:

.....

CONCLUSIÓN: CONFORME NO CONFORME

Firma del responsable

Fuente: *Elaboración Propia*

Anexo 4: Formato de reporte de resultados de la cuantificación de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante de las soluciones orales de propóleo

Nombre del producto: N° de muestra:

Laboratorio fabricante:

Fecha de vencimiento: Fecha de análisis:

ENSAYO	ESPECIFICACION	RESULTADO
CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES	Expresados como equivalentes de ácido gálico Mínimo 0.25 %	
CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	Expresados como equivalentes de quercetina. Mínimo 0.25 %	
CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	Mínimo 100 microgramos/mililitro	

OBSERVACIONES:

.....

CONCLUSIÓN:

CONFORME NO CONFORME

.....

Firma del responsable

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 5: Formato de reporte de resultados de la evaluación microbiológica de las soluciones orales de propóleos

Nombre del producto: N° de muestra:

Laboratorio fabricante:

Fecha de vencimiento: Fecha de análisis:

PARÁMETROS	LIMITE DE ACEPTACIÓN (UFC)	RESULTADO	CONFORME	NO CONFORME
PRUEBAS DE RECUESTO MICROBIANO				
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	Máximo UFC/g			
Recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras	Máximo UFC/g			
PRUEBAS DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS				
Recuento total de coliformes fecales (E. coli)	Ausente			
Recuento total de salmonella	Ausente			

OBSERVACIONES:

.....

CONCLUSIÓN: CONFORME NO CONFORME

.....
Firma del responsable

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 6: Formato de la relación de muestras de soluciones orales de propóleos por orden de adquisición

N°	NOMBRE DEL PRODUCTO	LABORATORIO	FORMA FARMACÉUTICA	CANTIDAD
M1	Licor de propóleo	APICOSAS	Solución oral	15
M2	Tintura de propóleo	FARMAGEL	Solución oral	15
M3	Tintura de propóleo	MAX	Solución oral	15
M4	Macerado de propóleo	JALK	Solución oral	15

Fuente: Encuesta realizada

Anexo 7: Norma IRAM 15935-1-Propóleos bruto

PROPÓLEO BRUTO o CRUDO

Pérdida por calentamiento (100-105 °C):	Máximo 10%
Cenizas (500-550°C):	Máximo 5%
Cuerpos extraños:	Máximo 25%
Sustancias extraíbles en n-hexano (ceras)	Máximo 40%
Índice de oxidación:	Máximo 22 seg.
Compuestos Fenólicos. expresados como ácido gálico	Mínimo 0.5%
Flavonoides:	Mínimo 0,5%
Resinas solubles en etanol:	Mínimo 30%
Espectrograma UV-VIS:	Debe presentar un máximo de absorción entre 270 y 315 nm
Plomo [Pb]:	Máximo 2,0 mg/kg
Arsénico [As]:	Máximo 1,0 mg/kg
Residuos de plaguicidas y antibióticos:	Ausencia

Características organolépticas

Aroma: Característico de este producto: resinoso o balsámico. según su origen botánico y/o geográfico.

Color: Amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y sus tonalidades, variando conforme o su origen botánico y/o geográfico.

Sabor: Variable, de suave y balsámico o fuerte y picante, según su origen botánico y/o geográfico. Consistencia o temperatura ambiente: Maleable o rígido, según su origen botánico y/o geográfico.

Aspecto: Homogéneo o heterogéneo, de preferencia en trozos no comprimidos.

EXTRACTO BLANDO DE PROPÓLEOS - 45, 60 y 90% MIN

Norma IRAM 15935-2- EXTRACTO DE PROPÓLEOS.

Se entiende por "Extracto Blando de Propóleos" el producto semielaborado, que se obtiene procesando el propóleos en bruto con alcohol etílico de calidad definida en el artículo 1109 del presente Código, de manera de extraer los componentes biológicamente activos, filtrando las impurezas y las ceras. El alcohol debe evaporarse trabajando a temperatura controlada, de manera de no afectar los compuestos bioactivos, a fin de obtener una sustancia purificada de consistencia pastosa. Para la producción deben aplicarse las Buenas Prácticas Apícolas.

El extracto de propóleos debe ser embalado en envases de material bromatológicamente apto, almacenados en un sitio oscuro y fresco. El envase debe

ser tal que le confiera al producto una protección adecuada respecto de la humedad, la luz y la temperatura excesiva.

Extracto seco (materia seca):	Mínimo 10%
Sustancias extraíbles en n-hexano [ceras):	-
Índice de oxidación:	Máximo 22 seg.
Compuestos fenólicos, expresados como ácido gálico:	Mínimo 0,25%
Flavonoides:	Mínimo 0,25%
Espectrograma UV-VIS:	Debe presentar un máximo de absorción entre 270 y 315 nm.
Plomo, expresado como Pb (sobre sustancia seca):	Máximo 0,2 mg/kg
Arsénico, expresado como As (sobre sustancia seca):	Máximo 0,2 mg/kg
Residuos de plaguicidas y antibióticos:	Máximo 0,2 mg/kg

Criterios microbiológicos

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos /g:	n=5
Salmonella spp – E. coli spp /25 g:	n = 10
Hongos y levaduras UFC/g:	n=5

Características organolépticas:

Aroma: Característico de este producto: resinoso o balsámico, según su origen botánico y/o geográfico.

Color: Variable, según su origen botánico y/o geográfico y su concentración.

Sabor: Variable, de suave o fuerte, amargo y picante.

Anexo 8: Norma mexicana NOM-003-SAG/GAN - 2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento

NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos. - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

JUAN JOSÉ LINARES MARTÍNEZ, Director General de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación con fundamento en los Artículos 35 fracción IV y XXII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 38 fracciones II y IX, 40 último párrafo, 41, 43, 44, 45, 46, 47 fracción IV, 52, 62, 63, 64, 73 y 74 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1, 2 inciso B fracción XVII, 17 fracciones I, XII y XXIII, 28 y 29 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, he tenido a bien expedir la presente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SAG/GAN-2017, PROPÓLEOS, PRODUCCIÓN Y ESPECIFICACIONES PARA SU PROCESAMIENTO

ÍNDICE

- 0. Introducción
- 1. Objetivo y campo de aplicación
- 2. Referencias
- 3. Definiciones
- 4. Consideraciones generales
- 5. Especificaciones físicas, químicas y antimicrobianas
- 6. Métodos de prueba
- 7. Evaluación de la conformidad
- 8. Sanciones
- 9. Concordancia con normas y lineamientos internacionales
- 10. Bibliografía
- 11. Disposiciones transitorias
- 0. Introducción**

0.1 El avance en el conocimiento y usos medicinales de propóleos a nivel nacional e internacional, ha generado un incremento en su consumo y como consiguiente una mayor demanda por la sociedad.

