



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

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD  
ANTIBIÓTICA Y ANTIMICÓTICA PARA PROPÓLEOS Y SU UTILIZACIÓN  
ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (NEEM) EN LA ELABORACIÓN DE UNA  
PASTA DENTAL”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: MINTA TENELEMA MARÍA PILAR**

**DIRECTOR: DR. GALO ALBERTO INSUASTI CASTELO**

Riobamba-Ecuador  
2019

**©2019, María Pilar Minta Tenelema**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de Titulación Tipo: Trabajo Experimental “DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD ANTIBIÒTICA Y ANTIMICÒTICA PARA PROPÒLEOS Y SU UTILIZACIÓN ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (NEEM) EN LA ELABORACIÓN DE UNA PASTA DENTAL.”, de responsabilidad de la señorita egresada María Pilar Minta Tenelema, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Dr. Galo Alberto Insuasti Castelo. <b>DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.</b>	_____	_____
Dra. Janneth María Gallegos Nuñez <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	_____	_____

Yo, María Pilar Minta Tenelema, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados expuestos son auténticos y originales. El patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

**María Pilar Minta Tenelema**

**060441749-3**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios por haberme concedido la dicha de nacer y poder cumplir esta etapa de mi vida.

A mis padres Manuel y Trinidad por ser el motivo que me alienta a superarme, mi fuerza para seguir adelante y mi soporte para no decaer.

A mis hermanos Eugenia, Alfonso, Diego, Patricio, Oscar, Jessica y Andy por ser más que mis hermanos, mis confidentes y por siempre estar para mí en todo momento.

A mi abuelita Rosario que con su amor y dulzura ha sido mi inspiración para alcanzar este logro en mi vida.

A mi abuelito Pedro aunque ya no está físicamente conmigo pero sé que me hubiera querido ver cumplir este logro.

A mí cuñada Ivón por su apoyo en la culminación de mi trabajo de titulación.

A Adrián por brindarme su amor y apoyo incondicional.

**Pily**

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme nacer y poder alcanzar una meta trazada hace mucho tiempo, A mi familia porque nunca dejaron de creer en mí.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por haberme otorgado más que un título una familia de amigos que siempre llevare en mi corazón.

Agradezco a la Escuela de Bioquímica y Farmacia y a sus maestros por haberme guiado en mi formación profesional.

Al Dr. Galo Insuasti tutor de mi trabajo de titulación por la paciencia y el tiempo brindado para culminar con este trabajo.

A la Dra. Janeth Gallegos por su colaboración y orientación en la elaboración de este trabajo.

A la BQF. Yolanda Buenaño por brindarme sus conocimientos y su apoyo durante todo este proceso.

A la BQF. Gisela Pilco por su colaboración e interés que puso para el desarrollo de este trabajo.

A todos quienes de una u otra forma han colaborado para la realización de este trabajo de titulación.

**Pily**

## TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Apicultura .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Propóleo .....</b>	<b>4</b>
<i>1.2.1 Historia del propóleo .....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2 Origen Botánico del propóleo .....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.3 Composición química del propóleo.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.4 Caracterización organoléptica del propóleo.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.5 Caracterización físico-química del propóleo.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.6 Propiedades.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.7 Actividad antibacteriana .....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.8 Actividad antimicótica.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.9 Dosis permisible de ingestión.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.10 Importancia .....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.11 Usos.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.12 Método de recolección de propóleo bruto por mallas y rejillas plásticas .....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.13 Buenas prácticas de cosecha del propóleo Bruto .....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.14 Buenas Prácticas en el almacenamiento de propóleo bruto .....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.15 Calidad del propóleo.....</i>	<i>11</i>
<b>1.3 Azadirachta indica (Neem) .....</b>	<b>12</b>
<i>1.3.1 Clasificación Botánica .....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.2 Descripción botánica de Azadirachta indica. ....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.3 Propiedades.....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.4 Composición .....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.5 Usos.....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.6 Actividad antibiótica.....</i>	<i>14</i>

1.3.7	<i>Actividad antimicótica</i> .....	15
1.4	<b>Fermentación</b> .....	15
1.4.1	<i>Fermentación aerobia</i> .....	16
1.4.2	<i>Fermentación anaerobia</i> .....	16
1.4.3	<i>Fermentación alcohólica</i> .....	16
1.5	<b>Levaduras</b> .....	17
1.5.1	<i>Sacharomyces</i> .....	17
1.5.1.2	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	17
1.5.1.3	<i>Morfología macroscópica y microscópica de Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
1.5.1.4	<i>Fermentación de Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
1.6	<b>Caries dental</b> .....	18
1.7	<b>Pasta dental</b> .....	18
1.7.1	<i>Características de las pastas dentales</i> .....	19
1.7.2	<i>Función de las pastas dentales</i> .....	19
1.7.3	<i>Norma para pastas dentales (NT INEN 1602)</i> .....	19
1.7.4	<i>Composición de las pastas dentales</i> .....	20

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLÒGICO</b> .....	22
2.1	<b>Lugar de investigación</b> .....	22
2.2	<b>Tipo de investigación</b> .....	23
2.3	<b>Fases ejecutadas en la investigación</b> .....	23
2.3.1	<i>Monitoreo, asesoramiento de la recolección del propóleo crudo</i> .....	23
2.3.2	<i>Obtención del extracto blando activo de propóleo estabilizado</i> .....	25
2.3.2.1	<i>Materiales, equipos y reactivos</i> .....	25
2.3.2.2	<i>Recolección y elaboración de una muestra experimental del propóleo crudo</i> .....	25
2.3.2.3	<i>Acondicionamiento del propóleo crudo para la obtención del extracto blando de propóleo</i> .....	26
2.3.2.4	<i>Obtención del extracto blando de propóleo</i> .....	27
2.3.2.5	<i>Control de calidad físico químico del extracto blando de propóleo</i> .....	27
2.3.3	<i>Evaluación de la actividad antimicótica del extracto alcohólico de propóleo sobre S. cerevisiae por el método de macro dilución en caldo</i> .....	29
2.3.3.1	<i>Materiales, equipos y reactivos</i> .....	30



2.3.3.2	<i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria del propóleo sobre S. cerevisiae por el método de macro dilución en caldo.</i> .....	30
2.3.3.3	<i>Actividad antimicótica del extracto alcohólico de propóleo</i> .....	30
2.3.4	<b><i>Método de campo de evaluación de actividad antimicótica del extracto alcohólico de propóleo sobre S cerevisiae para los apicultores.</i></b> .....	<b>34</b>
2.3.4.1	<i>Materiales, equipos y reactivos.</i> .....	35
2.3.4.2	<i>Hipótesis.</i> .....	35
2.3.4.3	<i>Método de laboratorio para sustento del método de campo para evaluar la actividad antimicótica del extracto alcohólico de propóleo.</i> .....	35
2.3.5	<b><i>Ejecución de la evaluación de la actividad antibiótica del extracto alcohólico de propóleo en la leche cruda doblemente desnatada por el método de recuento de viables.</i></b> .....	<b>37</b>
2.3.5.1	<i>Materiales, equipos y reactivos.</i> .....	37
2.3.5.2	<i>Hipótesis.</i> .....	37
2.3.5.3	<i>Definición de tratamientos para la determinación de actividad antibiótica del extracto alcohólico de propóleo.</i> .....	37
2.3.6	<b><i>Desarrollo de un método de campo para evaluar la actividad antibiótica del propoleo de fácil uso para los apicultores.</i></b> .....	<b>38</b>
2.3.6.1	<i>Materiales, equipos y reactivos.</i> .....	39
2.3.6.2	<i>Hipótesis.</i> .....	39
2.3.6.3	<i>Método de campo para evaluar la actividad antibiótica del extracto alcohólico de propóleo.</i> .....	39
2.3.7	<b><i>Elaboración de una pasta dental con propóleo blando activo asociado a los beneficios ° reportados para Azadirachta indica (Neem)</i></b> .....	<b>40</b>
2.3.7.1	<i>Materiales, equipos y reactivos.</i> .....	40
2.3.7.2	<i>Desarrollo de la formulación.</i> .....	40
2.3.7.3	<i>Diagrama de flujo de la elaboración de la pasta dental con propóleo e infusión de hojas de Azadirachta indica Neem</i> .....	42
2.3.7.4	<i>Pruebas de control de calidad de la pasta dental de propóleo - Azadirachta indica (Neem)</i> .....	42
2.3.8	<b><i>Análisis estadístico de datos</i></b> .....	<b>45</b>
2.3.9	<b><i>Socialización a ASOPROACH (Obtención, evaluación antimicótica y antibiótica de campo, elaboración de pasta dental, del propóleo blando obtenido)</i></b> .....	<b>45</b>

## CAPÍTULO III

<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1 Monitoreo y asesoramiento de la recolección del propóleo crudo.</b> .....	<b>46</b>
3.1.1 <i>Selección de los apicultores proveedores de propóleo crudo.</i> .....	46
3.1.2 <i>Monitoreo y asesoramiento de la recolección del propóleo crudo.</i> .....	46
3.1.2.1 <i>Resultados de la lista de chequeo aplicado a los apicultores para el monitoreo de la ...</i>	46
<b>3.2 Obtención de extracto blando activo de propóleo estabilizado.</b> .....	<b>48</b>
3.2.1 <i>Diagrama de flujo del procedimiento de obtención del extracto blando de propoleo estabilizado</i> .....	48
3.2.2 <i>Rendimiento del extracto blando de propóleo</i> .....	49
3.2.3 <i>Análisis de calidad físico-químico del extracto blando de propóleo.</i> .....	49
<b>3.3 Resultados de la determinación de la actividad antimicótica del extracto alcohólico del propóleo sobre <i>S. cerevisiae</i> por el método de macro dilución en caldo.</b> .....	<b>50</b>
<b>3.4 Método de campo de evaluación de la actividad antimicótica del propóleo.</b> .....	<b>53</b>
3.4.1 <i>Método de laboratorio empleado para sustentar los resultados obtenidos con el método de campo.</i> .....	53
3.4.2 <i>Propuesta para apicultores de un método de campo para determinar actividad antimicótica (Temperatura ambiente)</i> .....	54
<b>3.5 Resultados de la evaluación de la actividad antibiótica del extracto alcohólico del propóleo en leche cruda doblemente desnatada por el método de recuento de viables.</b> .....	<b>55</b>
<b>3.6 Propuesta del método de campo para evaluación antibiótica del extracto alcohólico de propóleo.</b> .....	<b>58</b>
3.6.1 <i>Tiempo de coagulación de la caseína en la leche por el método de campo propuesto.</i>	59
3.7 <i>Resultados de la formulación y elaboración de una pasta dental de propóleo asociado a <i>Azadirachta indica</i> (Neem).</i> .....	60
3.7.1 <i>Concentración de propóleo activo en la formulación unitaria de 100 g de pasta dental</i>	60
3.7.2 <i>Formulación de la pasta dental</i> .....	61
3.7.3 <i>Metodología de elaboración de la pasta dental</i> .....	61
3.7.4 <i>Rendimiento práctico de la formulación</i> .....	61
3.7.5 <i>Estimación de la cantidad de propóleo activo presente en una fracción de pasta dental para un cepillado dental.</i> .....	62
3.7.6 <i>Resultados del control de calidad de la pasta dental elaborada.</i> .....	62

3.7.6.1	<i>pH de la pasta dental</i> .....	62
3.7.6.2	<i>Determinación de espuma por el método de índice afrosimétrico</i> .....	62
3.7.6.3	<i>Resultados del análisis sensorial de la pasta dental</i> .....	63
<b>3.8</b>	<b>Socialización del proceso de obtención de propóleo, método de campo para la evaluación antibiótica y antimicótica del propóleo en ASOPROACH</b> .....	<b>64</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>65</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		<b>66</b>
<b>GLOSARIO</b> .....		<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
<b>Tabla 1-1</b>	Componentes principales del propóleo. .... 6
<b>Tabla 2-1</b>	Compuestos del propóleo con actividad biológica. .... 8
<b>Tabla 3-1</b>	Características de calidad del propóleo. .... 12
<b>Tabla 4-1</b>	Clasificación botánica de <i>Azadirachta indica</i> . .... 13
<b>Tabla 5-1</b>	Componentes de las pastas dentales. .... 20
<b>Tabla 1-3</b>	Resultados del check list aplicado a los tres apicultores proveedores de propóleo crudo para la investigación. .... 46
<b>Tabla 2-3</b>	Tabla resumen de incumplimientos de los 3 apicultores proveedores de propóleo bruto. .... 47
<b>Tabla 3-3</b>	Resultado del rendimiento del propóleo blando obtenido. .... 49
<b>Tabla 4-3</b>	Resultados de los parámetros de calidad del extracto blando de propóleo según Norma Ramal Cubana (NRSP 312). .... 49
<b>Tabla 5-3</b>	Promedios totales del recuento de UFC de <i>S. cerevisiae</i> para las concentraciones de propóleo y etanol. .... 51
<b>Tabla 6-3</b>	Tiempos promedios de fermentación de soluciones con propóleo, etanol y el blanco correspondiente contaminadas con <i>S. cerevisiae</i> . .... 53
<b>Tabla 7-3</b>	Recuento de UFC Aerobios mesófilos en tratamientos de leche cruda con propóleo, etanol a las 24 horas de incubación. .... 56
<b>Tabla 8-3</b>	Resultados del tiempo de desestabilización de la leche en las muestras de leche con etanol y el blanco. .... 59
<b>Tabla 9-3</b>	Formulación para 100 gramos de pasta dental. (Propóleo – <i>Azadirachta indica</i> ) ..... 61
<b>Tabla 10-3</b>	Resultados de la formación de espuma de la pasta dental por el índice afrosimétrico. .... 62
<b>Tabla 11-3</b>	Resultados de análisis sensorial. .... 63

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Páginas</b>
<b>Gráfico 1-3</b>	Efecto de las concentraciones de propóleo y etanol sobre el número de UPC de <i>S.cerevisiae</i> ..... 51
<b>Gráfico 2-3</b>	Tiempo de fermentación de los tratamientos con propóleo, etanol y el blanco. 54
<b>Gráfico 3-3</b>	Recuento de Aerobios mesófilos en tratamientos de leche cruda con propóleos, etanol y el blanco correspondiente. .... 56
<b>Gráfico4-3</b>	Tiempo de coagulación de la leche cruda con propóleo, etanol y el blanco correspondiente. .... 60
<b>Gráfico 5-3</b>	Aceptabilidad de los parámetros sensoriales de la pasta dental propóleo-A. indica. .... 64

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1-2</b>	Lista de control. .... 24
<b>Figura 2-2</b>	Diagrama de flujo de la elaboración de la pasta dental de propóleo – Azadirachta indica. .... 42
<b>Figura 3-2</b>	Encuesta para la evaluación sensorial de la pasta dental de propóleo - Azadirachta indica. .... 44
<b>Figura 1-3</b>	Diagrama de flujo para obtener el extracto blando de propóleo. ....48

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	<b>Páginas</b>
<b>Fotografía 1-2</b> Propóleo crudo. ....	25
<b>Fotografía 1-4</b> Obtención de extracto blando de propóleo.....	74
<b>Fotografía 2-4</b> Fotos de la determinación de la actividad antimicótica del propóleo sobre <i>S. cerevisiae</i> . ....	75
<b>Fotografía 3-4</b> UPC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en el método de macrodilución en caldo.....	76
<b>Fotografía 4-4</b> Metodología de evaluación antimicótica del propóleo por el método de campo.77	
<b>Fotografía 5-4</b> Metodología de evaluación antibiótica del propóleo. ....	78
<b>Fotografía 6-4</b> Frascos experimentales. ....	78
<b>Fotografía 7-4</b> Recuento de UPC de Aerobios mesófilos 0 horas. ....	79
<b>Fotografía 8-4</b> Recuento de Aerobios mesófilos en la leche cruda tras 24 horas de incubación.79	
<b>Fotografía 9-4</b> Coagulación de la caseína en muestras con etanol y propóleo. ....	80
<b>Fotografía 10-4</b> Preparación de la infusión de <i>Azadirachta indica</i> . ....	81
<b>Fotografía 11-4</b> Elaboración de la pasta dental.....	82
<b>Fotografía 12-4</b> Socialización de resultados en ASOPROACH. ....	82

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexo A</b>	Obtención del extracto blando de propóleo.
<b>Anexo B</b>	Control de calidad físico-químico del extracto blando de propóleo.
<b>Anexo C</b>	Determinación de la actividad antimicótica del propóleo
<b>Anexo D</b>	UFC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por el método de macrodilución en caldo
<b>Anexo E</b>	Sustento para la propuesta del método de campo de actividad antimicótica para propóleo
<b>Anexo F</b>	Preparación de frascos de leche cruda con propóleo, etanol y el blanco
<b>Anexo G</b>	Fracos experimentales.
<b>Anexo H</b>	Recuento de UFC de Aerobios mesófilos en leche cruda.
<b>Anexo I</b>	Recuento de Aerobios mesófilos en leche cruda tras 24 horas de incubación.
<b>Anexo J</b>	Resultados de la precipitación de la caseína de la leche.
<b>Anexo K</b>	Preparación de la infusión de <i>Azadirachta indica</i> .
<b>Anexo L</b>	Elaboración de la pasta dental de propóleo- <i>Azadirachta indica</i> .
<b>Anexo M</b>	Socialización en ASOPROACH.
<b>Anexo N</b>	Resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria del propóleo sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
<b>Anexo O</b>	Tabla de resultados del tiempo de fermentación de las jeringuillas del método de campo
<b>Anexo P</b>	Resultados del recuento de Aerobios mesófilos de muestras de leche con propóleo, etanol y el blanco.
<b>Anexo Q</b>	Resultados del tiempo de estabilización de la caseína en muestras de leche con propóleo, etanol y el blanco.
<b>Anexo R</b>	Certificado de socialización en ASOPROACH.
<b>Anexo S</b>	Aval para la realizar la socialización en ASOPROACH.



## RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo establecer una metodología de obtención de extracto blando de propóleo, diseñar y desarrollar métodos de campo para evaluar su actividad antibiótica y antimicótica y la utilización del propóleo activo en la elaboración de un dentífrico asociado a *Azadirachta indica*. Este estudio se desarrolló por petición de la Asociación de producción apícola de Chimborazo (ASOPROACH), ante su necesidad de realizar un estudio sobre la posibilidad de obtener extracto blando de propóleo con actividad antibiótica y antimicótica comprobada a partir del propóleo crudo de sus apiarios. La actividad antibiótica y antimicótica del propóleo se evaluaron mediante métodos de campo diseñado y desarrollados en este trabajo a fin de que puedan ser empleados por los apicultores. Estos métodos se comprobaron empleando ensayos convencionales, *in vitro*. Adicionalmente se elaboró un dentífrico con (CIM) de propóleo y una infusión de *A.indica* al 10 %. La CIM del extracto de propóleo sobre *Saccharomyces cerevisiae* se determinó mediante el método de macrodilución en caldo, de un inóculo inicial de  $3 \times 10^8$  células/levadura. El método de campo para evaluar la actividad antimicótica del propóleo usó como indicador la producción de CO<sub>2</sub> después de la inoculación de *S.cerevisiae* en una solución de sacarosa al 40 %. Mientras que el método de campo para evaluar la actividad antibiótica del propóleo usó leche cruda desnatada y como indicador el tiempo de coagulación de la caseína; verificándose el efecto por un recuento de *Aerobios mesófilos*, después de 24 horas de incubación. La evaluación de una serie de concentraciones de propóleo definió la CIM en un valor de 12,5 mg/mL ( $p \leq 0,001$ ). En el ensayo de campo de actividad antimicótica, 12,5 mg/mL de propoleo inhibe el desarrollo de UPC de levaduras sin detectarse CO<sub>2</sub> que desplazaría el embolo de una jeringuilla. La actividad antibiótica del propóleo determinada con el método de campo arrojó una reducción del 75 % de la población expuesta al propóleo a las 24 horas de incubación, con coagulación evidente de la caseína a las 84,22 horas. Se concluye que 12,5 mg/mL de propóleo presenta actividad antimicótica sobre *S.cerevisiae* y actividad antibiótica sobre *A. mesofilos*, efecto demostrado por ensayos *in vitro* y de campo. El dentífrico elaborado presentó un pH de 7,96 y aceptabilidad sensorial sobre el 60 %.

**Palabras claves:** <BIOQUÍMICA> <FARMACIA>, <CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)>, <PROPÒLEO>, <NEEM (*Azadirachta indica*)>, <*Saccharomyces cerevisiae* (LEVADURA)>, <*Aerobios mesófilos* (BACTERIA)>

## ABSTRACT

This research aims to establish a methodology for obtaining soft extract of propolis, design and develop field methods to evaluate its antibiotic and antifungal activity and the use of active propolis in the elaboration of toothpaste associated with *Azadirachta indica*. This study was developed at the request of the Association of Beekeeping production of Chimborazo (ASOPROACH), in view of its need to carry out a study on the possibility of obtaining soft extract of propolis with antibiotic and antifungal activity proven from the crude propolis of their apiary. The antibiotic and antifungal activity of propolis were evaluated using field methods designed and developed in this work so that they can be used by beekeepers. These methods were tested using conventional, *in vitro* tests. Additionally, toothpaste was developed with Propolis (CIM) and an infusion of *Azadirachta indica* 10%. The CIM of Propolis extract on *Saccharomyces cerevisiae* was determined by the method of macro dilution in broth, of an initial innocuousness of  $3 \times 10^8$  cells/yeast. The field method to evaluate the antifungal activity of propolis use as an indicator the production of CO<sub>2</sub> after inoculation of *S. cerevisiae* in a solution of sucrose to 40%. While the field method to evaluate the antibiotic activity of propolis used raw milk skimmed and as an indicator the clotting time of casein; Verified the effect by *mesophiles aerobics* count after 24 hours of incubation. The evaluation of a series of concentrations of Propolis defined the CIM at a value of 12.5 mg/ML ( $p \leq 0.001$ ). In the field trial of antifungal activity, 12.5 mg/ML of propolis inhibits the development of UPC of yeast without detecting CO<sub>2</sub> that would displace the plunger of a syringe. The antibiotic activity of propolis determined with the field method showed a reduction of 75% of the population exposed to propolis at 24 hours of incubation, with apparent coagulation of casein at 84.22 hours. It is concluded that 12.5 mg/ML Propolis presents antifungal activity on *S. cerevisiae* and antibiotic activity on *A. Mesophiles*, effect demonstrated by *in vitro* and field trials. The toothpaste prepared presented a pH of 7.96 and sensory acceptability 60%.

**KEY WORDS** :< BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (CIM)>, <PROPOLIS>, NEEM (*Azadirachta indica*) >, <*Saccharomyces cerevisiae* (LEVADURA)>, <*Aerobios mesophiles* (BACTERIA)>

## INTRODUCCIÓN

El presente proyecto titula “DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD ANTIBIÒTICA Y ANTIMICÒTICA PARA PROPÒLEOS Y SU UTILIZACIÓN ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (Neem) EN LA ELABORACIÓN DE UNA PASTA DENTAL.” Esta investigación es parte del proyecto de investigación del grupo SAGID titulado “ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO,(ASOPROACH) PARA DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO“, Proyecto que cuenta con un acuerdo interinstitucional firmado entre el grupo de investigación SAGID, ASOPROACH y la facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

Por petición de los apicultores de la Asociación de producción apícola de Chimborazo (ASOPROACH) sobre la necesidad de realizar un estudio sobre la obtención de propóleo con actividad antibiótica y antimicótica demostrada la investigación desarrolló: un proceso de obtención de extracto blando de propóleo, un método de campo de evaluación de la actividad antibiótica y antimicótica del propóleo proveniente de sus apiarios basado en un método microbiológico estándar, con el cual se elaboró una pasta dental asociada a *Azadirachta indica* (Neem).

El propóleo es una mezcla compleja de sustancias producida por la abeja *Apis mellifera* que presenta múltiples propiedades que pueden verse afectadas por factores como el método de recolección, la pureza del propóleo crudo, el método de obtención, la conservación entre otras.

Los métodos de evaluación de actividad antibiótica y antimicótica existentes, requieren de instalaciones adecuadas, equipos sofisticados y procedimientos estandarizados que resultan muy complejos de realizar por los apicultores a pesar de que estos métodos son científicamente necesarios. Sin embargo mediante la investigación realizada, se benefició a la Asociación de producción apícola de Chimborazo, ya que se dotó a sus apicultores un método que les permitirá determinar la actividad antibiótica y antimicótica del propóleo de sus apiarios de una manera rápida, fácil y beneficiosa de realizar por ellos en su mismo apiario, debiendo aclarar que este estudio fue respaldado con la metodología microbiológica estándar. De tal manera que en el

desarrollo de elaborados a partir de propóleo, se use una materia prima con actividad farmacológica demostrada.

El desarrollo de diferentes productos medicinales a partir de fuentes naturales tradicionales es muy importante en el campo farmacológico, particularmente en este proyecto se buscó aportar en lo que se refiere a salud bucal, con la elaboración de una pasta dental donde el propóleo está acompañado de las bondades que presenta *Azadirachta indica* (Neem).

El uso del propóleo en odontología se ha estudiado desde la antigüedad, ya que ejerce una acción anestésica local, atribuible al contenido de pinocembrina, galangina y ésteres de cafeato. El propóleo presenta un efecto cariostático sobre el diente provocando inhibición de la evolución de placa dental y favoreciendo la remineralización de la dentina, además inhibe la Glucosil transferasa reconocida como un factor de virulencia de la caries dental e inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans* involucrado en el desarrollo de caries dentales (Salamanca Groso , 2018, p. 307).

En la actualidad los dentífricos ya utilizan el propóleo como principio activo de su formulación, pero el valor agregado que le brindamos a la formulación desarrollada, es la asociación de una infusión de *A. indica* (Neem) que posee múltiples propiedades bioactivas, entre las que se destaca su actividad antimicrobiana. La combinación de los principios activos *propoleo-A.indica* junto con los excipientes adecuados darán lugar a un producto multifuncional ya que además de ser un producto de aseo bucal también podría evitar y tratar las infecciones bucodentales asociadas a hongos y bacterias.

La pasta dental realizada en el presente proyecto puede ser considerada como un tratamiento alternativo al uso de antibióticos por los inconvenientes que existen alrededor al uso de ellos como son la resistencia bacteriana y otros inconvenientes.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Desarrollar un método de campo indicativo de actividad antibiótica y antimicótica para propóleo para utilizarlo asociado con *Azadirachta indica* (Neem) en la elaboración de una pasta dental.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Monitorear y asesorar la recolección del propóleo en el apiario seleccionado como proveedor.
- Establecer un procedimiento de obtención y estabilización del propóleo.
- Diseñar y ejecutar el proceso de evaluación de actividad antibiótica y antimicótica del propóleo como materia prima en elaborados.
- Interpretar resultados.
- Elaborar una pasta dental con propóleo activo asociado con *Azadirachta indica* (Neem).
- Socializar y ratificar en ASOPROACH el proceso de obtención de propóleo, método de campo para la evaluación de la actividad antimicótica y antibiótico del propoleo.

# CAPÍTULO 1

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1 Apicultura

La apicultura es un arte que consiste en la crianza de abejas, manejo y control de sus colmenas para aprovechar sus productos tales como la miel, jalea real, propóleos, polen, cera etc. Estos productos presentan diversas propiedades biológicas y benéficas para el hombre. Hoy en día representa una actividad económica importante en muchos países (Ulloa, et al., 2010, pp. 11-18).

### 1.2 Propóleo

El propóleo, también llamado pegamento de abeja es una matriz compleja de sustancias, sintetizada por la abeja *Apis mellífera*, a partir de la recolección de resinas, bálsamos, gomas, mucílagos, savia y otras exudaciones, en los brotes de los árboles y modificada añadiéndole cera, polen y secreciones de sus glándulas salivales rica en enzimas. Es utilizado por las abejas como cemento para sellar grietas o espacios abiertos, mantener la humedad y temperatura estable en la colmena durante todo el año gracias a su naturaleza cerosa y mecánica. Además es utilizado en la defensa de la colmena frente a microorganismos extraños y roedores permitiendo mantener un ambiente aséptico en la colmena (Aymaré Navarro López, et al., 2018, pp. 19-22) .

#### 1.2.1 Historia del propóleo

En el Papiro de Ebers, ya se hacía referencia a las acciones del propóleo, cuyo nombre significa escudo o muralla de la ciudad. El propóleo se utilizaba desde hace por lo menos 3000 años. Los sacerdotes del antiguo Egipto lo utilizaban como medicina y como ungüento o crema para embalsamar y para conservar las vísceras de los faraones (Suarez Quinodoz, et al., 2013, pp. 21-26).

El propóleo fue utilizado por los griegos como tratamiento para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones. El mayor uso del propóleo en la historia se registra alrededor del año 1900

durante la guerra de Boers, situada en África del sur donde fue usada para el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante (Cayuela & Serrano, 2003a: pp. 94-96).

En 1960 comienzan las primeras investigaciones, donde Lavie demuestra la actividad bacteriostática del propóleo, con una alta actividad sobre *B. subtilis*, *B. alves* y *Proteus vulgaris* y una actividad media sobre *Salmonella* y *B. Larvae* (Cayuela & Serrano, 2003b: pp. 94-96).

El propóleo fue empleado por los Incas como agente antipirético, las farmacopeas del siglo XVII lo designaban ya como una droga oficial y en Europa se su popularidad se hizo más sólida entre los siglos XVII y el siglo XX debido a su actividad antibacteriana; pero cuando se descubrió la penicilina y demás antibióticos el propóleo fue dejado a un lado (Padrón González, et al., 2012, p. 3).

Rojas y col, 2016 en su trabajo sobre las propiedades fisicoquímicas del propóleo indican que las propiedades curativas del propóleo se relataron ya a lo largo del antiguo testamento (Rojas Silva, et al., 2016a: pp. 3-16).

### **1.2.2 Origen Botánico del propóleo**

Las fuentes botánicas más trascendentales de propóleo en las regiones templadas son el álamo (*Populus spp.*), abedul (*Betula alba*), sauce (*Salix spp.*), pino (*Pinus spp.*), encino (*Quercus spp.*), fresno (*Fraxinus spp.*), entre otras. En las regiones mediterráneas, las fuentes botánicas más importantes de propóleo son los álamos y jaras (*Cistus spp.*) y en las regiones donde no existen este tipo de flora las abejas recolectan el propóleo de otras plantas lo cual provoca diferencias en su composición química (Vargas Sanchez, et al., 2013, p. 705).

La calidad del propóleo está relacionado con el origen botánico y geográfico de la zona de recolección, debido a que la flora utilizada por las abejas para recolectar las resinas y bálsamos está implicada en algunas de las propiedades físicas como el color, sabor, textura y punto de fusión (Vargas Sanchez, et al., 2013, p. 706).

En años recientes numerosos estudios condujeron a la idea de que diferentes muestras de propóleos podrían ser completamente diferentes con respecto a sus potenciales componentes químicos y biológicos. Debido a esta situación, muchos investigadores han centrado su atención

en propóleos de regiones inexploradas del mundo con el fin de proporcionar nuevos productos naturales valiosos (Cuesta Rubio, et al., 2017a: pp. 77-183) .

### **1.2.3 Composición química del propóleo**

La composición química del propóleo es compleja y variable, estando relacionada con la flora local cercana a la colmena, la región, la estación, y la especie de abeja en el sitio de colección. Sus principales componentes se observan en la siguiente tabla:

**Tabla 1-1:** Componentes principales del propóleo.

<b>Componentes</b>	<b>Porcentaje %</b>
<b>Resinas y bálsamos</b>	50-55
<b>Ceras</b>	25-35
<b>Aceites volátiles</b>	10
<b>Polen</b>	5
<b>Minerales y sustancias orgánicas</b>	5

**Fuente:** (Vargas Sanchez, et al., 2013, p. 707)

**Elaborado por:** Pilar Minta

Existe mucha evidencia de que el propóleo es una fuente abundante de polifenoles, principalmente flavonoides y ácidos fenólicos, a quienes se les atribuye sus propiedades farmacológicas. El éster fenético del ácido caféico ha sido identificado como una de las principales sustancias biológicamente activas; es mejor conocido como éster de ácido fenilpropanoico y conocido por su actividad antioxidante, antiinflamatorio, quimio prevención y antitumoral (In-Kyoung, et al., 2014, p. 3504).

Un marcador para diferenciar el propóleo de otros productos de la colmena constituye la presencia de 8 flavonoides tales como: rutina, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, crisina y galangina. Siendo la presencia de estos ocho flavonoides un parámetro de calidad del propóleo debido a que las actividades biológicas que presenta el propóleo se deben básicamente a la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides en su composición. (Vargas Sanchez, et al., 2013, p. 707).