0.2. Es importante que en México se fomente la producción de propóleos mediante sistemas de producción que permitan una recolección, y procesamiento de manera estandarizada para garantizar que su composición química no se altere en perjuicio de sus propiedades.

0.3. La regulación de los propóleos que garanticen las características físicas, químicas y antimicrobianas, beneficiará económicamente al sector apícola ya que fomentará su competitividad en el mercado nacional e internacional.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer las especificaciones de producción, características físicas, químicas y antimicrobianas, que deben cumplir los propóleos y sus extractos para su procesamiento y comercialización en el país.

1.2 Esta Norma es aplicable a las unidades económicas pecuarias dedicadas a la producción, importación, acondicionamiento y almacenamiento con fines de distribución y comercialización de propóleos y sus extractos en el territorio nacional.

1.3 Previo a la comercialización al interior del país, cada lote de propóleos importado, deberá ser analizado bajo las especificaciones establecidas en la presente norma, demostrado con los resultados de laboratorio oficial, laboratorios aprobados o autorizados por la Secretaría o laboratorios acreditados y aprobados en los términos de lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

1.4 La aplicación de las disposiciones contenidas en esta Norma compete a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través de la Coordinación General de Ganadería, así como a las Delegaciones de la SAGARPA y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

2. Referencias

Para la correcta aplicación y complementación de esta Norma deben consultarse las siguientes:

2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCOFI-1993, Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993.

2.2 Norma Oficial Mexicana NOM-030-SCFI-1993, Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de octubre de 1993.

2.3 Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI-1994, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas pre envasados, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de enero de 1996.

3. Definiciones

Para efectos de esta Norma, se entiende por:

3.1 Acondicionamiento: Todas las operaciones necesarias para envasar, empacar y etiquetar el producto, hasta llegar a la presentación final para su conservación, almacenamiento y distribución.

3.2 Compuestos fenólicos: Son compuestos aromáticos, que, junto a los flavonoides, le confieren a los propóleos sus usos y aplicaciones biológicas; los principales compuestos fenólicos de los propóleos son: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido benzoico, ésteres de ácido caféico, como el CAPE (feniletil éster del ácido caféico, por sus siglas en inglés), entre otros.

3.3 Constatación: Procedimiento mediante el cual la Secretaría verifica que el producto cumple con las especificaciones de composición establecidas en la presente norma.

3.4 Flavonoides: Compuestos orgánicos hidroxilados derivados de la 2-fenilbenzopiran-4-ona (también llamada 2-fenil-4H-cromen-4-ona), y sistemas reducidos en C2-C3 y/o C4 provenientes de exudados vegetales con múltiples aplicaciones.

3.5 Impurezas: Elementos ajenos a los propóleos, que han sido incorporados durante el proceso de recolección por las abejas y manipulación de éste (resto de insectos, madera, papel, basura, entre otros).

3.6 Materia prima: Ingrediente de cualquier origen utilizado en la elaboración de productos terminados.

3.7 Métodos promotores de cortinas de propóleos: Son todos aquellos que crean espacios entre las cámaras de cría, alzas, tapas internas de la colmena y/o en las paredes de las mismas, dichos espacios pueden ser de dos centímetros o menos y sirven para promover la acumulación de propóleos en forma de cortina para bloquear la entrada de aire o intrusos a la colmena. Entre estos métodos se encuentran los brasileños (CPI, pirassununga, bastidores, cuadros móviles, entre otros) y el Campechano de origen mexicano.

3.8 Mallas y Rejillas plásticas: Son dispositivos plásticos que presentan orificios de diferentes tamaños. Las mallas y rejillas plásticas son dispositivos plásticos que presentan orificios de diferentes tamaños que pueden ir desde los tejidos, como las mallas mosquiteros que presentan hilos de un grosor de 0.5 mm y orificios de aproximadamente 1.0 por 1.0 mm de luz, y las matrizadas (que se forma por medio del prensado en un molde caliente), que son de una sola pieza y pueden presentar orificios desde 1.0 por 1.0 mm de luz y un grosor de 1.0 mm; hasta las de 2.0 por 2.0 mm de luz y un grosor de 2.0 mm, y las tipo rejilla con orificios de 2.0 mm por 5.0 cm de largo y un grosor de 2.0 mm, estas mallas y rejillas presentan una forma trapezoidal isósceles.

3.9 Propóleos en greña o en bruto: Son los propóleos obtenidos directamente de la colmena, sin ningún tipo de tratamiento.

3.10 Propóleo o propóleos: Nombre genérico que se da a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante.

3.11 Secretaría: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

4. Consideraciones generales

4.1 Producción de propóleos.

La producción de los propóleos se debe realizar por medio del uso de rejillas, mallas plásticas o métodos promotores de cortinas de propóleos en las colmenas específicas para su cosecha.

4.2 Recolección de propóleos.

La recolección debe realizarse con materiales libres de residuos de algunas sustancias que puedan contaminarlo. Durante la cosecha, no debe exponerse a los rayos del sol, evitar su almacenamiento cerca de fuentes de calor y no debe mezclarse con la cera que se encuentra en tapas o sobre los bastidores. Los propóleos en bruto contenido en las trampas, se debe introducir a un congelador entre -10°C y -20°C, por lo menos una hora para que la resina se torne rígida y quebradiza y que facilite su obtención. En todos los casos se debe evitar la manipulación directa y la formación de conglomerados.

5. Especificaciones físicas, químicas y actividad antimicrobiana

5.1 Especificaciones físicas.

Parámetros	Características
Color	Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, variando conforme a su origen botánico.
Aroma	Resinoso (olor a madera) o balsámico (olor a cera), o balsámico, dependiendo de su origen botánico
Sabor	Variable, de suave balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.
Consistencia	A temperatura ambiente maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico.

5.2 Especificaciones químicas.

Determinación cualitativa	Parámetros
Flavonoides	Presencia
Fenoles totales	Presencia
Índice de oxidación	Máximo 22 segundos

Determinación cuantitativa	Parámetros
Compuestos fenólicos	Expresados como equivalentes de ácido gálico: mínimo 5% (peso/peso)
Flavonoides	Expresados como equivalentes de quercetina: mínimo 0.5% (peso/peso)
Actividad antioxidante (CA50)	Mínimo 100 microgramos/mililitro

5.3 Actividad antimicrobiana.

A todas las muestras deberán de realizarse análisis sobre la actividad antimicrobiana frente a los siguientes microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC), *Escherichia coli* (ATCC) y *Candida albicans* (ATCC), por ser algunos de los de mayor incidencia en la salud pública.

El laboratorio oficial, aprobado o autorizado, deberá emitir el resultado de la actividad antimicrobiana indicando el número de la cepa de referencia ATCC utilizada en el análisis.

6. Métodos de prueba

6.1 Acondicionamiento de la muestra.

Los propóleos en bruto o en greña deben acondicionarse eliminando las impurezas visibles tales como virutas de madera, restos de abejas, restos de pinturas, restos vegetales, entre otros. Posteriormente, debe ser refrigerada o congelada para favorecer su maceración. Debe conservarse en refrigeración y protegida de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

6.2 Para las especificaciones físicas.

6.2.1 Determinación del color: Colocar la muestra sobre una superficie blanca y comparar con una escala de colores; debe realizarse en un ambiente con buena iluminación. Se puede utilizar un microscopio estereoscópico para visualizar definitivamente los colores presentes utilizando el Catálogo Internacional de Colores.

6.2.2 Determinación del aroma: Retirar una porción de la muestra a fin de que el envase no interfiera en la percepción olfativa.

6.2.3 Determinación del sabor: Colocar una porción de la muestra en la parte media de la lengua y analizar mediante la comparación de sus atributos de sabor con los que mejor lo distinguen.

6.2.4 Consistencia a temperatura ambiente: Retirar una porción de la muestra y colocarla en un vidrio de reloj, hasta que alcance la temperatura ambiente. Determinar la consistencia tocándola con los dedos y comparar con el atributo que mejor la describa. Suave y maleable a temperaturas entre 20 y 40°C y rígido a temperaturas inferiores a 20°C.

6.3 Para las Especificaciones químicas.

6.3.1 Preparación del Extracto Etanólico de Propóleos (EEP).

Pesar una cantidad de 50 gramos de los propóleos en bruto, previamente acondicionada, añadir etanol al 70% en propóleo: disolvente 1:3 y dejar macerar por un período de 72 horas con agitación constante o extraer con baño ultrasónico por 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo filtrar y el filtrado se concentra (utilizando preferentemente un Rotovapor o a vacío), pasar el extracto a un envase ámbar, empleando la mínima cantidad de etanol al 70%, y dejar a sequedad utilizando una bomba de vacío. Debe conservarse en refrigeración y protegida de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

6.3.2 Prueba cualitativa de flavonoides.

Para la detección de flavonoides se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) al 20%. Un color amarillo intenso es característico de los flavonoides.

6.3.2.1 Preparación de reactivos.

Hidróxido de sodio (NaOH) al 20%. Pesar 10 gramos y disolver en 25 mililitros de agua destilada. Agitar después de enfriar y aforar a 50 mililitros.

6.3.2.2 Procedimiento.

a) Pesar 200 miligramos de los propóleos en bruto o EEP y añadir 1 mililitro de etanol al 70% y mezclar perfectamente.

b) Añadir una gota de NaOH al 20% y observar un cambio de coloración que va del amarillo a naranja de acuerdo a la cantidad de flavonoides presentes.

6.3.3 Prueba cualitativa de fenoles totales.

La mayor parte de los fenoles dan disoluciones coloreadas (azul, verde, violeta, entre otros). Si el color es amarillo débil (mismo que el reactivo), la reacción se considera negativa. Algunos fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinona. Los ácidos, a excepción de los fenólicos, no dan la reacción aunque algunos dan disoluciones o precipitados de color amarillento.

6.3.3.1 Preparación de reactivos.

Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) al 10%: Pesar 1 gramo y disolver en 10 mililitros de agua destilada caliente, posteriormente aforar a 100 mililitros.

Etanol al 70%: Medir 72.9 mililitros de alcohol etílico al 96% y aforar a 100 mililitros con agua destilada.

6.3.3.2 Procedimiento.

a) Colocar 200 miligramos de los propóleos en bruto o EEP en un vaso de precipitados de 10 mililitros y añadir 1 mililitro de etanol al 70%.

b) Mezclar y agregar una gota de la solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 1% y observar el desarrollo de color.

c) En caso de la presencia de fenoles, se observará un precipitado y una coloración azul, verde, rojo, morado o negro.

6.3.4 Índice de oxidación.

El índice de oxidación es influenciado por el contenido de compuestos fenólicos. Esto indica que a mayor concentración de fenoles totales, el tiempo de la reacción es más rápido (poder antioxidante de los propóleos, sobre la solución de permanganato de potasio).

6.3.4.1 Preparación de reactivos.

Permanganato de potasio (KMnO_4) 0.1 N.

a) Pesar en vidrio de reloj, 3.2 g de KMnO_4 sólido, pasar a un matraz Erlenmeyer de 1000 mL y adicionar 250 mL de agua destilada.

b) Tapar con un vidrio de reloj, calentar y agitar la solución hasta la disolución completa del sólido.

c) Agregar 250 mL de agua destilada y calentar hasta ebullición durante 15 min y mantener la solución caliente durante 1 h, sin ebullición.

d) Dejar enfriar la solución hasta temperatura ambiente durante 12 h y posteriormente filtrar por lana de vidrio o crisol de porcelana, no con papel, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 1000 mL, lavando el matraz Erlenmeyer empleado anteriormente y el material en el filtro, con la menor cantidad de agua destilada posible y aforar a 1000 mL.

e) Finalmente, el líquido filtrado se pasa a un frasco ámbar (bien limpio y exento de materia orgánica).

f) En caso de presentar precipitado, es necesario filtrar antes de su uso.

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 20%. Colocar 30 mL de agua destilada en un matraz aforado de 100 mL colocado en un baño de hielo, agregar lentamente 21 mL de ácido sulfúrico concentrado al 96% y aforar con agua destilada. Precaución: la reacción libera calor. Precaución: la reacción libera calor.

6.3.4.2 Procedimiento.

a) Pesar 20 miligramos de los propóleos en bruto o EEP y añadir 5 mililitros de etanol al 70%.

b) Añadir 95 mililitros de agua destilada, agitar hasta homogeneizar la mezcla y filtrar a gravedad.

c) Tomar 10 mililitros de esta solución y aforar a 100 mililitros con agua destilada.

d) Tomar 2 mililitros de la solución diluida y añadir 1 mililitro de H_2SO_4 al 20% y agitar un minuto.

e) Añadir una gota de KMnO_4 0.1 N, sin tocar las paredes.

f) Cronometrar y registrar el tiempo en que tarda en desaparecer el color rosa del KMnO_4 .