#### **1.2.4 Caracterización organoléptica del propóleo**

Las características organolépticas del propóleo dependen de la fuente vegetal y el método de recolección. El color del propóleo es muy variado entre negro, castaño, verde, amarillo claro a castaño oscuro. Se ha reportado también colores como el ocre, rojo, pardo, castaño claro y verde (Aymaré Navarro López, et al., 2018b: p. 21).

El propóleo a menudo presenta un olor penetrante, balsámico, agradable y dulzón, que se puede deber a su origen vegetal, *en otros casos predomina el olor a cera, relacionándose con los compuestos volátiles de mezclas complejas, como son los compuestos alifáticos de bajo peso molecular tales como alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.* “(Aymaré Navarro López, et al., 2018c: pp. 20-21). El propóleo puede tener un sabor acre, frecuentemente amargo, y en algunos casos puede tener sabor picante (Souto Román , et al., 2016b: p. 84).

#### **1.2.5 Caracterización físico-química del propóleo**

La consistencia del propóleo varía en función de la temperatura. Es así que a una temperatura superior a 45°C se vuelve suave, flexible y muy pegajoso, mientras que al disminuir la temperatura por debajo de 15°C, adquiere una consistencia dura y quebradiza, el propóleo puede adquirir una consistencia líquida a una temperatura entre 60 y 70°C, Si embargo para algunas muestras el punto de fusión puede ser de 100°C. Los principios activos del propóleos a menudo son extraídos con etanol, propilenglicol y aceite. (Aymaré Navarro López, et al., 2018d, pp. 20-22).

#### **1.2.6 Propiedades**

El propóleo presenta múltiples propiedades funcionales tales como: anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, anti ulceroso, antidiabético y antihepatotóxico, antitumoral, inmunoestimulante, anti-VIH, antivirales entre otros. Estas actividades biológicas, se atribuyen principalmente a sus abundantes compuestos fenólicos como flavonoides, flavonas, flavonoles, flavanones, dihidroflavonoles y otros compuestos fenólicos sustituidos principalmente por ácidos cinámicos y sus ésteres, terpenos y sesquiterpenos. Estas propiedades varían en función de la región debido a la vegetación propia de cada región, razón por la que es necesario estudiar

el propóleo de diferentes orígenes para conocer sus actividades farmacológicas (Zhang, et al., 2018, pp. 104-112).

El propóleo puede presentar múltiples propiedades tales como antioxidantes, antimicrobianas, antifúngico etc. Estas propiedades dependen de la presencia de los compuestos con actividad biológica del propóleo. En la tabla siguiente se muestran los principales compuestos del propóleo con actividad biológica (Vargas Sanchez, et al., 2013, p. 708)

**Tabla 2-1:** Compuestos del propóleo con actividad biológica.

Bioactividad	Compuesto	Denominación IUPAC	Número CAS	Referencias
Antioxidante	Acacetina	5,7-dihidroxi-2-(4-metoxifenil) croman-4-uno	480-44-4	Bedascarrasbure <i>et al.</i> , 2004; Velazquez <i>et al.</i> , 2007; Yang <i>et al.</i> , 2011; Valencia <i>et al.</i> , 2012.
	Ácido cafeico	(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)- ácido 2-propenoico	331-39-5	
	Ácido cinámico	(E)-3-fenil-ácido propil 2-enoico	140-10-3	
	Ácido ferúlico	(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) ácido propil-2-enoico	537-98-4	
	Ácido sinapínico	(E)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) ácido propil-2-enoico	530-59-6	
	Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico	501-98-4	
	Apigenina	5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-uno	520-36-5	
	Artepillin C	(E)-3-[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil) fenil] ácido propenoico	72944-19-5	
	Éster fenético del ácido cafeico (CAPE)	(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)- ácido 2-propenoico, 2-éster fenético	104594-70-9	
	Galangina	3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-uno	548-83-4	
	Kaempferol	3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-uno	520-18-3	
Pinocembrina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno	480-39-7		
Quercetina	2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-uno	117-39-5		
Antimicrobiana	Ácido cafeico	(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)- ácido 2-propenoico	331-39-5	Takaisi and Schilcher, 1994; Mirzoeva <i>et al.</i> , 1997; Velazquez <i>et al.</i> , 2007; Ahn <i>et al.</i> , 2009.
	Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico	501-98-4	
	Crisina	5,7-dihidroxi-2-fenilcroman-4-uno	480-40-0	
	Éster fenético del ácido cafeico (CAPE)	(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)- ácido2-propenoico, 2-éster fenetil	104594-70-9	
	Galangina	3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-uno	548-83-4	
	Naringenina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidrocroman-4-uno	10236-47-29	
	Pinobanksina	(2R,3R)-3,5,7-trihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno	548-82-3	
	Pinobanksina-3-acetato	[(2R,3R)-5,7-dihidroxi-4-oxo-2-fenil-2,3-dihidrocroman-3-yl] acetato	52117-69-8	
Pinocembrina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno	480-39-7		
Quercetina	2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-uno	117-39-5		
Antifúngica	Ácido cafeico	(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)- ácido 2-propenoico	331-39-5	Bedascarrasbure <i>et al.</i> , 2004; Chaillou y Nazareno, 2009.
	Ácido ferúlico	(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) ácido propil-2-enoico	537-98-4	
	Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico	501-98-4	
	Galangina	3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-uno	548-83-4	
	Pinocembrina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno	480-39-7	

Fuente: (Vargas Sanchez, et al., 2013, p. 708)

### 1.2.7 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del propóleo se atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos que se caracterizan por poseer en su estructura molecular un grupo fenol, y un anillo aromático unido a un grupo funcional hidroxilo (Vaculik , et al., 2011b: pp.43-45).

Las bacterias sobre las cuales el propóleo presenta actividad son: bacterias nocivas para la piel como el *Estafilococo dorado* y el *Streptococo B hemolítico*, bacterias gástricas como el *Helicobacter pylori*, bacterias involucradas en las caries dentales como el *Streptococo mutans*,

contra bacterias Gram positivas como: *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis* entre otros. (Vaculik , et al., 2011c: pp. 43-47).

### **1.2.8 Actividad antimicótica**

Las propiedades antimicóticas del propóleo se atribuyen principalmente a sesquiterpenos y flavanonas dentro de las que se destacan el bisabol y la pinocembrina, respectivamente. Estudios han demostrado el efecto antimicótico del propóleo frente a cepas de tipo *Candida*, *Torulopsis* y *Tricosporon* de pacientes con dermatitis fúngica. Por otra parte el propóleo también presenta actividad sobre hongos fitopatógenos como *Colletotri- chum sp.*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Salamanca Grosó , 2018, p. 307).

### **1.2.9 Dosis permisible de ingestión.**

El consumo diario de propóleos de acuerdo al modo de uso no podrá superar 300 mg/día para adultos y 150 mg/día para niños menores de 12 años. (Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos, 2008). A pesar de su notable bioactividad y potencial aplicación como un ingrediente en alimentos y formulaciones farmacéuticas, el consumo de grandes cantidades de propóleo está restringido debido a su baja solubilidad en agua, características sensoriales indeseables y baja biodisponibilidad. (Zhang, et al., 2018a: pp. 104-112)

Para superar los inconvenientes asociados con la baja solubilidad del propóleo, se han desarrollado muchos portadores de entrega tales como micelas poliméricas, liposomas, nanocomplejos y cryogel para mejorar su biodisponibilidad (Zhang, et al., 2018b: pp. 104-112).

### **1.2.10 Importancia**

La actividad antimicrobiana del propóleo ha justificado su uso medicinal durante siglos, varios estudios han demostrado su ventaja como antiinflamatorio, anti ulceroso, antitumoral, inmunoestimulante, hepatoprotector, antibacteriano, antimicótico y potencial contra los protozoos. Hoy en día, es utilizado como un ingrediente activo en la dieta suplementos y formulaciones cosméticas (Cuesta Rubio, et al., 2017b: pp. 177-183).

### ***1.2.11 Usos***

En diversos países del mundo el propóleo es usado en afecciones estomatológicas tales como: cirugía bucal, endodoncia, periodoncia y patología oral entre otras. El extracto de propóleo al 10% es usada para la hiperestesia dentinaria, odontalgias, sedante pulpar, desinfección de las manos y recubrimiento pulpar directo o indirecto (Souto Román , et al., 2016c: pp. 83-94).

Gracias al conocimiento mundial de las bondades terapéuticas del propóleo su demanda ha incrementado; tomando gran fuerza en el mercado como materia prima tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica, han incorporado al propóleo en productos como: caramelos, tinturas, chicles, jabones, lociones, ungüentos, pastillas, sales de baño, vinos, polvos, champús, cremas, bebidas, etc. El principal exportador de propóleo es Estados Unidos, seguido por Alemania y Francia (Rojas Silva, et al., 2016b: pp. 3-16).

### ***1.2.12 Método de recolección de propóleo bruto por mallas y rejillas plásticas***

Las mallas y rejillas plásticas son dispositivos plásticos que presentan orificios de diferentes tamaños los cuales se colocan debajo de la tapa de la colmena, después de cierto tiempo son retirados y congelados para la recolección (Thimann & Manrique, 2002, p. 2).

### ***1.2.13 Buenas prácticas de cosecha del propóleo Bruto***

Para obtener un producto de calidad es conveniente aplicar buenas prácticas de manufactura, iniciando con la cosecha de propóleo bruto. La norma Salvadoreña, 2003 (Anexo 1) establece este procedimiento que se describe a continuación:

- 1) El apicultor que va realizar la cosecha de propóleo, debe encontrarse en óptimas condiciones de salud.
- 2) Antes de la recolección, el apicultor deberá lavarse las manos con agua y jabón y de ser posible usar guantes limpios.
- 3) El propóleo deberá ser recolectado de colmenas que no hayan sido sometidas a tratamientos, antibióticos y acaricidas químicos. De ser necesario un tratamiento veterinario, se debe recolectar primero el propóleo y después realizar el tratamiento.

- 4) Cuando se recolecte el propóleo por el método del raspado, se deberá usar espátulas de acero inoxidable. Evitando en el momento de raspar el propóleo, incorporar partículas de pintura y restos de madera.
- 5) Cuando el propóleo sea recolectado por el método de mallas o rejillas de polietileno, se debe evitar fuentes de contaminación en la extracción y en la refrigeración, además indica que no se debe utilizar rejillas o mallas metálicas.
- 6) Para el almacenamiento de propóleo en el apiario, se debe utilizar bolsas plásticas de polietileno transparente o envases de vidrio o plástico liso para evitar la adherencia del pigmento.
- 7) Se debe evitar en lo posible que el propóleo cosechado, no se mezcle con sustancias extrañas tales como restos de madera, abejas, miel, tierra, etc.
- 8) Para el transporte fuera del apiario, se lo debe colocar en un embalaje que evite la exposición directa al sol y lo proteja de altas temperaturas que no deben sobrepasar los 40 °C. (NORMA SALVADOREÑA, 2003b: pp. 9-10)

#### ***1.2.14 Buenas Prácticas en el almacenamiento de propóleo bruto***

La norma Salvadoreña 2003 en el Anexo 1 establece las siguientes especificaciones para el almacenamiento de propóleo bruto.

- a) No se permitirán comer, beber, fumar y/o estornudar, durante el procedimiento.
- b) El operador deberá lavarse las manos cada vez que se incorpore a la actividad.
- c) Se utilizaran una superficie limpia y diseño sanitario adecuado y apropiado para evitar la adherencia de partículas, durante la manipulación del propóleo bruto.
- d) Las partículas extrañas deberán separarse del propóleo por medios mecánicos como pinzas.
- e) El propóleo se almacena en recipientes o envases limpios de material y diseño sanitario adecuado.
- f) Agregar lavado al propóleo cosechado. (NORMA SALVADOREÑA, 2003b: pp. 9-10)

#### ***1.2.15 Calidad del propóleo***

La Norma NT INEN 2794 para PRODUCTOS DE APICULTURA .PROPOLEO indica los requisitos que debe cumplir el propóleo para ser considerado de calidad en base a características organolépticas y físico-química.

La tabla 3-1, establece los requisitos que debe cumplir el propóleo para ser considerado de calidad, en base a la norma Rusa, Cubana, Salvadoreña y Argentina.

**Tabla 3-1:** Características de calidad del propóleo.

CARACTERÍSTICAS GENERALES PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PROPÓLEOS	
Características organolépticas	Consideraciones
Aroma	Inodoro, resinoso suave, aromático o balsámico
Color	Amarillo, café, verde, rojo y gris, y sus tonalidades
Sabor	Picante, dulce, amargo e insípido
Consistencia a temperatura ambiente	Muy blanda, blanda, dura, poco dura, pegajosa y porosa
Aspecto	Homogéneo o heterogéneo
Características físicas y químicas	
Extracto seco	Mínimo 10%
Índice de oxidación	Máximo 22 segundos
Compuestos fenólicos (mg AG/ml)	Mínimo 0.25-5%
Flavonoides	Mínimo 0.25-0.5%
Espectrograma UV-VIS	Máximo de absorción entre 270 y 315 nm
Metales pesados: plomo y arsénico	Máximo 2mg·kg <sup>-1</sup> y 1mg·kg <sup>-1</sup> , respectivamente
Residuos de plaguicidas y antibióticos	Ausente
Humedad	Máximo 8%
Cenizas	Máximo 5%
Cera	Máximo 30%
Impurezas mecánicas	25-30%
Índice de yodo	Mínimo 35%
Solubilidad en etanol	30-35%
Características microbiológicas	
Bacterias mesófilas (UFC/g)	<10,000
Coliformes fecales (UFC/g)	0
Coliformes totales (UFC/g)	<100
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	100
Hongos (UFC/g)	1-1000

Fuente: (Vargas Sanchez, et al., 2013, p. 707)

### 1.3 *Azadirachta indica* (Neem)

Su nombre científico es *Azadirachta indica*, es conocida comúnmente como Margosa, Nim, Neem, Bastardo, Talón, Lila India, Lila Persa, Cornucopia, y/o Cedro Indio. Es un árbol nativo de la India y de Birmania (Rúa, 2017, p. 1).

### 1.3.1 Clasificación Botánica

**Tabla 4-1:** Clasificación botánica de *Azadirachta indica*.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Sub-Reino</b>	Viridaeplantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Sub-Clase</b>	Magnoliidae
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Familia</b>	Meliaceae
<b>Genero</b>	Azadirachta
<b>Especie</b>	Indica

Fuente: (Rúa, 2017, p. 1)

Realizado por: Pilar Minta

### 1.3.2 Descripción botánica de *Azadirachta indica*.

*A.indica* es un árbol de tamaño pequeño a mediano (15 a 30 m máximo de altura), posee un tronco corto y recto, de hoja perenne generalmente, con una corona redonda y grande. Las flores aparecen en panículas estrechas y ramificadas de 5 a 15 cm de largo, las flores individuales están compuestas de 5 lóbulos de cáliz redondeados y de un color pálido. Los frutos son drupas de 1.0 a 2.0 cm de largo, lisas y de un color de amarillo verdoso a amarillo cuando maduran (Rúa, 2017, pp. 1-7).

### 1.3.3 Propiedades

Las flores, hojas, semillas de *Azadirachta inidca* han sido usadas desde la antigüedad para curar múltiples enfermedades humanas agudas y crónicas, entre las que se destacan el cáncer, la diabetes, la enfermedad de Parkinson, la aterosclerosis y la hipertensión, gracias a sus múltiples propiedades tales como: anti-inflamatorias, antipiréticas, fungicidas, antihistamínicas y antisépticas. Se conoce que *Azadirachta indica* (Neem) modula diferentes vías celulares (Chandra Gupta , et al., 2017a: pp. 14-20).

Las propiedades de *A. indica* se atribuye a más de 300 constituyentes estructuralmente diversos, un tercio de los cuales son limonoides incluyendo nimbolide, azadarachtin, y gedunina (Chandra Gupta , et al., 2017b: pp. 14-20) .

#### **1.3.4 Composición**

Los extractos etanólicos al 50% de hojas de *A. indica* (Neem) mostraron presencia de saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, alcaloides, glucósidos, proteínas, triterpenoides, hidratos de carbono y alcaloides. Estudios fotoquímicos indican que en las hojas secas pulverizadas de *A.indica* se encuentran el 5,33%, 1,03% y 1,83% de flavonoides, fenoles y taninos respectivamente. (Pandey, et al., 2014a: p. 446). La corteza contiene 3.43% de proteína, 0,68% de alcaloides y 4,16% de minerales (Al Akeel , et al., 2017, p. 13) .