6.3.5 Compuestos fenólicos: método de Folin-Ciocalteu.

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (mezcla de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico hexavalente).

6.3.5.1 Preparación de reactivos.

Solución estándar de ácido gálico (0.2 mg/mL): Disolver 20 miligramos de ácido gálico y aforar a 100 mililitros con agua destilada. Mantener en refrigeración y protegido de la luz.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%: Disolver 20 gramos de carbonato de sodio anhidro en 70 mililitros de agua caliente. Dejar enfriar y aforar a 100 mililitros con agua destilada.

6.3.5.2 Procedimiento.

Trazado de la curva de calibración.

a) A partir de la solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL).

b) A cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mililitro.

6.3.5.3 Preparación de las muestras.

Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleos disueltos en etanol al 70%. Tomar una alícuota de 250 microlitros de ésta y agregar 750 microlitros de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

Al tener los sistemas preparados se procede de la siguiente manera:

a) Tomar 1 mililitro de cada concentración y añadir 6 mililitros de agua destilada.

b) Adicionar 500 microlitros de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos.

c) Adicionar 1.5 mililitros de la solución de Na₂CO₃ y aforar con agua destilada hasta un volumen de 10 mililitros, se observará un cambio de color a azul.

d) Esperar 2 horas a temperatura ambiente, para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS.

e) Graficar la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico.

f) Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico/g de extracto o en porcentaje (%).

6.3.6 Cuantificación de flavonoides.

El principio básico del método colorimétrico de cloruro aluminio, es que éste forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides.

6.3.6.1 Preparación de reactivos.

Solución estándar de quercetina (1 mg/mL). Pesar 10 miligramos de quercetina dihidratada y aforar a 10 mililitros de metanol grado reactivo. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.

Tricloruro de aluminio, AlCl₃ (2%): Disolver 2 gramos de cloruro de aluminio en agua destilada y aforar a 100 mililitros con agua destilada con mucho cuidado ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico.

6.3.6.2 Preparación de la muestra.

Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleos disueltos en etanol al 70%. Tomar una alícuota de 250 microlitros de ésta y agregar 750 microlitros de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

6.3.6.3 Procedimiento

6.3.6.3.1 Preparación de la curva de calibración:

A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener concentraciones seriadas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 µg/mL (ppm).

6.3.6.3.2 Preparación del blanco de muestra.

Tomar 1 mililitro de la solución del EEP (0.05 mg/mL) y agregar 1 mililitro de metanol grado reactivo.

Al tener todos los sistemas anteriores preparados, se procede de la siguiente manera:

a) Adicionar a cada tubo, 1 mililitro de la solución de AlCl₃, esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-VIS.

b) Graficar la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina.

c) El contenido total de flavonoides se expresa como mg de equivalentes de quercetina (QE)/g de extracto o en porcentaje (%).

6.3.7 Actividad antioxidante: Método del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•).

La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un

antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del EEP de prueba para atrapar radicales.

6.3.7.1 Preparación de reactivos.

Solución estándar de quercetina (1 mg/mL). Pesar 10 miligramos de quercetina y aforar a 10 mililitros con metanol grado reactivo. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.

Solución de DPPH• (100 µM). Pesar 2 miligramos, disolver y aforar a 50 mililitros con metanol grado reactivo. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.

6.3.7.2 Preparación de la muestra.

Pesar 10 miligramos del EEP y disolver en metanol grado reactivo, aforar a 10 mililitros.

Las concentraciones a preparar y a evaluar son en un rango de 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 250 µg/mL.

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

- a) Colocar en tubos de ensaye, 250 microlitros de la muestra y 750 microlitros de solución de DPPH•.
- b) Proteger de la luz y dejar reposar 30 minutos.
- c) Determinar la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS.
- d) Como control negativo se utiliza metanol y control positivo se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

e) Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{\text{Absorbancia del DPPH}\bullet - [\text{Absorbancia de la mezcla (DPPH}\bullet + \text{ compuesto problema)}]}{\text{Absorbancia del DPPH}\bullet} \times 100$$

6.4 Para la actividad antimicrobiana.

6.4.1 Método de difusión en agar.

Esta es una prueba cualitativa que únicamente reflejará si la muestra a evaluar inhibe el crecimiento microbiano. Se evalúa la actividad antimicrobiana del extracto de los propóleos, el cual se coloca en sensidiscos y difundirá sobre la placa de agar; si hay inhibición del crecimiento del microorganismo a evaluar se observará un halo alrededor del sensidisco.

6.4.1.1 Preparación de reactivos.

Estándar No. 0.5 de MacFarland: añadir 500 microlitros de sulfato de bario (BaSO₄) y aforar a 100 mililitros de H₂SO₄ al 0.36 N.

6.4.1.2 Microorganismos de referencia.

a) Bacterias:

Staphylococcus aureus: ATCC.

Escherichia coli: ATCC.

b) Levadura:

Candida albicans: ATCC.

6.4.1.3. Medio de cultivo.

Para conservación y preparación del inóculo:

Para bacterias: Caldo Müeller-Hinton (MH).

Para levadura: Caldo Dextrosa Sabouraud (SDA).

Se prepara de acuerdo a especificaciones del proveedor.

Para el método de difusión en agar

Para bacterias y levadura: Agar Müeller-Hinton (MH) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno.

Se prepara de acuerdo a especificaciones del proveedor.

6.4.1.4 Preparación de la muestra.

Pesar 160 miligramos del EEP y disolver en 100 microlitros de etanol al 70%.

6.4.1.5 Preparación de la suspensión de microorganismos.

a) Tomar una asada de las colonias sembradas del microorganismo a evaluar y sumergirla en 5 mililitros de caldo Müeller-Hinton para bacterias o caldo Sabouraud para levaduras.

- b) Enjuagar bien en el líquido para descargar todo el material y retirar el asa.
- c) El tubo de cultivo se incuba a 37°C/ 24 horas para bacterias y para levaduras por 35°C/48 horas.
- d) Ajustar la densidad del inóculo de acuerdo al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland (aproximadamente 1-5 x10⁶ células/mL)
- e) La comparación de la turbidez se realiza a 625 nm en el espectrofotómetro y la absorbancia debe de ser entre 0.08 – 0.10.

6.4.1.6 Preparación de sensidiscos.

Se emplearán discos de papel Whatman No. 5, de 5 mm de diámetro (previamente esterilizados). Los discos se impregnarán con 10 microlitros de la solución de EEP (160 mg/100 µL) para que tengan una concentración de 16 miligramos de EEP y se dejarán secar a temperatura ambiente por 24 horas.