#### **1.3.5 Usos**

*Azadirachta indica* ha sido reverenciado en la India desde hace mucho tiempo, por siglos han limpiado sus dientes con sus ramas, curaban trastornos de la piel con el jugo de las hojas, han tomado su té de como tónico y como remedio contra varias enfermedades de la piel etc. (Pandey, et al., 2014b: p. 446).

Diversas partes de la planta son usadas para tratar afecciones estomacales ejerciendo efectos de tónico estomacal, purgante, antiemético, antiparasitario etc. La corteza de la planta es usada para tratar enfermedades de la piel y la fiebre. (Rúa, 2017, p. 6)

Es usado como pesticida en ganadería, agricultura y jardinería presentando efecto sobre plagas, ácaros, nematodos, insectos debido a su extracto amargo. También es usado en la crianza de animales de granja como alimento. (Rúa, 2017, p. 8)

#### **1.3.6 Actividad antibiótica**

El aceite de las hojas, semillas y corteza posee un amplio espectro de acción antibacteriana contra las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo *M. tuberculosis*, *Vibrio cholerae*,



*Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *M. pyogenes*, *S. mutans* y *S. faecalis* (Pandey, et al., 2014c: pp. 444-447).

Pandey, et al., 2014 en su estudio sobre las hojas de *A. indica* encontró que esta tiene una acción inhibitoria interesante sobre un amplio espectro de microorganismos incluyendo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *S. aureus* resistente a múltiples fármacos, *E. coli* y herpes simple (Pandey, et al., 2014d, pp. 445).

### **1.3.7 Actividad antimicótica**

El aceite de las semillas de *A. indica* posee el principio activo Gedunin, que ha sido reportado tanto anti fúngica como antipalúdica. Los extractos de hojas, aceite y semillas son efectivos contra ciertos hongos humanos, incluyendo *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichosporon*, *Geotricum* y *Cándida* (Pandey, et al., 2014e: pp. 445-447) .

En un estudio realizado por (Pandey, et al., 2014) indicó que en el extracto de las hojas de *A. indica* (Neem) había un efecto característico sobre los dermatofitos especialmente los extractos de alta polaridad. El autor sugirió que dicho efecto se explica por la quercetina contenida en el extracto (Pandey, et al., 2014f: pp. 445-447).

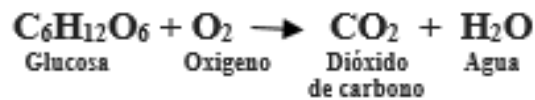
## **1.4 Fermentación**

Desde el punto de vista bioquímico la fermentación es definida como un proceso a través del cual el sustrato sufre una serie de reacciones de oxidación y reducción que producen energía, que es utilizada en el metabolismo de los microorganismos (Hernández, et al., 1998a: pp. 37).

Un ejemplo de fermentación desde el punto de vista bioquímico es la producción de etanol y dióxido de carbono a partir de glucosa (Hernández, et al., 1998b: pp. 38).



Desde el punto de vista microbiológico la fermentación es un proceso en el que los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de sustancias orgánicas en ausencia o presencia de oxígeno. Donde el sustrato se descompone por la actividad de enzimas microbianas (Hernández, et al., 1998c: pp.38).



Un proceso fermentativo en práctica, consta de tres etapas: preparación del inóculo, selección del medio de cultivo y la producción de biomasa o metabolito de interés (Hernández, et al., 1998d: pp. 38).

#### ***1.4.1 Fermentación aerobia***

En este tipo de fermentación el aceptor final de electrones es el oxígeno, ya que juega un papel imprescindible para el desarrollo de microorganismos y para la producción del compuesto deseado. En este proceso se forma básicamente biomasa, dióxido de carbono y agua (Hernández, et al., 1998e: p. 38).

#### ***1.4.2 Fermentación anaerobia***

En este proceso la formación del metabolito de interés se produce en ausencia de oxígeno dando como productos finales compuestos orgánicos. No obstante la mayoría de las fermentaciones anaeróbicas necesitan un poco de oxígeno al principio del proceso para favorecer el crecimiento y reproducción del microorganismo (Hernández, et al., 1998f: p. 38).

Durante la fermentación anaerobia los microorganismos producen menos energía que los procesos aerobios por lo que para suplir estas necesidades de energía, metabolizan una mayor cantidad de azúcares por ende, elaboran más metabolitos (Corrales, et al., 2015a: p. 61).

#### ***1.4.3 Fermentación alcohólica***

La fermentación alcohólica constituye un proceso biológico que es llevado a cabo en ausencia de oxígeno por algunos microorganismos, a partir de azúcares de tipo hexosa como: glucosa, fructosa

y sacarosa dando lugar a la producción de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y una molécula de ATP que consumido por los microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Corrales, et al., 2015b: p. 61).

## **1.5 Levaduras**

Las levaduras son hongos unicelulares, incluyen especies inocuas y de gran utilidad así como también patógenas para animales y plantas. Constituyen los microorganismos más importantes desde el punto de vista industrial, ya que muchas de las especies pueden convertir azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono. Son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa (Carrillo, et al., 2007, pp. 40-46).

Las levaduras son microorganismos eucariotas aerobios, muchos de sus géneros son fermentadores pero otras como los *Criplococcus* y *Rhodotorula* no lo son. Las levaduras por lo general forman colonias pastosas, constituidas en su mayoría por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoides o alargadas. (Carrillo, et al., 2007, pp. 40-46)

### **1.5.1 *Sacharomyces***

Las especies del género *Saccharomyces*, son fermentadores de azúcares bajo condiciones anaeróbicas, obtienen energía a partir de la glucosa. Se encuentran en plantas, tierra, así como del tracto gastrointestinal y genital humano (Carrillo, et al., 2007, pp. 40-46).

#### **1.5.1.2 *Sacharomyces cerevisiae***

Es una levadura unicelular cuyo nombre se deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es una levadura que tiene una nutrición heterótrofa, que utiliza como fuente de energía la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa (Suàrez Machìn & Garrido Carralero, 2016a: pp. 20-28).

### 1.5.1.3 Morfología macroscópica y microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*

La forma de las células de *Saccharomyces cerevisiae* puede ser esférica, elipsoidal, cilíndrica o sumamente alargada, en grupos de dos, cadenas cortas o racimos o bien sin agruparse; pueden o no formar pseudomicelio. La apariencia macroscópica de las colonias es muy diversa de color crema a ligeramente café, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas, brillantes u opacas. Esporulan formando de una a cuatro ascosporas de forma redonda a ligeramente elipsoidal. Pueden fermentar y asimilar glucosa, sacarosa, maltosa y galactosa, pero no puede fermentar y asimilar lactosa, no utilizan nitrato como fuente de Nitrógeno (Suárez Machin & Garrido Carralero, 2016b: pp. 20-28).

### 1.5.1.4 Fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*

Un proceso de fermentación puede ser manipulado, a través de la cantidad de oxígeno, para incrementar la sustancia de interés. Cuando se trabaja con un microorganismo facultativo como *S.cerevisiae* se obtiene productos mayoritarios en dependencia de la concentración de oxígeno en el medio, cuando la concentración es muy limitada, habrá una producción mayor de etanol, si por lo contrario la concentración es alta, se favorece la reproducción del microorganismo es decir la producción de biomasa (Suárez Machin & Garrido Carralero, 2016c: pp. 20-28).

## 1.6 Caries dental

La caries dental es una enfermedad crónica, infecciosa, multifactorial y transmisible, muy prevalente durante la infancia. Esta enfermedad por su magnitud y trascendencia constituye un importante problema de salud pública. Suele aparecer en los niños y en los adultos jóvenes, pero puede afectar a cualquier persona (Gonzalez, et al., 2014, p. 2).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la caries dental es un proceso localizado que se inicia después de la erupción dentaria, provocando el reblandecimiento del tejido duro del diente que evoluciona hacia la formación de una cavidad (Miñana, 2011, pp. 436-437) .

## 1.7 Pasta dental

La normativa técnica ecuatoriana NT INEN 1602 define la pasta dental como un dentífrico que se presenta en forma de una masa suave, semisólida y homogénea, que contiene agentes abrasivos,

agentes tensoactivos, humectantes, agentes aglutinantes y otras sustancias apropiadas para mantener la salud oral. Entendiéndose por dentífrico toda sustancia o combinación de sustancias destinadas para limpieza de los dientes y las encías (NT INEN 1602, 2014).

### ***1.7.1 Características de las pastas dentales.***

Para ser considerado un dentífrico de calidad deber reunir las siguientes características :

- Al usarlo de la forma adecuada debe limpiar los dientes eliminando los restos de alimentos, placa y manchas.
- Debe dejar en la boca una sensación de frescura y limpieza.
- Su coste debe permitir su uso regular.
- Debe ser inocuo y agradable para su uso.
- Debe cumplir con los requerimientos en cuanto a su abrasividad para el esmalte y la dentina.
- Debe tener un efecto profiláctico (Muñoz Sánchez, 2000a: pp. 2-3).

### ***1.7.2 Función de las pastas dentales.***

Los dentífricos o pastas dentales tienen como función básica la higiene bucal a través de las siguientes funciones:

- Ayudar al cepillo dental a remover los depósitos que se acumulan sobre las superficies de los dientes , ayudando a eliminar de la placa dental, protege las encías y ayudan a mantener un aliento agradable en la cavidad oral, este proceso de limpieza es realizado por fricción, arrastrado y eliminando la placa bacteriana que se encuentra sobre el diente.
- Vehiculizan a las superficies de los diferentes compuestos con una acción terapéutica específica (Muñoz Sánchez, 2000b: pp. 2-3).

### ***1.7.3 Norma para pastas dentales (NT INEN 1602)***

La norma técnica ecuatoriana NT INEN 1602 establece los requisitos que debe cumplir la pasta dentífrica para ser considerada de calidad, los mismos que están enmarcados en los aspectos esenciales de composición y calidad, concentración de fluoruro permitido, contaminantes y aspectos microbiológicos (NT INEN 1602, 2014, pp. 2-3) .

#### 1.7.4 Composición de las pastas dentales.

La pasta dentífrica presenta una consistencia cremosa, compuesta de diferentes sustancias, con el objetivo de la eliminación de la placa dental. Un dentífrico está constituido básicamente por los agentes abrasivos, humectantes, espumantes, aglutinantes, saborizantes y conservantes. Las formulaciones destinadas para el tratamiento o prevención de problemas bucales incorporan en su formulación ingredientes activos (Rosales Contreras, et al., 2014, pp. 114-119). En la tabla 4-1 se describe la composición básica de una pasta dental.

**Tabla 5-1:** Componentes de las pastas dentales.

<b>Ingredientes</b>	<b>Composición porcentual (%)</b>
Abrasivos	20 a 40
Agua	20 a 40
Humectantes	20 a 40
Espumantes	1 a 2
Aglutinantes	hasta 2
Saborizante	hasta 2
Edulcorante	hasta 2
Agente terapéutico	hasta 5
Colorante o conservador	menos de 1

**Fuente:** (García Godoy & Harris, 2006)

**Realizado por:** Pilar Minta, 2018

A continuación se describe la función de cada ingrediente:

##### a) Abrasivos

Los abrasivos son utilizados en la fórmula dentífrica para la remoción de manchas externas sobre la superficie del diente. Los elementos químicos que se utilizan como abrasivos son: sílice, óxido de aluminio, carbonato de calcio y fosfatos de calcio, entre otros. Los abrasivos forman parte de los dentífricos de un 20 a 40 % y, su abrasividad se mide en unidades del índice RDA (Abrasión Relativa Dentinaria), de manera que 40 RDA es una abrasión suave, 120 normal, 170 media y 250 RDA una abrasión fuerte. Es importante el tamaño de partícula del abrasivo seleccionado para evitar la sensación arenosa en el cepillado. Un tamaño de partícula medio aconsejado sería

de 15  $\mu\text{m}$ . El efecto limpiador del abrasivo también depende de la forma y dureza de sus partículas (Muñoz Sánchez, 2000c: pp. 2-3).

b) Humectantes

Los humectantes tienen como función evitar la pérdida de agua y mantener la estructura de otros componentes que le dan cuerpo a la pasta, para prevenir su disociación. Los humectantes más usados son la glicerina, sorbitol y el agua (Muñoz Sánchez, 2000c: pp. 2-3).

c) Espumantes

Ayudan a crear una suspensión estable del abrasivo en la boca, a la vez que proporcionan una agradable sensación durante su uso y los más utilizados son el lauril sulfato sódico, ricinoleato sódico y sulforicinoleato sódico (Muñoz Sánchez, 2000d: pp. 2-3)

d) Aglutinantes o espesantes

Los aglutinantes mantienen la suspensión estable y aumentan la viscosidad de la pasta y mantiene unidas las partículas del abrasivo. Se utilizan sobre todo la carboximetilcelulosa sódica, la metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, alginatos, carregenatos, goma xantana (Rosales Contreras, et al., 2014).

e) Saborizantes:

Los saborizantes son muy importantes en las formulaciones destinados a los niños, para estimular su aceptación como la menta y otros edulcorantes artificiales como el xilitol, el sorbitol y la sacarina (Muñoz Sánchez, 2000f: pp. 2-3).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÒGICO

Metodológicamente la presente investigación se ejecutó progresivamente a través de las siguientes fases:

- Monitoreo y asesoramiento de la recolección del propóleo crudo en tres apiarios de ASOPROACH.
- Obtención de extracto blando activo de propóleo estabilizado.
- Ejecución de la evaluación de la actividad antimicótica del propóleo sobre *S. cerevisiae* por el método de macro dilución en caldo.
- Diseño de un método de campo para apicultores que evalúe la actividad antimicótica del propóleo sobre *S. cerevisiae*.
- Diseño de un método de campo para apicultores que evalúe actividad antibiótica del propóleo en la leche cruda doblemente desnatada.
- Análisis de *Aerobios mesófilos* en muestras fermentadas del método de campo.
- Elaboración de una pasta dental con propóleo blando activo asociado a los beneficios reportados para *Azadirachta indica* (Neem).
- Socialización a ASOPROACH del proceso de obtención del extracto blando de propóleo, métodos de campo para la evaluación antimicótico y antibiótico del propóleo y elaboración de la pasta dental.

#### 2.1 Lugar de investigación

La investigación se realizó en los laboratorios de: Microbiología, Alimentos, Análisis Instrumental y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, localizado en la provincia Chimborazo, cantón Riobamba, dentro del Grupo de Investigación SAGID en el marco del proyecto interinstitucional titulado “ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO,(ASOPROACH) PARA DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO”.



## **2.2 Tipo de investigación**

La temática de la investigación encaja en un tipo de investigación experimental al analizar efectos como la actividad antibiótica y antimicótica del propóleo obtenido, al manipular variables como: concentración del propóleo, concentración del extracto de *Azadirchta indica* (Neem) tanto en la obtención del propóleo activo como en la elaboración de la pasta dental.

## **2.3 Fases ejecutadas en la investigación.**

### ***2.3.1 Monitoreo, asesoramiento de la recolección del propóleo crudo.***

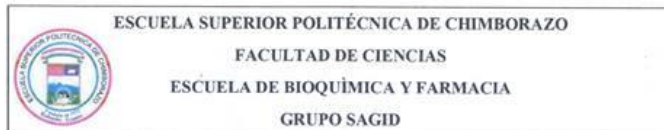
1. Selección de los apicultores proveedores de propóleo crudo.

Para la selección de los apicultores y sus apiarios proveedores de propóleo crudo, se realizó un muestreo por conveniencia, basado en tres aspectos: que sea socio de ASOPROACH, que garantice cierta limpieza y que tengan un modo de recolección común basado en mallas plásticas o trampas de propóleo. Los apicultores y sus apiarios geográficamente pertenecieron a los alrededores del cantón Riobamba. En esta zona existe un predominio en flora de *Eucalyptus globulus*, que se identifica como fuente de polen para *A.mellifera*.

2. Monitoreo de la recolección de propóleo crudo.

Se visitaron algunos apicultores y sus apiarios seleccionando a tres de ellos según las especificaciones descritas en 2.3.1.

Los aspectos sujetos a monitoreo fueron en base al cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura en la recolección de propóleo descritas en la Norma Salvadoreña 2003 a través de una lista de control que se aprecia en la Figura 1-2.



**Proyecto:** ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACION DE PRODUCCION APICOLA DE CHIMBORAZO,(ASOPROACH) PARA DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO”.

**Trabajo De Titulación:** “DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA Y ANTIMICÓTICA PARA PROPOLEOS Y SU UTILIZACIÓN ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (NEEM) PARA LA ELABORACIÓN DE UNA PASTA DENTAL.”

**EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE BPMs EN LA RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE PROPOLEO BRUTO POR PARTE DE UN APICULTOR DE ASOPROACH.**

Nombre del apicultor proveedor:

Fecha:

Método de recolección de propóleo:

Nº	BPMs para la cosecha y almacenamiento de propóleo bruto.	CUMPLIMIENTO	
		SI	NO
1	Antes de la recolección el apicultor se encuentra en óptimas condiciones de salud.		
2	Antes de la recolección el apicultor se lava las manos con agua y jabón.		
3	Para la recolección de propóleo, el apicultor usa guantes limpios.		
4	El apicultor recolecta el propóleo en colmenas que no han estado sometidas a tratamientos con antibióticos ni acaricidas químicos.		
5	El apicultor evita las fuentes de contaminación en la extracción y en la refrigeración del propóleo cuando se recolecta a través del método de mallas o rejillas de polietileno.		
6	El apicultor no utiliza rejillas o mallas metálicas para la recolección del propóleo.		
7	Durante el acopio del propóleo en el apiario, el apicultor utiliza bolsas plásticas de polietileno transparente (natural) o envases de vidrio o plástico liso para evitar la adherencia de pigmentos.		
8	El apicultor procura que el propóleo cosechado no se mezcle con sustancias extrañas a él, tales como restos de madera, abejas, miel, tierra, etc.		
9	El apicultor no come, bebe, fuma y/o estornuda, durante el procedimiento.		
10	El apicultor se lava las manos cada vez que se incorpora a la actividad.		
11	El apicultor utiliza una superficie limpia y diseño sanitario adecuado y apropiado para evitar la adherencia de partículas, durante la manipulación del propóleo bruto.		
12	El apicultor separa las partículas extrañas del propóleo por medios mecánicos (pinzas, etc)		
13	El apicultor almacena el propóleo en envases o recipientes limpios de material y diseño sanitario adecuado		
14	El apicultor lava el propóleo cosechado.		

Firma:.....

**Figura 1-2:** Lista de control.

**Fuente:** (NORMA SALVADOREÑA, 2003)

**Realizado por:** Pilar Minta,2019

### 3. Asesoramiento

Para el asesoramiento al apicultor, se evaluó la lista de control aplicada y se comunicó al apicultor las deficiencias observadas en el proceso de recolección de propóleo crudo, para que tome las acciones correctivas pertinentes.

### 2.3.2 Obtención del extracto blando activo de propóleo estabilizado.

#### 2.3.2.1 Materiales, equipos y reactivos

**Tabla 1-2:** Materiales, equipos y reactivos para la obtención del extracto blando activo de propóleo estabilizado.

<b>MATERIAL</b>	<b>EQUIPOS</b>	<b>REACTIVOS</b>
Frasco de vidrio ámbar	Balanza analítica	Etanol al 95 %
Embudo	Rota vapor marca Büchi	Propóleo crudo
Papel Filtro	Refrigerador	Agua destilada
Embudo	Sonnicador	
Balón esmerilado de 250 mL	Licuadaora	
Probeta de 100 mL		
Vasos de precipitación de 250 mL		
Bisturí		
Fundas ziploc		

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019

#### 2.3.2.2 Recolección y elaboración de una muestra experimental del propóleo crudo.

1. El propóleo fue recolectado progresivamente de tres apiarios diferentes de ASOPROACH, situados en las parroquias de Licto y Licán del cantón Riobamba, a lo largo del periodo Diciembre 2017 -Abril del 2018



**Fotografía 1-2:** Propóleo crudo.

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019

2. En el momento pertinente se formó una muestra experimental de la mezcla de tres propóleos en las cantidades siguientes :

**Tabla 2-2:** Peso del propóleo crudo recolectado por proveedor.

<b>Apicultor Proveedor</b>	<b>Peso del propóleo crudo (gramos)</b>
1	75
2	150
3	525
Peso total del propóleo crudo utilizado	750

**Fuente:** Laboratorio de alimentos.

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019

3. La muestra experimental fue almacenada y conservada a 15 °C en una funda ziploc.

### *2.3.2.3 Acondicionamiento del propóleo crudo para la obtención del extracto blando de propóleo.*

Para el acondicionamiento del propóleo se ejecutó el siguiente procedimiento:

1. Limpieza

Eliminar manual y visualmente materias extrañas en el propóleo crudo (restos de abejas, residuos de tierra etc.)

2. Cuarteo

Fraccionar los trozos de propóleo homogéneamente a tamaño aproximado de 5 mm utilizando un bisturí.

3. Lavado

Lavar los trozos de propóleo agitando en agua destilada por 5 minutos. Posteriormente realizar dos lavados muy rápidos con etanol al 95 % y luego colocar sobre papel adsorbente con el objetivo de absorber restos de agua y etanol.

4. Congelamiento del propóleo lavado y seco para pulverización posterior.

Enfriar hasta congelamiento (-6 °C) el propóleo seco dentro de una funda ziploc por 24 horas.

5. Troceado del propóleo congelado y seco

Una vez congelado el propóleo buscar pulverizarlo utilizando una licuadora, y almacenarlo en una funda hermética en refrigeración para el momento de extracción del propóleo blando.

#### 2.3.2.4 *Obtención del extracto blando de propóleo*

1. Pesar 750 gramos de propóleo crudo pulverizado en una balanza y disolver en 2500 mL de etanol al 95 %.
2. Macerar el extracto por 15 días con agitación constante y luego sonnicar el macerado por 1 hora.
3. Filtrar el extracto alcohólico de propóleo con papel Whatman N°4, dejar reposar por 24 horas en refrigeración y volver a filtrar.
4. Eliminar el solvente con un rotavapor marca Büchi a 40°C a presión reducida hasta la eliminación completa del solvente.
5. Pesar el extracto blando de propóleo obtenido.
6. Calcular el rendimiento del propóleo blando a través de la siguiente formula:

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

Donde;

P = Peso del extracto blando en gramos.

m=Peso del propóleo crudo en gramos.

7. Almacenarlo en un frasco ámbar y en refrigeración a 5 °C.

#### 2.3.2.5 *Control de calidad físico químico del extracto blando de propóleo.*

El control de calidad del extracto blando de propóleo se realizó en base a la norma ramal NRSP 312 del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP, 1992). Para evaluar los parámetros físico-químicos de extractos etanólicos (Ochoa Pacheco, et al., 2013a: pp. 52-54).

##### *a) Determinación de pH (NRSP 312).*

Permite determinar la acidez o alcalinidad del extracto mediante la medición de la concentración de iones hidrogeno e hidroxilos presentes en el extracto. (Ochoa Pacheco, et al., 2013a: p. 54)

## Procedimiento

1. Encender el pH metro y calibrar.
2. Ajustar el electrodo a un pH de 7 e introducir en la muestra, evitando que el electrodo toque las paredes del vaso.
3. Esperar que se estabilice, realizar la lectura y registrar.

### b) *Densidad relativa (NRSP 312).*

#### Procedimiento:

1. Pesar el picnómetro vacío, limpio y seco.
2. Llenar el picnómetro con el extracto evitando la formación de burbujas de aire.
3. Extraer el exceso de muestra con una tira de papel filtro.
4. Mantener el picnómetro con la muestra a 25 °C durante 30 minutos
5. Al cabo del tiempo tapar y se secar exteriormente evitando transmitir el calor de la mano.
6. Pesar el picnómetro con la muestra.
7. Vaciar el picnómetro, lavar con alcohol etílico y posteriormente con agua destilada.
8. Pesar el picnómetro con agua destilada a 25 °C (Ochoa Pacheco, et al., 2013b: p. 54).
9. Calcular la densidad con la siguiente formula:

$$D = \frac{M1 - M}{M2 - M}$$

Donde;

M1 = peso del picnómetro con la muestra en g.

M2 = peso del picnómetro con el agua destilada a 25°C en g.

M = peso del picnómetro vacío en g.

### c) *Índice de Refracción (NRSP 312).*

## Procedimiento

1. Colocar una gota del extracto sobre el prisma del refractómetro,
2. Ajustar inmediatamente el prisma móvil hasta iluminación adecuadamente el campo de visión.
3. Llevar la línea que divide las partes claras y oscuras de la superficie en el campo de visión hasta el cruce de las líneas diagonales.
4. Realizar la lectura y registrar

d) *Determinación de las características organolépticas del extracto blando de propóleo (NRSP 312).*

1. Determinación del olor: Colocar una tira de papel secante de 1cm de ancho por 10 cm de largo en el extracto. Olfatear y determinar si corresponde con las características del producto (Ochoa Pacheco, et al., 2013c: p. 54).
2. Determinación del color: Llenar un tubo de ensayo hasta las tres cuartas partes del tubo con la muestra y observar, el color, la transparencia y la presencia de partículas (Ochoa Pacheco, et al., 2013d: p. 54)

### **2.3.3 *Evaluación de la actividad antimicótica del extracto alcohólico de propóleo sobre S. cerevisiae por el método de macro dilución en caldo.***

La evaluación de la actividad antimicótica permitirá determinar la concentración de extracto que se utilizará en el método de campo de evaluación antibiótica, antimicótica y en la formulación de la pasta dental.

La evaluación de la actividad antimicótica se realizó por el método de macro dilución en caldo descrito en el Manual de Procedimientos en microbiología sobre los métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos. (Picazo, 2001, pp. 21-22).

2.3.3.1 *Materiales, equipos y reactivos.*

**Tabla 3-2:** Materiales, equipos y reactivos para la ejecución de la evaluación de la actividad antimicótica del propóleo sobre *S.cerevisiae*.

Materiales	Equipos	Reactivos
Cajas Petri	Incubadora microbiológica	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
Gradilla	Autoclave	Agar Saboraud –Cloranfenicol
Tubos de ensayo	Balanza analítica	Solución fisiológica al 0.9%
Papel Aluminio	Cámara de flujo laminar.	Etanol al 95 %
Asa de vidrio		Extracto estándar de propóleo de 100 mg/mL.
Micropipetas de 1000 uL y 10 uL		Peptona, extracto de levadura, glucosa, cloruro de sodio.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

2.3.3.2 *Determinación de la concentración mínima inhibitoria del propóleo sobre S. cerevisiae por el método de macro dilución en caldo.*

La Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas.

2.3.3.3 *Actividad antimicótica del extracto alcohólico de propóleo.*

Para la valoración de la actividad antimicótica del propóleo, se emplearon 6 réplicas con 3 repeticiones de 6 tratamientos que se resumen en la tabla 4-2. Esta definición será utilizada tanto para la valoración del propóleo como para el etanol.

**Tabla 4-2:** Diluciones de propóleo y etanol al 95 %.

Tratamiento	Concentración propóleo (mg/mL)	Diluciones para propóleo																		Concentración etanol (%)	Diluciones para etanol																				
		Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3			Réplica 4			Réplica 5			Réplica 6				Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3			Réplica 4			Réplica 5			Réplica 6					
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
T <sub>1</sub>	50																																								
T <sub>2</sub>	25																																								
T <sub>3</sub>	12,5																																								
T <sub>4</sub>	6.25																																								
T <sub>5</sub>	3.12																																								
T <sub>6</sub>	1.52																																								

E: Etanol R: Repetición

Realizado por: Pilar Minta, 2019



Las concentraciones definidas de propóleo y etanol se consiguen preparando diluciones seriadas de orden 1: 2 que permitirán valorar la actividad antimicótica del propóleo.

#### Preparación de batería de dilución para propóleo

1. Preparar una batería de 8 tubos para el propóleo.
2. Colocar en cada tubo un mililitro de caldo nutritivo. Ver preparación en (\*)
3. Añadir al primer tubo 1mL de extracto estandarizado de propóleo de 100 mg/mL y homogenizar, de este tomar 1 mL y añadir al siguiente tubo y homogenizar; así sucesivamente realizar diluciones hasta el tubo 6, y desechar 1 mL de este último. Ver preparación del extracto estandarizado en (\*\*). Las concentraciones de propóleo en estudio, se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 5-2:** Batería de dilución y su equivalente en concentración del extracto de propóleo.

Batería de dilución de propóleo		
Tubos	Dilución	mg/mL
Solución madre	1	100
1	½	50
2	¼	25
3	1/8	12.5
4	1/16	6,25
5	1/32	3,12
6	1/64	1.6
7	Control de viabilidad del microorganismo .( 1ml de caldo + inóculo)	
8	Control de esterilidad del caldo. (1mL de caldo)	

Realizado por: Pilar Minta.2019

4. Utilizar el tubo 7 como control de viabilidad del microorganismo (1mL de caldo + inóculo).
5. Utilizar el tubo 8 como control de esterilidad del caldo (1 mL de caldo) completando así los 8 tubos.
6. Inocular las 6 diluciones y el control de viabilidad, con 100 µL de inóculo estandarizado a la concentración del tubo 1 de la escala MacFarland, equivalente a  $3.0 \times 10^8$  UFC/ mL .Ver preparación del inóculo en (\*\*\*)
7. Homogenizar los tubos e incubar a 29°C por 24 horas.
8. Al término de la incubación, tomar 10 µL de cada tubo y sembrar en placas de agar saboraud-cloranfenicol, mediante la técnica de extensión en superficie.
9. Incubar las placas durante 24 horas, a 29 °C.

10. Realizar la inspección visual del número de UPC de levaduras de cada placa al término de la incubación.
11. Interpretar y determinar la concentración mínima inhibitoria, como la concentración mínima de propóleo, donde existe el menor crecimiento visible de UPC de levaduras, después del periodo de incubación.

Para descartar la actividad antimicótica del etanol al 95 % utilizado como solvente del extracto de propóleo, se preparó una batería de diluciones seriadas de orden 1:2 que se describen a continuación:

12. Preparar una batería de 8 tubos para el etanol.
13. Colocar en cada tubo un mililitro de caldo nutritivo. Ver preparación en (\*)
14. Añadir al primer tubo 1mL etanol al 95 % y homogenizar, de este tomar 1 mL y añadir al siguiente tubo y homogenizar; así sucesivamente realizar diluciones hasta el tubo 6, y desechar 1 mL de este último, para descartar la actividad antimicótica del etanol. Las concentraciones de etanol en estudio, se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 6-2:** Batería de dilución y su equivalente en concentración de etanol.

<b>Batería de dilución etanol 95 %</b>		
<b>Tubos</b>	<b>Dilución</b>	<b>%</b>
Solución madre	1	95
1	½	47,5
2	¼	23,2
3	1/8	11,51
4	1/16	5,5
5	1/32	2,5
6	1/64	1,25
7	Control de viabilidad del microorganismo. ( 1ml de caldo + inóculo)	
8	Control de esterilidad del caldo. (1mL de caldo)	

Realizado por: Pilar Minta, 2019

15. Utilizar el tubo 7 como control de viabilidad del microorganismo (1mL de caldo + inóculo).
16. Utilizar el tubo 8 como control de esterilidad del caldo (1 mL de caldo) completando así los 8 tubos.
17. Inocular las 6 diluciones y el control de viabilidad, con 100 µL de inóculo estandarizado la concentración del tubo 1 de la escala MacFarland, equivalente a  $3.0 \times 10^8$  UFC/ mL. Ver preparación del inóculo en (\*\*\*)
18. Homogenizar los tubos e incubar a 29°C por 24 horas.

19. Al término de la incubación, tomar 10  $\mu$ L de cada tubo y sembrar en placas de agar saboraud-cloranfenicol, mediante extensión en superficie.
20. Incubar las placas durante 24 horas, a 29 °C.
21. Realizar la inspección visual del número de UPC de levaduras de cada placa al término de la incubación.
22. Interpretar y determinar la concentración mínima inhibitoria, como la concentración mínima de etanol, donde existe el menor crecimiento visible de UPC de levaduras, después del periodo de incubación.

( \*) *Preparación del caldo nutritivo*

Un caldo nutritivo es un medio altamente enriquecido que permite al crecimiento de la mayoría de microorganismos. En la investigación se utilizó un caldo nutritivo basado en un estudio realizado por (Acevedo , et al., 2004) sobre la ACTIVIDAD DE DISTINTAS PRESENTACIONES COMERCIALES DE *Saccharomyces boulardii* en el cual su composición fue la siguiente: Peptona 2.5 g, D-glucosa 5.0 g, Extracto de levadura 3.0 g y NaCl 0.5 g, por litro de agua destilada.

Procedimiento:

1. Pesar los componentes.
2. Disolver en el volumen de agua destilada necesario.
3. Esterilizar.

(\*\*) *Preparación del extracto estandarizado de propóleo.*

Un extracto estandarizado es un preparado líquido que contiene una cantidad fija de extracto blando o constituyente activo, en un volumen determinado de solvente garantizando así el contenido real de uno o más principios activos o compuestos marcadores.