6.4.1.7 Procedimiento.

- a) A partir del inóculo con una concentración de 1-5 x 10⁶ UFC/ mL, realizar con un hisopo estéril un sembrado masivo sobre las placas de agar MH para bacterias y levaduras.
- b) Con ayuda de una aguja estéril, colocar los sensidiscos impregnados de la muestra de los propóleos procurando dejarlo en el centro de la caja.
- c) Permitir que el sensidisco se adhiera a la placa de agar, teniendo la precaución de evitar desplazamientos del disco. En caso de que se evalúen más de una muestra de EEP en la misma caja, se recomienda dejar al menos 1.5 cm de distancia entre cada sensidisco y el borde de la caja.
- d) Incubar a 37°C / 24 horas para las bacterias y 35°C / 48 horas para la levadura.
- e) Como control negativo se emplearán discos impregnados con 10 microlitros de etanol al 70%.
- f) Como control positivo se emplearán discos de antibióticos y antifúngicos conocido de marca comercial.

6.4.1.8 Resultados.

Después del tiempo de incubación, con una regla calibrada de milímetros o de preferencia con un Vernier, medir el diámetro de los halos de inhibición y se repetirá la medición a las 48 horas para la levadura.

6.4.1.9 Interpretación.

La presencia de un halo de inhibición indica actividad antimicrobiana y se reportará el diámetro de los halos de inhibición (en mm). La ausencia de halo de inhibición indicará que no existe actividad antimicrobiana.

7.1 Evaluación de la conformidad.

La evaluación de la conformidad de los productos objeto de la presente Norma Oficial Mexicana, se llevará a cabo en laboratorios oficiales, laboratorios aprobados o autorizados por la Secretaría y en laboratorios acreditados y aprobados en los términos de lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

7.2 Los resultados emitidos por los laboratorios serán válidos para los propóleos de los productores solicitantes que provengan de un mismo lote y lugar de recolección y la vigencia de los resultados será de un año.

8. Sanciones

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en la presente Norma, será sancionado conforme a lo establecido en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

9. Concordancia con normas y lineamientos internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional al momento de su elaboración.

10. Bibliografía

10.1 Catálogo Internacional de Colores <http://catalog.weidmueller.com>.

10.2 Diario Oficial da República Federativa do Brasil. (2001). Ministerio de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa No. 3, de 19 de janeiro da 2001. Seção1, p. 18-23. Recuperado el 23 de junio de 2011 de www.extranet.agricultura.com.br

10.3 Norma Argentina, Instituto Argentino de Normalización (2008). Normas IRAM-INTA 15935-1, Parte 1: Propóleos en bruto.

10.4 Norma Argentina, Instituto Argentino de Normalización (2008). Normas IRAM-INTA 15935-2, Parte 2. Extractos de propóleos.

10.5 Norma Ramal Cubana (1994). Propóleos Materia Prima. Especificaciones. Apicultura NRAG-1135-94. Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba.

10.6 Norma Ramal Cubana (1994). Extracto fluido y extracto blando, NRAG 1129 Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba.

10.7 Norma Rusa (1977). Propóleos. Métodos analíticos para el control de su calidad.

10.8 Norma Ramal Rusa RST-RSFSR-317-77. Diario Oficial de San Salvador. (2003).

10.9 Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 65.19.02.03: Calidad de propóleo crudo. Recuperada el 15 de enero de 2013 de <http://faolex.fao.org>

10.10 González Guerra, A. (1997). Propóleos: un camino hacia la salud. La Habana, Cuba: Pablo de la Torriente.

10.11 Rodríguez Pérez, B. (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

10.12 Bankova, Vassia, *et al.*, (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, Journal of Apicultural Research, DOI: 10.1080/00218839.2016.1222661.

11. Disposiciones transitorias

Artículo único. La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor a los 180 días siguientes al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Ciudad de México, a 31 de agosto de 2017.- El Director General de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Juan José Linares Martínez**.- Rúbrica.

Anexo 9: Norma Sanitaria que establece criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano

(PROYECTO DE ACTUALIZACIÓN DE LA RM N° 615-2003 SA/DM)

NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO

CAPÍTULO I GENERALIDADES

Artículo 1°.- Finalidad

La presente norma se establece para garantizar la seguridad sanitaria de los alimentos y bebidas destinados al consumo humano.

Artículo 2°.- Objetivo

Establecer las condiciones microbiológicas de calidad sanitaria e inocuidad que deben cumplir los alimentos y bebidas en estado natural, elaborados o procesados, para ser considerados aptos para el consumo humano.

Artículo 3°.- Ámbito de aplicación

La presente Norma Sanitaria es de obligatorio cumplimiento en todo el territorio nacional, para efectos de:

- 1) La obtención del Registro Sanitario de Alimentos y Bebidas.
- 2) La obtención del Certificado Sanitario Oficial de Exportación.
- 3) La vigilancia y control sanitario que realiza la Autoridad Sanitaria.
- 4) La verificación o comprobación de la eficacia del Plan HACCP.
- 5) Control analítico de cada lote de producto antes de ser liberado para su comercialización, para el caso de las fábricas que aún no implementan el Sistema HACCP.
- 6) Aclarar dirimencias, inmovilizaciones, denuncias, operativos

Artículo 4°.- Base legal y técnica

La presente norma sanitaria se establece en el marco del Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, aprobado por Decreto Supremo N° 007.98 SA y en concordancia técnico normativa con los Principios para el establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos del Codex Alimentarius (CAC/GL-21(1997) y con la clasificación y planes de muestreo de la International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF)

CAPÍTULO II DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 5°.- Conformación de los criterios microbiológicos

Los criterios microbiológicos están conformados por:

- a) El grupo de alimento al que se aplica el criterio.
- b) Los agentes microbiológicos a controlar en los distintos grupos de alimentos.
- c) El plan de muestreo que ha de aplicarse al lote o lotes de alimentos.
- d) Los límites microbiológicos establecidos para los grupos de alimentos.

Artículo 6°.- Aptitud microbiológica para el consumo humano

CAPITULO III DE LOS MICROORGANISMOS Y METODOS DE ANALISIS

Artículo 11º.- Grupos de microorganismos

Como referencia para los criterios microbiológicos, en general los microorganismos se agrupan como:

1. - Microorganismos indicadores de alteración: las categorías 1, 2, 3 definen los microorganismos asociados con la vida útil y alteración del producto tales como microorganismos aeróbicos mesófilos, aeróbicos mesófilos esporulados, Mohos y Levaduras, *Lactobacillus*, microorganismos lipolíticos.
2. - Microorganismos indicadores de higiene: en las categorías 4, 5, y 6 se encuentran los microorganismos no patógenos que suelen estar asociados a ellos, como Coliformes (que para efectos de la presente norma sanitaria se refiere a Coliformes Totales), *Enterobacteriaceas*, a excepción de este último en el caso de "Preparaciones en polvo para Lactantes.
3. - Microorganismos patógenos: son los que se hallan en las categorías 7 a la 15. Las categorías 7, 8 y 9 corresponde a microorganismos patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*; cuya cantidad en los alimentos condiciona su peligrosidad para causar enfermedades alimentarias. A partir de la categoría 10 corresponde a microorganismos patógenos, tales como *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli H7 O15,7* entre otros patógenos, cuya sola presencia en los alimentos condiciona su peligrosidad para la salud.

Artículo 12º.- Métodos de análisis

Los métodos de análisis a utilizar deben ser métodos validados y reconocidos por organismos internacionales. La modificación de estos métodos o el uso de métodos propios deberán ser validados para poder ser utilizados.

Artículo 13º.- Reportes de ensayo

Los Informes de Ensayo, Certificados de Análisis y otras formas de reporte emitidos por los laboratorios, deberán indicar el método de análisis empleado y la expresión de resultados acorde con el método debe expresarse en: UFC/g, UFC/mL, NMP/g, NMP/mL ó Ausencia/25 g. ó mL.

CAPITULO IV DE LOS GRUPOS DE ALIMENTOS Y CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

Artículo 14º. - Grupos de alimentos

Para los efectos de la presente disposición sanitaria, se establecen 19 grupos de alimentos y bebidas según su origen, tecnología aplicada en su procesamiento o elaboración y grupo consumidor; siendo estos:

1. Leche y productos lácteos
2. Helados y mezclas para helados
3. Productos grasos
4. Productos deshidratados, liofilizados o concentrados y mezclas
5. Granos de Cereales, leguminosas y derivados
6. Azúcares, mieles y productos similares
7. Productos de confitería y derivados del cacao
8. Productos de panadería, pastelería, galletería y otros
9. Alimentos para Regímenes especiales.
10. Carnes y productos cármicos

<i>Clostridium perfringens</i> (*)	6	3	5	1	10 ²	10 ³
<i>Salmonella</i> sp.	10	2	5	0	Ausencia/25 g	—

(*) Solo para pastas con relleno de carne

5.7 Productos instantáneos extruidos o expandidos proteinizados o no y hojuelas a base de granos (gramíneas, quenopodáceas y leguminosas) que no requieren cocción.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios Mesófilos	3	3	5	1	10 ²	10 ²
Mohos	5	3	5	2	10 ²	10 ²
Coliformes	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Bacillus cereus</i>	8	3	5	1	10 ²	10 ⁴
<i>Salmonella</i> sp.	10	2	5	0	Ausencia/25 g	—

5.8 Hojuelas a base de granos (gramíneas, quenopodáceas y leguminosas) que requieren cocción.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10 ³	10 ⁴
Mohos	5	3	5	2	10 ²	10 ⁴
Coliformes	5	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Bacillus cereus</i>	8	3	5	1	10 ²	10 ³
<i>Salmonella</i> sp.	10	2	5	0	Ausencia/25 g	—

6. AZUCARES, MIELES, Y PRODUCTOS SIMILARES.

6.1 Azúcares (blanca, rubia, refinada, blanco directo, en polvo, blanda u otros) u otros edulcorantes sólidos (dextrosa, fructosa u otros)

Agentes microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos	1	3	5	3	10 ²	10 ³
Mohos	2	3	5	3	<10	10
Levaduras	2	3	5	2	<50	50

6.2 Jarabes (de maple, de maíz, y otros como la algarrobina), otros edulcorantes líquidos (sacarosa, glucosa, fructosa, azúcar invertido, azúcar líquido, otros)

Agentes microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g. ó mL	
					m	M
Aerobios mesófilos	1	3	5	3	10 ²	10 ³
Enterobacteriaceas (*)	5	3	5	2	<1	10
Mohos	2	3	5	2	10	10 ²
Levaduras osmófilas	2	3	5	2	10	10 ²

(*) Para los de consumo directo. Para los que requieren dilución para su análisis m<10

6.3 Miel, Jalea Real y similares

Agentes microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos	1	3	5	3	10 ¹	10 ³
Anaerobios sulfito reductores	5	3	5	2	10 ²	10 ³
Mohos	2	3	5	2	10	10 ²

6.4 Productos relacionados a la miel (polen, polimiel, propolio, otros)						
Agentes microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr.	
					m	M
Aerobios mesófilos	1	3	5	3	10^3	10^4
Mohos	2	3	5	2	10	10^2
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
7. PRODUCTOS DE CONFITERIA.						
7.1 Chocolates de leche, chocolate blanco, chocolate para taza, chocolate de cobertura con o sin relleno (bombones, tejas y chocotejas)						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr.	
					m	M
Mohos (*)	5	3	5	2	10^2	10^3
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Salmonella</i> sp.	11	2	10(**)	0	Ausencia/25 g	---
(*) Sólo en el caso de chocolates rellenos						
(**) Hacer composito para n = 5.						
7.2 Caramelos duros (sin relleno)						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr.	
					m	M
Aerobios Mesófilos	2	3	5	2	10^2	5×10^2
Mohos	2	3	5	2	10	5×10
7.3 Caramelos blandos, semiblandos y duros con relleno, goma de mascar, marshmallows y otros productos de confiteria con o sin relleno.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr.	
					m	M
Aerobios Mesófilos	2	3	5	2	10^2	10^4
Mohos	2	3	5	2	50	3×10^2
7.4 Turrón blando o duro de confiteria						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr.	
					m	M
Mohos	2	3	5	2	10^2	3×10^3
<i>Staphylococcus aureus</i> (*)	8	3	5	1	10	10^2
<i>Salmonella</i> sp.	10	2	5	0	Ausencia/25 g	---
(*) Sólo para productos que contienen leche						
7.5 Cacao, torta de cacao, pasta de cacao o licor de cacao						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por gr ó mL	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10^3	10^4
Mohos	3	3	5	1	10^2	3×10^2
<i>Salmonella</i> sp.	10	2	5	0	Ausencia/25 g	---

Anexo 10: Resultados de los análisis microbiológicos

ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LAS SOLUCIONES ORALES DE PROPÓLEOS EXPENDIDOS EN CASAS NATURISTAS DE LA CIUDAD DEL CUSCO

Lugar y Fecha: Cusco, 10 de Noviembre del 2019.