Procedimiento:

1. Pesar 10 g de extracto blando de propóleo y disolver con 80 mL etanol al 95 %, en un vaso de precipitación.
2. Una vez disuelto pasar a un balón aforado de 100 mL y aforar.

Las concentraciones de droga procesada para todas las pruebas se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentraci3n del extracto blando} = \frac{\text{Peb}}{\text{Vs}} = \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

En donde:

Peb = Peso del extracto blando de prop3leo en miligramos.

Vs = Volumen del solvente en mililitros.

#### (\*\*\*) *Preparaci3n del in3culo estandarizado*

La actividad antimic3tica del extracto de prop3leo se prob3 con una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial de la marca Levopan cuya densidad poblacional fue estandarizada a  $3 \times 10^8$  células/ mL.

Procedimiento:

1. Pesar 2.5 mg de levadura liofilizada de *Scharomyce cerevisiae* de la marca Levopan.
2. Sembrar en el caldo nutritivo e incubar a 29°C por 24 horas.
3. Repicar la muestra en agar Saboraud –Cloranfenicol e incubar por 48 horas a 29 °C.
4. Una vez incubada la muestra, suspender las colonias de levaduras en soluci3n fisiol3gica al 0,9% hasta alcanzar la concentraci3n del tubo 1 MacFarland equivalente a  $3.0 \times 10^8$  UFC/ mL.

#### **2.3.4 *M3todo de campo de evaluaci3n de actividad antimic3tica del extracto alcoh3lico de prop3leo sobre S cerevisiae para los apicultores.***

El m3todo de campo para determinar la actividad antimic3tica del prop3leo se bas3 en la medici3n de un metabolito secundario, de la fermentaci3n de sacarosa realizada por *Saccharomyces cerevisiae*, como lo es el CO<sub>2</sub>, el mismo que fue medido en una jeringuilla, mediante la observaci3n del desplazamiento de su 3mbolo ejecutado por la presi3n que ejerce el CO<sub>2</sub> producido en la fermentaci3n.

Para la determinaci3n de la actividad antimic3tica del prop3leo por este m3todo, se usar3 la concentraci3n de prop3leo m3nima inhibitoria encontrada en la ejecuci3n del m3todo *in vitro*.

#### 2.3.4.1 Materiales, equipos y reactivos.

**Tabla 7-2:** Materiales, equipos y reactivos para el diseño del método de campo que evalué la actividad antimicótica de propóleo.

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Jeringuillas 20 mL	Balanza de precisión	Etanol al 95 %
Pipeta de 1 y 10 mL	Incubadora microbiológica	Solución fisiológica al 0.9%
Papel aluminio		<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
Gradilla		Solución de sacarosa al 30 %
Balón aforado de 100 mL		Extracto estándar de propóleo de 125 mg/ mL
Pizeta		
Mechero de alcohol		
Tubos de ensayo		
Alicate		
Asa		

**Realizado por:** Pilar Minta.2019

#### 2.3.4.2 Hipótesis

La concentración de propóleo encontrada como mínima inhibitoria en el análisis microbiológico, produce inhibición en el método de campo de evaluación de la actividad antimicótica

#### 2.3.4.3 Método de laboratorio para sustento del método de campo para evaluar la actividad antimicótica del extracto alcohólico de propóleo.

1. Preparar una solución de sacarosa al 40 %. Ver preparación en (\*\*\*\*).
2. Preparar la concentración de propóleo alcohólico de concentración diez veces mayor a la concentración mínima inhibitoria, encontrada en el método de macro dilución en caldo debido a que se va realizar la dilución 1:10 ( Concentración mínima inhibitoria = 12.5 mg/ ml ; Concentración de propóleo 125 mg/ mL = dilución 1:10). Ver procedimiento en el numeral 2.3.3.3 (\*\*).
3. Preparar el inóculo de levaduras siguiendo el procedimiento indicado en el numeral 2.3.3.3 (\*\*\*) pero hasta alcanzar la concentración 3 MacFarland, debido a que en pruebas preliminares, el blanco de concentración 1 MacFarland tomó dos semanas para empezar a

empujar el embolo de la jeringuilla, cuyo tiempo resultó insatisfactorio, pues se requerirá de un tiempo mayor para poder observar que el propóleo presenta actividad antimicótica.

4. Preparar los tubos que se sugieren en la tabla siguiente:

N° de tubo	mL de solución de sacarosa al 40 % (***)	Sustancia variable inhibidora	Inóculo de levaduras estandarizado (3 Macfarland)	Volumen final en cada tubo (mL)
Tubo 1	9	1 mL de propóleo etanolico de concentración 125 mg/mL	1 mL	11
Tubo 2	9	1 mL de etanol al 95 %	1mL	11
Tubo 3 (Control de viabilidad)	10	-	1 mL	11

**Realizado por:** Pilar Minta.2019

5. Después de la preparación de los tubos, homogenizarlos.
6. Absorber el contenido de cada tubo, con una jeringuilla de 20 mL, evitando en lo posible perder las soluciones.
7. Sacar las burbujas que pueden quedar en el interior de las jeringuillas.
8. Sellar el pivote de cada jeringuilla con un alicate ayudándonos de calor.
9. Introducir todas las jeringuillas en una incubadora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y registrar la hora de ingreso.
10. Monitorear y registrar el tiempo de desplazamiento del embolo de las jeringuillas.
11. Definir la actividad antimicótica en la jeringuilla, que no exista desplazamiento del émbolo después del periodo de incubación.

( \*\*\*) *Preparación de la solución de sacarosa al 40 %.*

#### Procedimiento

1. Pesar 40 gramos de sacarosa.
2. Disolver con 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitación.
3. Trasvasar a un balón de aforo de 100 mL y aforar.

### 2.3.5 Ejecución de la evaluación de la actividad antibiótica del extracto alcohólico de propóleo en la leche cruda doblemente desnatada por el método de recuento de viables.

#### 2.3.5.1 Materiales, equipos y reactivos.

**Tabla 8-2:** Materiales, equipos y reactivos para evaluar la actividad antibiótica del propóleo sobre leche cruda doblemente desnatada por el método de recuento de viables.

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Pipeta de 10 mL	Incubadora microbiológica	Agar PCA
Lámpara de alcohol	Autoclave	Leche cruda doblemente desnatada
Pera	Cámara de flujo laminar	
Micro pipetas de 1000 y 100 uL		

Realizado por: Pilar Minta, 2019

#### 2.3.5.2 Hipótesis

La concentración mínima inhibitoria de propóleos sobre *S.cerevisiae* inhibe el crecimiento de *Aerobios mesófilos* presentes en la leche cruda.

#### 2.3.5.3 Definición de tratamientos para la determinación de actividad antibiótica del extracto alcohólico de propóleo.

Se definió realizar tratamientos por separado de muestras de leche cruda con propóleo, etanol y el blanco correspondiente. El indicador para valorar la actividad antibiótica de las sustancias mencionadas es el número de unidades formadoras de colonias desarrollados en un medio de cultivo de uso general (PCA) e inoculadas a una temperatura favorable para el desarrollo de *A.mesófilos*.

Se ejecutaron tres replicas por triplicado

**Tabla 9-2:** Tratamientos realizados para la determinación de la actividad antibiótica del propóleo.

	Réplica 1						Réplica 2						Réplica 3					
	Propoleo (12,5 mg/mL)		Etanol 95%		Blanco		Propoleo (12,5 mg/mL)		Etanol 95%		Blanco		Propoleo (12,5 mg/mL)		Etanol 95%		Blanco	
Tempo (HORAS)	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24
Repetición																		
R1																		
R2																		
R3																		

Realizado por: Pilar Minta. 2019

1. Preparar la muestra experimental de leche cruda según el procedimiento correspondiente. (\*\*\*\*\*)
2. Elaborar los tratamientos sobre leche cruda que se observan en la tabla siguiente: (Replica)

Nº de frasco	mL de leche cruda doblemente desnatada	Sustancia variable inhibidora	Volumen final en cada frasco (mL)
Frasco 1	49	1 mL de propóleo etanólico de 625 mg/mL	50
Frasco 2	49	1 mL de etanol al 95 %	50
Frasco 3 (BLANCO)	50	-	50

Realizado por: Pilar Minta, 2019

3. Una vez colocado cada sustancia inhibidora, homogenizar por 1 minuto.
4. Tomar una muestra y realizar el recuento de viables a tiempo 0. Cerrar los frascos y dejar reposar por 24 horas a temperatura ambiente.
5. Tomar una muestra y realizar el recuento de viables a las 24 horas. Ver procedimiento en (\*\*\*\*\*)
6. Interpretar resultados (UFC) para cada sustancia inhibidor

(\*\*\*\*\*) *Recuento de viables (NORMA ISO 11133)*

1. Tomar 10 ml de cada frasco, para realizar diluciones con agua de peptona al 0.1 %.
2. Sembrar 100 uL del inóculo de la dilución  $10^{-4}$  en agar PCA.
3. Incubar en una estufa a 35 °C por 24 horas.
4. Transcurrido la incubación realizar el recuento de UFC de *A.mesófilos* presente.

### **2.3.6 Desarrollo de un método de campo para evaluar la actividad antibiótica del propóleo de fácil uso para los apicultores.**

El método de campo de actividad antibiótica del propóleo se realizó utilizando la concentración de propóleo encontrada como mínima inhibitoria para *S.cerevisiae* (12.5 mg /mL), el método consiste en tratar un volumen de leche cruda con la concentración de propóleo mínima inhibitoria con la finalidad de observar el bloqueo de la fermentación láctica en un periodo de tiempo, donde el indicador visual sería el tiempo de la coagulación de la caseína de la leche.



### 2.3.6.1 Materiales, equipos y reactivos.

**Tabla 10-2:** Materiales, equipos y reactivos para ejecutar un método de campo evaluador de actividad antibiótica del propóleo.

MATERIAL	EQUIPOS	REACTIVOS
Frascos estériles de plástico de 100 mL.		Leche cruda doblemente desnatada.
Probeta de 100 mL		Extracto estandarizado de propóleo de 12.5 mg /mL
Pipeta de 1 mL		
Gasa estéril		

Realizado por: Pilar Minta, 2019

### 2.3.6.2 Hipótesis

La concentración de propóleo mínima inhibitoria encontrada para *S.cerevisiae* inhibe la fermentación láctica en la leche cruda, evitando la coagulación de la caseína.

### 2.3.6.3 Método de campo para evaluar la actividad antibiótica del extracto alcohólico de propóleo.

1. Se define realizar tratamientos por separado de muestras de leche cruda, con propóleos, con etanol y con el blanco correspondiente. El indicador para valorar la actividad antibiótica de las sustancias mencionadas es el tiempo de coagulación de la caseína de la leche cruda.

**Tabla 11-2:** Tratamientos realizados para la determinación de la actividad antibiótica del propóleo. (Método de campo)

REPETICIONES	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	Propoleo (12.5mg/mL)	Etanol 95%	Blanco	Propoleo (12.5 mg/mL)	Etanol 95%	Blanco	Propoleo (12.5 mg/mL)	Etanol 95 %	Blanco
R1									
R2									
R3									

Elaborado por: Pilar Minta

2. Luego de realizar las pruebas en las distintas réplicas el resultado esperado para determinar que existe actividad antibiótica es que la prueba con propóleo no desestabilice el estado de la leche cruda.

- La existencia de actividad antibiótica sugiere dotar y socializar un método de campo de utilidad para los apicultores. El detalle del procedimiento del método de campo con los resultados de los tratamientos se encuentra en el capítulo de resultados ( numeral 3.6)

### 2.3.7 *Elaboración de una pasta dental con propóleo blando activo asociado a los beneficios reportados para *Azadirachta indica* (Neem)*

Se vio la factibilidad de formular una pasta dental que contenga como principios activos, el extracto blando de propóleo de concentración mínima inhibitoria para bacterias y levaduras y la infusión de *Azadirachta indica* (Neem).

#### 2.3.7.1 *Materiales, equipos y reactivos.*

**Tabla 12-2:** Materiales, equipos y reactivos para la elaboración de una pasta dental de propóleo asociado a *Azadirachta indica* (Neem).

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Papel aluminio	Molino Arthur H. Thomas C.O	Hojas pulverizadas de <i>A.indica</i>
Embudo	Estufa.	Extracto blando de Propóleo
Papel filtro		Carbonato de calcio.
Probeta de 50 mL		Glicerina.
Vasos de precipitación de 250,100 y 50 mL		Carboximetilcelulosa.
Varilla de agitación		Sorbitol
Espátula		Sodio lauril sulfato
Reverbero		Esencia de menta
Tubos colapsibles		Flúor
		Sodio Benzoato

**Realizado por:** Pilar Minta. 2019

#### 2.3.7.2 *Desarrollo de la formulación*

Previa a la formulación de cualquier producto farmacéutico se debe tomar en cuenta, el tipo, el lugar de aplicación, usos y funciones del principio activo, presentación y la forma de aplicación.

- Obtener la infusión de *Azadirachta indica* (Neem) .Ver procedimiento en (\*\*\*\*\*)
- Calcular la cantidad de extracto blando de propóleo necesaria para una fórmula unitaria de 100 gramos de pasta dental, con el fin de que cada gramo de pasta dental contenga 12.5 mg de extracto blando de propóleo.
- Ajustar la formulación para 100 gramos de pasta dentífrica.

4. Pesar los principios activos y los excipientes.
5. Seguir el procedimiento indicado en el diagrama de flujo para la elaboración de la pasta dental. (Numeral 2.3.7.3).
6. Envasar la pasta dental en tubos colapsibles con la ayuda de una jeringuilla.

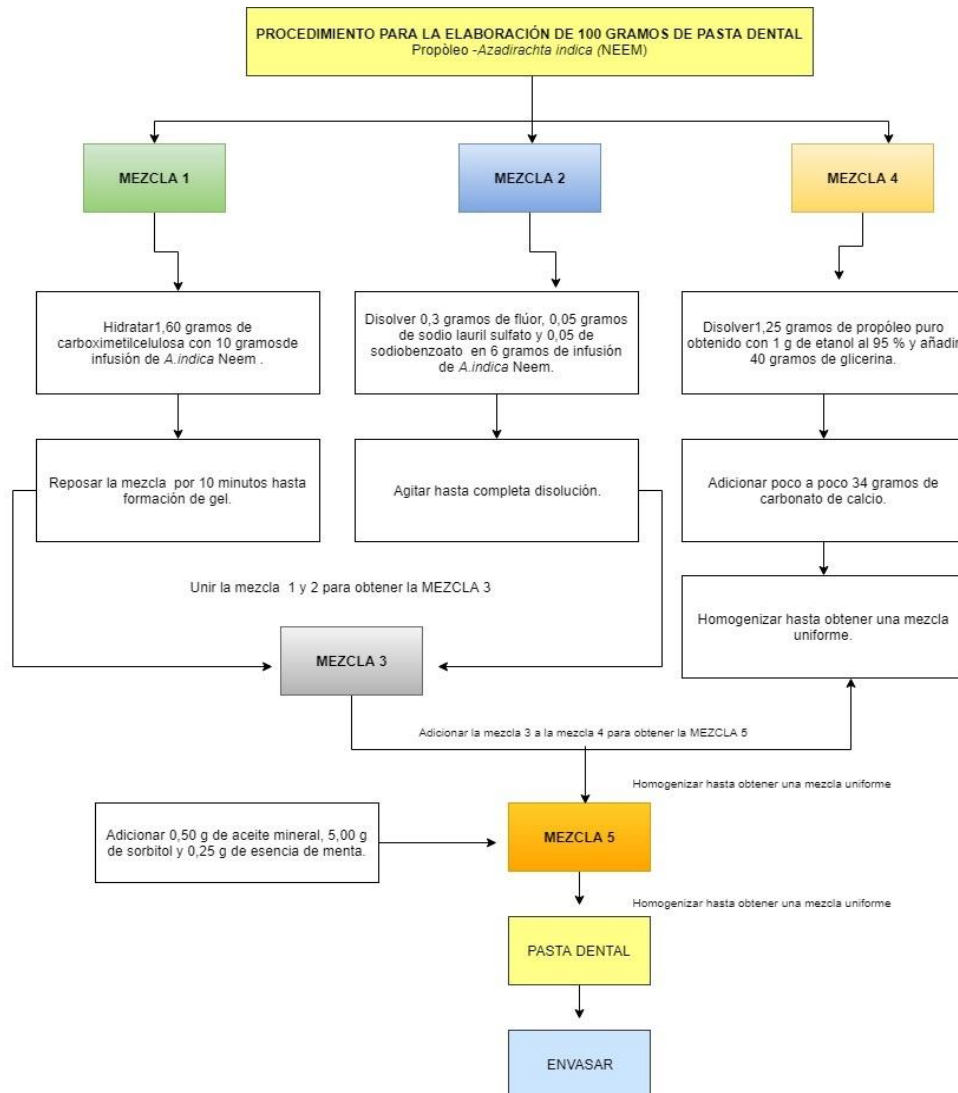
( \*\*\*\*\*) *Obtención de la infusión de las hojas de Azadirachta indica (Neem)*

Para la investigación se recolectó en fundas ziploc las hojas frescas de *Azadirachta indica* en la provincia del Guayas, cantón Duran, Parroquia Primavera 1, en el área del Parque La Ferroviaria, en Marzo del 2018 y se transportó inmediatamente al laboratorio.