Solicitantes:

- Noemi Apaza Llamocca
- Lidia Huamani Huayhua

Para la tesis de investigación intitulada "ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES, FLAVONOIDES Y CONTROL FISICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE SOLUCIONES ORALES DE PROPÓLEOS EXPENDIDOS EN CASAS NATURISTAS DE LA CIUDAD DEL CUSCO"

Muestra: Soluciones orales de propóleos

- Muestra A: Licor de propóleo "APICOSAS"
- Muestra B: Tintura de propóleo "FARMAGEL"
- Muestra C: Tintura de propóleo "MAx"
- Muestra D: Macerado de propóleo "JALK"

Indicadores microbiológicos:

1. **Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables:**
Medio Agar Digerido de Caseína y Soja, Medio Líquido de Digerido de Caseína y Soja.
2. **Recuento de Hongos y Levaduras:** Medio Agar Sabouraud Dextrosa.
3. **Prueba de Ausencia de *Salmonella* spp:** Medio SS
4. **Prueba de Ausencia de *Escherichia Coli*:** Caldo MacConkey, Agar MacConkey



**REPORTE DE RESULTADOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO DE
LAS SOLUCIONES ORALES DE PROPÓLEOS EXPENDIDOS EN LAS
CASAS NATURISTAS DE LA CIUDAD DE CUSCO.**

Resultados Microbiológicos para la muestra A:

- **Muestra:** Licor de propóleo
- **Marca:** APICOSAS

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	LIMITES MICROBIANOS RECOMENDADOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	$\leq 10^4$ UFC/gr. o mL	n1: $\leq 10^2$ UFC/gr n2: $\leq 10^2$ UFC/gr n3: $\leq 10^2$ UFC/gr n4: $\leq 10^2$ UFC/gr n5: $\leq 10^2$ UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Recuento de Hongos y Levaduras	$\leq 10^3$ UFC/gr. o mL	n1: ≤ 10 UFC/gr n2: ≤ 10 UFC/gr n3: ≤ 10 UFC/gr n4: ≤ 10 UFC/gr n5: ≤ 10 UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de salmonella spp	Ausencia de Salmonella spp	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de <i>Escherichia Coli</i>	Ausencia de Escherichia Coli.	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto

Conclusión:

Muestra A: Cumple con los criterios microbiológicos de control de Calidad.



Resultados Microbiológicos para la muestra B:

- **Muestra:** Tintura de propóleo
- **Marca:** FARMAGEL

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	LIMITES MICROBIANOS RECOMENDADOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	$\leq 10^4$ UFC/gr. o mL	n1: $\leq 10^2$ UFC/gr n2: $\leq 10^2$ UFC/gr n3: $\leq 10^2$ UFC/gr n4: $\leq 10^2$ UFC/gr n5: $\leq 10^2$ UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Recuento de Hongos y Levaduras	$\leq 10^3$ UFC/gr. o mL	n1: ≤ 10 UFC/gr n2: ≤ 10 UFC/gr n3: ≤ 10 UFC/gr n4: ≤ 10 UFC/gr n5: ≤ 10 UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de salmonella spp	Ausencia de Salmonella spp	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de <i>Escherichia Coli</i>	Ausencia de Escherichia Coli.	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto

Conclusión:

Muestra B: Cumple con los criterios microbiológicos de control de Calidad.



Resultados Microbiológicos para la muestra C:

- **Muestra:** Tintura de propóleo
- **Marca:** MAx

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	LIMITES MICROBIANOS RECOMENDADOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	$\leq 10^4$ UFC/gr. o mL	n1: $\leq 10^2$ UFC/gr n2: $\leq 10^2$ UFC/gr n3: $\leq 10^2$ UFC/gr n4: $\leq 10^2$ UFC/gr n5: $\leq 10^2$ UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Recuento de Hongos y Levaduras	$\leq 10^3$ UFC/gr. o mL	n1: ≤ 10 UFC/gr n2: ≤ 10 UFC/gr n3: ≤ 10 UFC/gr n4: ≤ 10 UFC/gr n5: ≤ 10 UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de salmonella spp	Ausencia de Salmonella spp	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de <i>Escherichia Coli</i>	Ausencia de Escherichia Coli.	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto

Conclusión:

Muestra C: Cumple con los criterios microbiológicos de control de Calidad.



Resultados Microbiológicos para la muestra D:

- **Muestra:** Macerado de propóleo
- **Marca:** JALK

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS	LIMITES MICROBIANOS RECOMENDADOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	$\leq 10^4$ UFC/gr. o mL	n1: $\leq 10^2$ UFC/gr n2: $\leq 10^2$ UFC/gr n3: $\leq 10^2$ UFC/gr n4: $\leq 10^2$ UFC/gr n5: $\leq 10^2$ UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Recuento de Hongos y Levaduras	$\leq 10^3$ UFC/gr. o mL	n1: ≤ 10 UFC/gr n2: ≤ 10 UFC/gr n3: ≤ 10 UFC/gr n4: ≤ 10 UFC/gr n5: ≤ 10 UFC/gr	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de salmonella spp	Ausencia de Salmonella spp	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto
Identificación de <i>Escherichia Coli</i>	Ausencia de Escherichia Coli.	n1: Ausente n2: Ausente n3: Ausente n4: Ausente n5: Ausente	Apto Apto Apto Apto Apto

Conclusión:

Muestra D: Cumple con los criterios microbiológicos de control de Calidad.



METODO:

El método que se usó es el de la USP, control microbiológico para soluciones orales, se complementó con IMCSF (Comisión Internacional de Especializaciones Microbiológicas para Alimentos) laboratorio de calidad de agua Ministerio de Salud.

Para realizar un control microbiológico a los extractos de propóleo se verificó las normas IRAN-INTA 15935-2 que nos indican los criterios microbiológicos que se deben tener en cuenta, además de que el número de muestras seleccionadas al azar debe ser $n = 5$. Fuente: Extraído del Código Alimentario Argentino artículo 1109.

CONCLUSIÓN:

Las muestras analizadas de soluciones orales de propóleos, de acuerdo a los criterios establecidos, no presentan patógenos, indicando que la higiene en el proceso de manufactura es adecuada y cumplen con los estándares de calidad desde el punto de vista microbiológico.

Los resultados se encuentran dentro de los límites de aceptación de los criterios de alerta, límites críticos e indicativos de higiene aprobados por el ministerio de Salud – Resolución Ministerial N°065-2003-SA/DM y las normas IRAN-INTA 15935-2 (Código Alimentario Argentino).