Para obtener la infusión de las hojas de *Azadirachta indica* (Neem) al 10 % se aplicó el siguiente procedimiento:

1. Lavar las hojas con agua destilada y secar a 37 °C por 8 horas en una estufa.
2. Pulverizar las hojas secas de *Azadirachta indica* (Neem) con un Molino Arthur H. Thomas C.O. y guardar en una funda ziploc.
3. Calentar hasta ebullición 100 mL de agua destilada.
4. Pesar 10 gramos de hojas pulverizadas de *Azadirachta indica* y colocar en agua destilada en el momento de ebullición.
5. Cerrar herméticamente el recipiente y retirar del fuego.
6. Filtrar la infusión con ayuda de un papel filtro.
7. Almacenar la infusión en un frasco estéril, en refrigeración hasta su utilización.

2.3.7.3 Diagrama de flujo de la elaboración de la pasta dental con propóleo e infusión de hojas de *Azadirachta indica* Neem



**Figura 2-2:** Diagrama de flujo de la elaboración de la pasta dental de propóleo – *Azadirachta indica*.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

2.3.7.4 Pruebas de control de calidad de la pasta dental de propóleo - *Azadirachta indica* (Neem)

a) Determinación de pH. (NTE INEN 1596)

Preparación de la muestra

Preparar una solución con una parte por masa de pasta dental en ensayo y cuatro partes por masa de agua.

Procedimiento:

1. Colocar en el vaso de precipitación la muestra preparada y agitar levemente.
2. Introducir el electrodo del medidor electrométrico de pH en el vaso de precipitación con la solución, evitando que toque las paredes del vaso.
3. Determinar el pH y registrar. (NT INEN 1602, 2014)

*b) Determinación de espuma por el Índice afrosimétrico.*


El índice afro simétrico es el número que expresa el volumen en centímetros cúbicos en que está disuelto un gramo de material saponífico para producir espuma de un centímetro de altura en un tubo de 16 mm, de diámetro que contiene 10 mL de solución. (Valencia, et al., 2005, pp. 35-36)

Procedimiento:

1. Preparar una solución de la muestra de pasta dental al 0.1 % con agua destilada.
2. Tomar 10 tubos del mismo diámetro y colocar 1 mL de la solución de la muestra en el primer tubo, 2 mL en el segundo, 3 mL en el tercero y así sucesivamente hasta llegar a 10 mL en el décimo tubo.
3. Completar a 10 mL con agua destilada en todos los tubos, agitar por 30 segundos y dejar en reposo a los tubos por 15 minutos.
4. Después de los 15 minutos observar en qué tubo la espuma alcanza 1 cm, de altura (medida convencional). (Valencia, et al., 2005, pp. 35-36)

c) Análisis sensorial de la pasta dental

El análisis sensorial se lo realizó utilizando la escala de preferencia de Likert, utilizando un formato de evaluación que se encuentra a continuación:

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**  
**GRUPO SAGID**

**Proyecto:** ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACION DE PRODUCCION APICOLA DE CHIMBORAZO,(ASOPROACH) PARA DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO’.

**Trabajo De Titulación:**“DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA Y ANTIMICÓTICA PARA PROPOLEOS Y SU UTILIZACIÓN ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (NEEM) PARA LA ELABORACIÓN DE UNA PASTA DENTAL.”

**EVALUACIÓN SENSORIAL DE UNA PASTA DENTAL DE PROPOLEO BLANDO ACTIVO ASOCIADO A UNA INFUSIÓN DE *Azadirachta indica* (NEEM)**

**Nombre:**  
**Fecha:**

*Instrucciones a seguir:*

- Por favor coloque su nombre y fecha
- Se le presentara 1 muestra de pasta dental.
- Los parámetros a evaluar son: aspecto, color, olor y sabor.
- Marque con una “X” el cuadro correspondiente a su evaluación de la muestra para cada parámetro .Relacionados con:

1	Me disgusta mucho
2	Me disgusta moderadamente
3	No me gusta ni me disgusta
4	Me gusta moderadamente
5	Me gusta mucho

**Nota:** Si tiene alguna pregunta por favor indicarla

Pasta dental de extracto blando de propóleo e infusión de <i>Azadirachta indica</i> (NEEM).				
Puntuación	Aspecto	Color	Olor	Sabor
1				
2				
3				
4				
5				

Firma.....

**Figura 3-2:** Encuesta para la evaluación sensorial de la pasta dental de propóleo - *Azadirachta indica*.

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019

Este análisis consistió en determinar las propiedades sensoriales de la pasta dental. Para los parámetros: aspecto, color, olor y sabor; la valoración fue objetiva, calificada por 10 panelistas utilizando los criterios de una escala de preferencia de Likert.

### **2.3.8 *Análisis estadístico de datos***

Los promedios de las repeticiones de cada una de las réplicas fueron sometidos a un ANOVA de un solo factor utilizando el paquete estadístico SPSS 21 y la prueba Post Hoc Tukey, para realizar la comparación de medias de los distintos tratamientos.

### **2.3.9 *Socialización a ASOPROACH (Obtención, evaluación antimicótica y antibiótica de campo, elaboración de pasta dental, del propóleo blando obtenido)***

Se prevé realizar una socialización de los resultados obtenidos en la investigación a los socios de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo con el fin de que los apicultores puedan hacer uso de los métodos detallados en la investigación cuando lo requieran necesario. La socialización constará de una conferencia magistral, sobre la metodología de obtención de propóleo blando, el método de campo para la evaluación antimicótica y antibiótica del propóleo y de la elaboración de la pasta dental.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 3.1 Monitoreo y asesoramiento de la recolección del propóleo crudo.

##### 3.1.1 Selección de los apicultores proveedores de propóleo crudo.

Se seleccionaron 3 apicultores socios de ASOPROACH debido a que cumplieron el siguiente criterio: garantiza cierta limpieza y en modo de recolección común basado en mallas plásticas o trampas de propóleo.

##### 3.1.2 Monitoreo y asesoramiento de la recolección del propóleo crudo.

###### 3.1.2.1 Resultados de la lista de chequeo aplicado a los apicultores para el monitoreo de la recolección del propóleo crudo.

Para la monitorización de la recolección de propóleo crudo se utilizó una lista de chequeo basado en la Norma Salvadoreña 2003 a los tres apicultores proveedores de propóleo crudo para la investigación. Los resultados del check list utilizado se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 1-3:** Resultados del check list aplicado a los tres apicultores proveedores de propóleo crudo para la investigación.

Nº	BPMs en la recolección del propóleo crudo según la Norma salvadoreña 2003.	Apicultor 1	Apicultor 2	Apicultor 3
1	Antes de la recolección el apicultor se encuentra en óptimas condiciones de salud.	SI	SI	SI
2	Antes de la recolección el apicultor se lava las manos con agua y jabón.	SI	SI	SI
3	Para la recolección de propóleo, el apicultor usa guantes limpios.	SI	SI	SI
4	El apicultor recolecta el propóleo en colmenas que no han estado sometidas a tratamientos con antibióticos ni acaricidas químicos.	SI	SI	SI
5	El apicultor evita las fuentes de contaminación en la extracción y en la refrigeración del propóleo cuando se	SI	SI	SI



	recolecta a través del método de mallas o rejillas de polietileno.			
6	El apicultor no utiliza rejillas o mallas metálicas para la recolección del propóleo.	SI	SI	SI
7	Durante el acopio del propóleo en el apiario, el apicultor utiliza bolsas plásticas de polietileno transparente (natural) o envases de vidrio o plástico liso para evitar la adherencia de pigmentos.	SI	SI	SI
8	El apicultor procura que el propóleo cosechado no se mezcle con sustancias extrañas a él, tales como restos de madera, abejas, miel, tierra, etc.	SI	SI	SI
9	El apicultor no come, bebe, fuma y/o estornuda, durante el procedimiento de almacenamiento de propóleo.	SI	SI	SI
10	El apicultor se lava las manos cada vez que se incorpora a la actividad de recolección del propóleo.	SI	NO	NO
11	El apicultor utiliza una superficie limpia y diseño sanitario adecuado y apropiado para evitar la adherencia de partículas, durante la manipulación del propóleo bruto una vez cosechado.	SI	SI	SI
12	El apicultor separa las partículas extrañas del propóleo por medios mecánicos (pinzas, etc.)	SI	NO	SI
13	El apicultor almacena el propóleo ,en envases o recipientes limpios de material y diseño sanitario adecuado	SI	SI	SI
14	El apicultor lava el propóleo cosechado.	NO	NO	SI

Fuente: (NORMA SALVADOREÑA, 2003)

Realizado por: Pilar Minta, 2019

Posterior a la monitorización se analizó la lista de chequeo aplicado para encontrar los incumplimientos a lo establecido por la norma Salvadoreña 2003 en los tres apicultores y brindar su asesoramiento respectivo. Los incumplimientos observados en la recolección y el almacenamiento de propóleo crudo y su respectivo asesoramiento se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 2-3:** Tabla resumen de incumplimientos de los 3 apicultores proveedores de propóleo bruto.

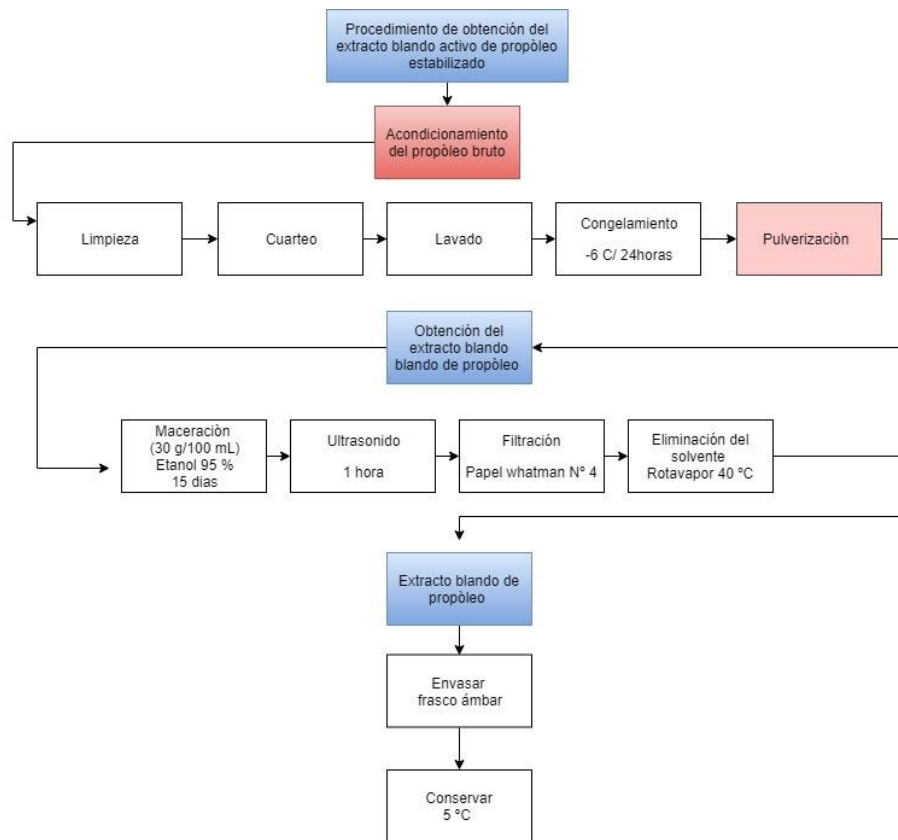
<b>Incumplimientos del check list</b>	<b>Apicultor que incumple</b>	<b>Asesoramiento</b>
El apicultor lava el propóleo cosechado.	Apicultor 1 Apicultor 2	Se recomendó lavar el propóleo con agua destilada para eliminar partículas extrañas a él. Además se recomendó realizar lavados muy rápidos con alcohol potable para comercializar un propóleo de mejor calidad.
El apicultor se lava las manos cada vez que se incorpora a la actividad de recolección de propóleo.	Apicultor 2 Apicultor 3	El apicultor no se lava las manos cada vez que se incorpora a la actividad de recolección, pero realiza la recolección de propóleo con guantes limpios por lo que este incumplimiento se vería remplazado.
El apicultor separa las partículas extrañas del propóleo por medios mecánicos (pinzas, etc.)	Apicultor 2	Se recomendó utilizar pinzas para separar las partículas extrañas a él con el fin de evitar contaminarlo.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

Se observó que dos de los tres apicultores monitoreados no lavan el propóleo cosechado, esto hace que el propóleo cosechado contenga impurezas como: restos de abejas, astillas de madera, polvos etc. Por otra parte dos de los tres apicultores monitoreados no realizan el lavado de manos cada vez que se incorporan a la actividad de recolección de propóleos, pero utilizan guantes limpios para la recolección del propóleo crudo, por lo que este incumplimiento no representaría un riesgo importante para el propóleo recolectado.

### 3.2 Obtención de extracto blando activo de propóleo estabilizado.

#### 3.2.1 Diagrama de flujo del procedimiento de obtención del extracto blando de propóleo estabilizado



**Figura 1-3:** Diagrama de flujo para obtener el extracto blando de propóleo.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

El procedimiento detallado se encuentra en el apartado de metodología (numeral 2.3.2).

### 3.2.2 Rendimiento del extracto blando de propóleo

**Tabla 3-3:** Resultado del rendimiento del propóleo blando obtenido.

PESO DEL PROPOLEO CRUDO (g)	PESO DEL EXTRACTO BLANDO (g)	RENDIMIENTO (%)
750	304.22	40.56

Fuente: Laboratorio de Productos naturales

Realizado por: Pilar Minta, 2019

El rendimiento del extracto blando obtenido es inferior a los valores de rendimiento reportado por (Carrillo, et al., 2011, p. 38) en su estudio sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana del propóleo de México, en el que reporta rendimientos de propóleo blando de (41.83 -55 %), esto puede ser por la composición química del propóleo que difieren en cada localidad, por el procedimiento de obtención aplicado, así como por la pureza del propóleo crudo.

El propóleo blando obtenido presentó mejores características organolépticas y ausencia de impurezas en relación al propóleo bruto del que partimos para obtener el extracto blando.

### 3.2.3 Análisis de calidad físico-químico del extracto blando de propóleo.

**Tabla 4-3:** Resultados de los parámetros de calidad del extracto blando de propóleo según Norma Ramal Cubana (NRSP 312).

PARAMÈTRO	MÈTODO	EXTRACTO BLANDO DE PROPOLEO
Ph	Potenciometría	4,98
Densidad	Picnometría	1.0035
Índice de refracción	Refractometría	1.483
Olor	Olfativo	Resinoso aromático
Color	Inspección visual	Ámbar

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental

Realizado por: Pilar Minta.

El pH obtenido del extracto blando de propóleo, corrobora las características ácidas de las sustancias que pueden estar presentes en el extracto; tales como flavonoides, fenoles y taninos. Este valor se encuentra dentro del rango establecido por Norma Ramal Cubana para el extracto

de propóleo donde especifica un rango de (4,16 a 5,16) (Norma Ramal de agricultura Cubana, 1994.)

En el caso de la densidad al ser un extracto altamente concentrado tiene una consistencia semisólida presentando una densidad superior al de una tintura de propóleo establecido por la Norma Ramal Cubana (0,831 a 0,889).

El índice de refracción del extracto blando de propóleo revela la presencia de sustancias en el medio, el valor encontrado supera el valor reportado en la Norma Ramal Cubana para el extracto de propóleos que establece (1,366) (Norma Ramal de agricultura Cubana, 1994.). Esto puede deberse a que el extracto de propóleo fue concentrado hasta eliminación parcial del solvente y a la composición química del propóleo bruto que varía de acuerdo a la zona geográfica, época del año, clima etc.