Anexo 11: Archivo fotográfico

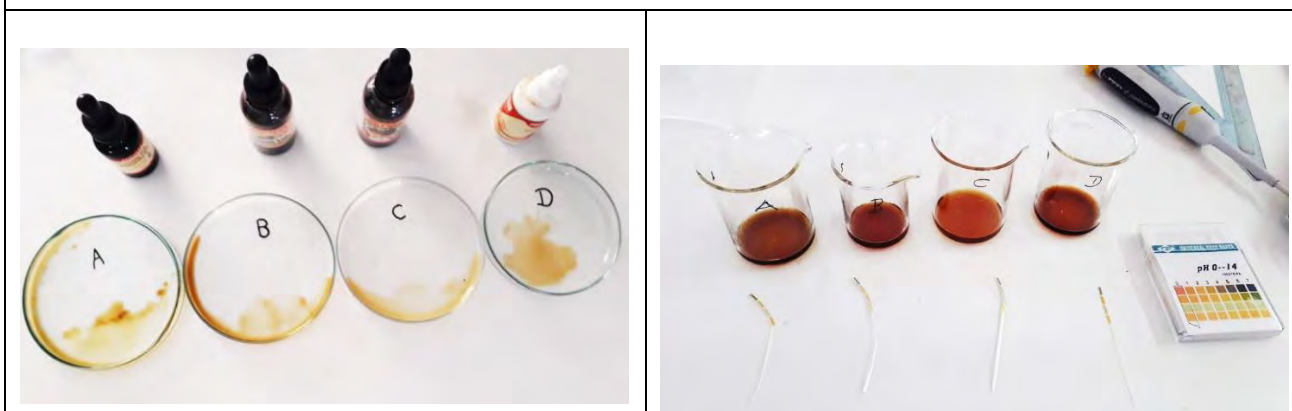
CONTROL DE CALIDAD FISICOQUÍMICO

Fotografía N° 01 y 02: características del material de empaque.



Verificación de las características del producto, envase primario y secundario, etiqueta o rótulo, información que contiene.

Fotografía N° 03 y 04: características organolépticas y pH.



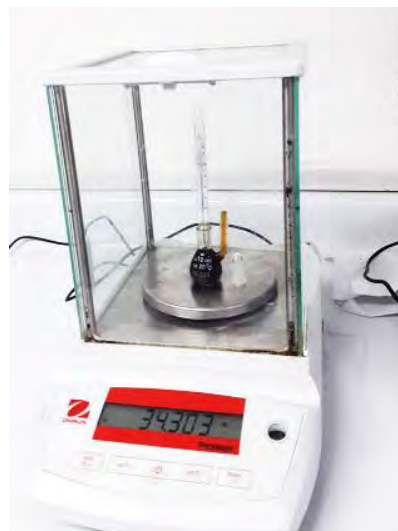
Se procedió a verificar las características organolépticas de color, sabor y olor de las soluciones orales de propoleo.

Se procedió a verificar el pH de las soluciones orales de propoleo.

Fotografía N° 05 y 06: características físicas.



Verificación del contenido nominal de los envases de las soluciones orales de propoleo.



Verificación de la densidad de las soluciones orales de propoleo por el método del picnometro.

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES

Fotografía N° 1



Se preparo el estándar de ácido gálico, y se procedio a leer las absorbancias para la obtener la curva de calibración.

Fotografía N° 2



Se prepararon las muestras de las soluciones orales de propoleo para su lectura en el espectrofotómetro.

Fotografía N° 04 y 05: Preparado de las muestras.



Las muestras se dejó en reposo por 12 horas para su posterior lectura.

Se procedio a verificar el pH de las soluciones orales de propoleo.





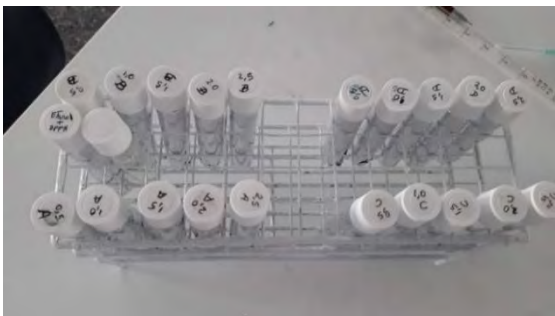

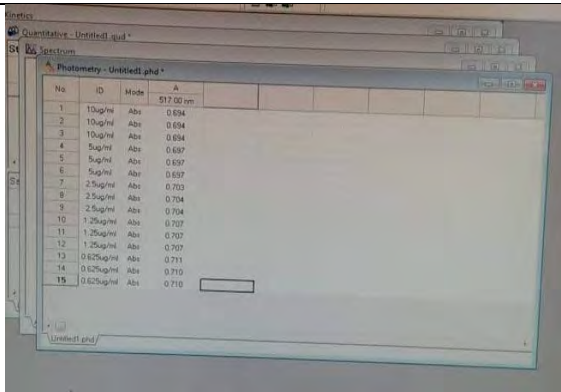

Se lee las absorbancias en el espectrofotómetro.

Resultados de las lecturas de las absorbancias.

DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

<p>Fotografía N° 01y 02: Pesado del estándar.</p>	<p>Fotografía N° 03: Preparación de las muestras.</p>
	
<p>Se preparo el estándar de quercetina, y se procedio a leer las absorbancias para la curva de calibración.</p>	<p>Se prepararon las muestras de las soluciones orales de propoleo para su lectura en el espectrofotómetro.</p>
<p>Fotografía N° 04 y 05: Preparado de las muestras.</p>	
	
<p>Las muestras se dejo en reposo por 12 horas para su posterior lectura.</p>	<p>Se procedio a verificar el pH de las soluciones orales de propoleo.</p>
	
<p>Se lee las absorbancias en el espectrofotómetro.</p>	<p>Resultados de las lecturas de las absorbancias.</p>

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Fotografía N° 1	Fotografía N° 2
	
Se preparo el estándar de trólox, y se procedio a leer las absorbancias para la obtener la curva de calibración.	Se prepararon las muestras de las soluciones orales de propoleo.
Fotografía N° 3	Fotografía N° 4
	
Las muestras deben estar en reposo para su posterior lectura en el espectrofotómetro.	Lectura de las muestras en el espectrofotómetro.
Fotografía N° 5	Fotografía N° 6
	
Resultados de la absorbancia del estandar de trólox.	Resultados de la absorbancia de las muestras.