El extracto blando de propóleo presentó un color ámbar, olor resinoso debido a los componentes volátiles que el propóleo presenta que le dan este olor característico, y un sabor amargo intenso que puede deberse a los compuestos fenólicos que poseen estas características.

### **3.3 Resultados de la determinación de la actividad antimicótica del extracto alcohólico del propóleo sobre *S. cerevisiae* por el método de macro dilución en caldo.**

Se realizaron diluciones seriadas del orden 1:2 una batería de dilución para determinar la actividad mínima inhibitoria del propóleo sobre *S. cerevisiae*, teniendo como indicador la concentración a la que no existe crecimiento microbiano, confirmando esta actividad con un recuento de viables. Resultado que será utilizado en el método de campo para la evaluación de la actividad antimicótica, antibiótica y para la formulación de la pasta dental.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de propóleo sobre *S. cerevisiae* se realizó con seis replicas, cada una con tres repeticiones cuyos resultados se encuentran en el (Anexo N). Se calculó el promedio de las repeticiones de cada una de las réplicas y el promedio general de UFC para cada tratamiento, valores que se observan la tabla 5-3.

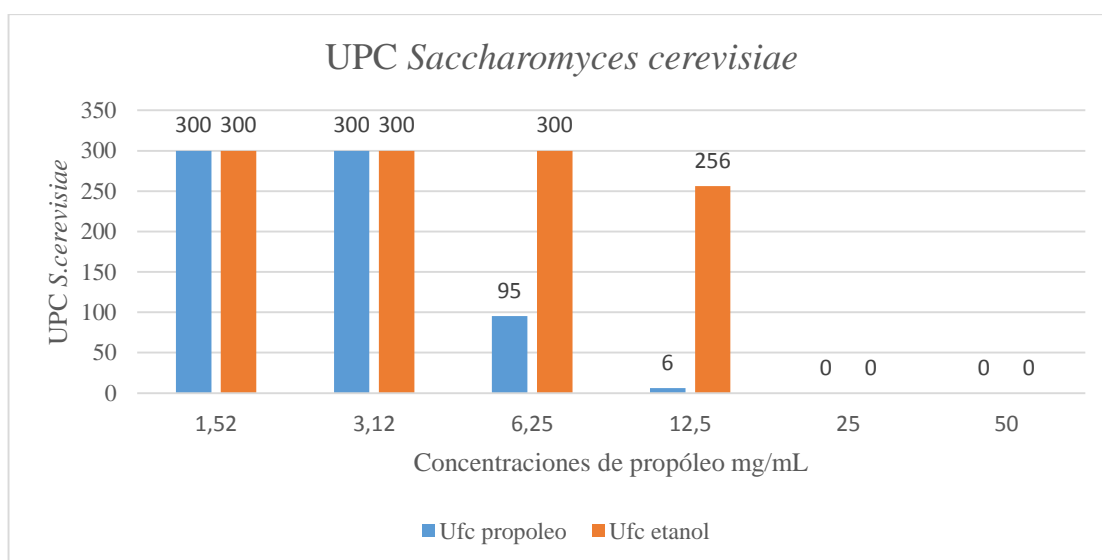
**Tabla 5-3:** Promedios totales del recuento de UFC de *S. cerevisiae* para las concentraciones de propóleo y etanol.

TRATAMIENTOS	Unidades formadoras de colonia (UFC) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>															
	Propóleo								Etanol							
	Concentraciones Propóleo (mg/mL)	PROM R1	PROM R2	PROM R3	PROM R4	PROM R5	PROM R6	PROM GENERAL	Concentraciones etanol (%)	PROM R1	PROM R2	PROM R3	PROM R4	PROM R5	PROM R6	PROM GENERAL
T1	50	0	0	0	0	0	0	0,00	47,5	0	0	0	0	0	0	0,00
T2	25	0	0	0	0	0	0	0,00	23,2	0	0	0	0	0	0	0,00
T3	12,5	7	6,67	5,67	6,67	5,67	6,67	6,39	11,51	252,00	211,33	268,00	269,67	263,67	273,00	256,28
T4	6,25	95,33	94,67	96,000	95,67	95,00	96,00	95,45	5,5	300	300	300	300	300	300	300,00
T5	3,12	300	300	300	300	300	300	300,00	2,5	300	300	300	300	300	300	300,00
T6	1,52	300	300	300	300	300	300	300,00	1,25	300	300	300	300	300	300	300,00

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

A continuación se presenta la gráfica de los promedios de los tratamientos



**Gráfico 1-3:** Efecto de las concentraciones de propóleo y etanol sobre el número de UPC de *S.cerevisiae*

Realizado por: Pilar Minta, 2019

La concentración mínima inhibitoria de propóleo obtenida para inhibir el crecimiento de *S.cerevisiae* fue de 12,5 mg/mL (6 UPC) (tabla 3-3), esta concentración muestra una diferencia muy importante en cuanto a la capacidad inhibitoria respecto a las otras 5 concentraciones de propóleo. Las dos primeras concentraciones de etanol inhiben el crecimiento de levaduras de igual forma que el propóleo, en la tercera concentración de etanol existe una inhibición del crecimiento de levaduras muy reducida (256 UPC) con respecto al propóleo, situación que permite puntualizar

que experimentalmente en esta dilución correspondiente al propóleo se observó el efecto del propóleo.

A concentraciones de propóleo y etanol menores de 12,5 mg/mL se observa que el efecto inhibitorio se reduce, llegando a un momento de concentración donde el crecimiento de levaduras es superior a 300 UPC.

En bibliografía no existen estudios de la actividad del propóleo sobre *S. cerevisiae*. Sin embargo en el estudio descriptivo de las propiedades del propóleo realizado por ( Muñoz Rodríguez, et al., 2011, p. 2) menciona que el propóleo si presenta actividad sobre *S. cerevisiae*.

La metodología seguida arroja un valor de concentración mínima inhibitoria de extracto de propóleo sobre *Saccharomyces cerevisiae* de 12,5 mg/mL, similar a valores de concentración mínima inhibitoria utilizando la misma metodología pero con cepas del genero *Cándida* reportados por (Joya , et al., 2017, p. 7) de 10,2 mg/mL; 15,6 mg/mL y 18,8 mg/ correspondientes a tres propóleo diferentes sobre el crecimiento *in vitro* de cepas del género *Cándida*. El resultado obtenido permite validar el proceso de obtención del propóleo blando entregado por ASOPROACH, lo que beneficiaría el posible emprendimiento relacionado a elaborar propóleo blando activo.

### Tratamiento estadístico de datos

Hipótesis: El descenso de la concentración de propóleo blando obtenido no influye en su efecto antimicótico.

$$H_0 = T_1=T_2=T_3=T_4=T_5=T_6$$

Las concentraciones de propóleo blando afectan significativamente a la capacidad antimicótica, al nivel de significancia de  $p \leq 0,001$ .

Tukey B <sup>a</sup>	
CONCENTRACIÓN Propóleo (mg/ mL)	UPC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
25	0 a
50	0 a
12,5	6 b
6,25	95 c
1,52	300 d
3,12	300 d
F-ANOVA	***
Los valores seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey a $P < 0,05$ .	

### 3.4 Método de campo de evaluación de la actividad antimicótica del propóleo.

#### 3.4.1 Método de laboratorio empleado para sustentar los resultados obtenidos con el método de campo.

En el método de campo se empleó como criterio de actividad antimicrobiana del propóleo, el tiempo del desplazamiento del émbolo de las jeringuillas conteniendo el sustrato fermentable para *S.cerevisiae*.

La evaluación de la actividad antimicótica del propóleo se realizó con tres réplicas, cada una con tres repeticiones, los resultados se encuentran en el (Anexo O). Los promedios de las tres replicas se observan en la tabla 6-3.

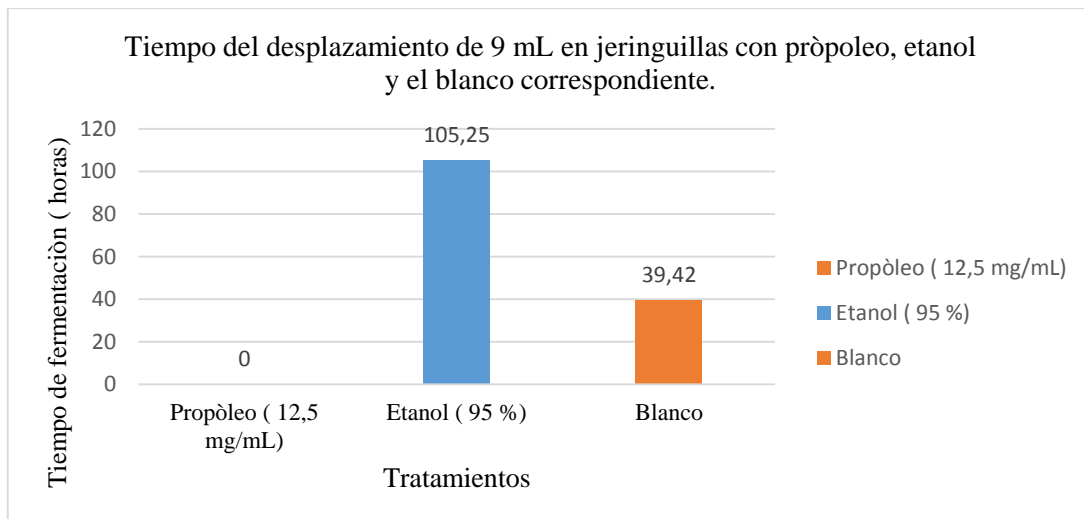
**Tabla 6-3:** Tiempos promedios de fermentación de soluciones con propóleo, etanol y el blanco correspondiente contaminadas con *S. cerevisiae*.

<b>Condiciones del monitoreo:</b> jeringuilla de 20 mL, con 11 mL de soluciones de propóleo, etanol y blanco, Volumen de desplazamiento 9 mL.				
<b>Fermentación en horas</b>				
<b>Tratamientos</b>	<b>Prom R1</b>	<b>Prom R2</b>	<b>Prom R3</b>	<b>Prom General</b>
Propóleo ( 12,5 mg)	0	0	0	0
Etanol (95 %)	102,67	107,83	105,25	105,25
Blanco	40	38,83	39,42	39,42
R=Réplica				

**Fuente:** Análisis de laboratorio.

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019

A continuación se presenta la gráfica de los promedios de los tratamientos



**Gráfico 2-3:** Tiempo de fermentación de los tratamientos con propóleo, etanol y el blanco.

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019

Según los tiempos de fermentación, el tratamiento con propóleo es el que mayoritariamente evita la fermentación alcohólica, al no ocurrir la fermentación más allá de las 105 horas por tanto el tiempo de fermentación se le consideraría indefinido, el tratamiento con etanol muestra fermentación al cabo de 105 horas. Mientras que el blanco del experimento fermento rápidamente a las 39 horas.

Los resultados obtenidos demuestran que la concentración 12,5 mg/mL de propóleo inhibe a *S.cerevisiae* según la metodología aplicada para la evaluación de la actividad antimicótica. El resultado observado respaldará la propuesta del método de campo que se pondrá en consideración a los apicultores para evaluar la actividad antimicótica el extracto de propóleo.

### **3.4.2 Propuesta para apicultores de un método de campo para determinar actividad antimicótica (Temperatura ambiente)**

1. Preparar una solución de sacarosa al 40 % .Ver preparación en el numeral 2.3.4.3 (\*\*\*\*).
2. Preparar la concentración de propóleo etanólico de concentración diez veces superior a la concentración encontrada como mínima inhibitoria, (Concentración mínima inhibitoria = 12.5 mg/ ml; Concentración de propóleo 125 mg/ mL = dilución 1:10). Debido a que se requiere preparar una dilución 1: 10. Ver procedimiento en el numeral 2.3.3.3 (\*\*).



3. Preparar los siguientes tubos como lo indica la siguiente tabla.

Nº Tubo	Solución de sacarosa 40 % (mL) (***)	Sustancia variable inhibidora (mL)	Levadura <i>S.cerevisiae</i> comercial (g)
1	9	1 mL etanol 95 %	1
2	9	1 mL de propóleo etanolico de concentración de 125 mg/mL	1
3	10	-	1

Realizado por: Pilar Minta, 2019

4. Una vez preparado los tubos homogenizarlos hasta la suspensión completa de las levaduras.
5. Absorber con una jeringuilla de 20 mL el contenido de cada tubo, evitando perdidas de la solución.(Aproximadamente 10 mL)
6. Sacar las burbujas que puedan formarse en el interior de las jeringuillas.
7. Sellar el pivote de cada jeringuilla herméticamente con un alicate ayudándose de calor.
8. Asegurar que no exista salida del líquido.
9. Colocar las jeringuillas en una superficie plana a temperatura ambiente.
10. Observar la fermentación de las jeringuillas e interpretar la presencia de actividad antimicótica, cuando no exista desplazamiento del émbolo.

### 3.5 Resultados de la evaluación de la actividad antibiótica del extracto alcohólico del propóleo en leche cruda doblemente desnatada por el método de recuento de viables.

El indicador para la evaluación de la actividad antibiótica del propóleo en el método de campo es el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Aerobios mesófilos* presentes en la leche cruda después de la adición de propóleo y el etanol.

La evaluación de la actividad antibiótica del propóleo en la leche cruda por el método de recuento de viables, se realizó con tres réplicas, cada una con tres repeticiones que se encuentran en el (Anexo P). Los promedios de las tres réplicas se observan en la siguiente tabla.

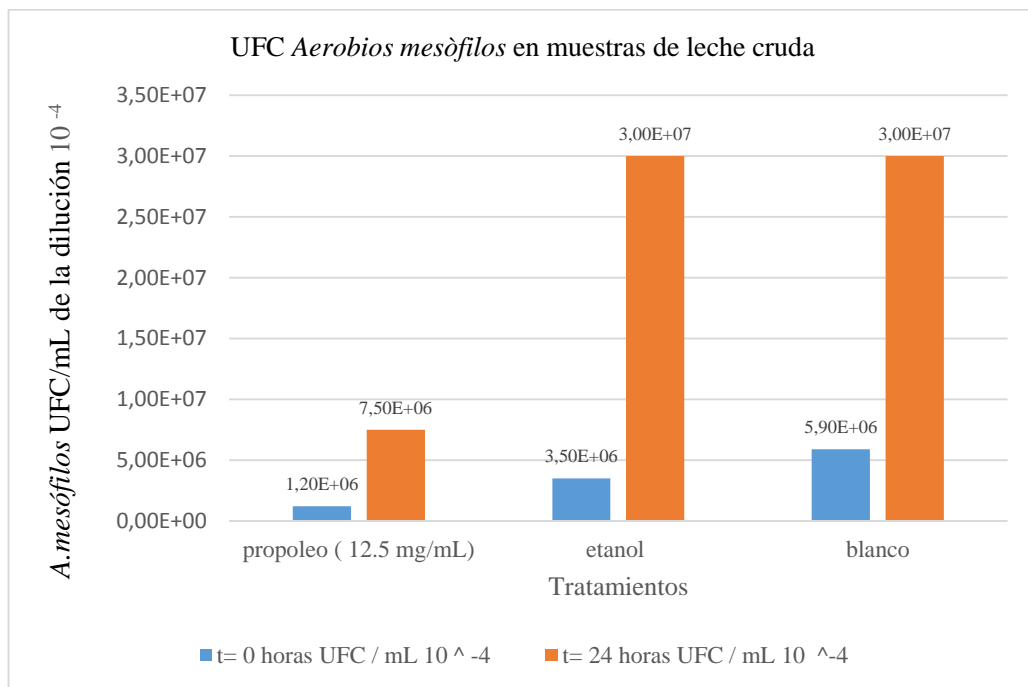
**Tabla 7-3:** Recuento de UFC *Aerobios mesófilos* en tratamientos de leche cruda con propóleo, etanol a las 24 horas de incubación.

<i>Aerobios mesòfilos</i> UFC/mL dilución $10^{-4}$								
Tratamientos	t = 0 horas				t = 24 horas			
	Prom R1	Prom R2	Prom R3	Prom General	Prom R1	Prom R2	Prom R3	Prom General
Propóleo (12,5 mg/mL)	$7 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$7,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$5,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
Etanol (95 %)	$1,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$
Blanco	$3,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$	$7 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^7$
R = Réplica								

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

A continuación se presenta la gráfica de los promedios generales de los tratamientos



**Gráfica 3-3:** Recuento de *Aerobios mesòfilos* en tratamientos de leche cruda con propóleos, etanol y el blanco correspondiente.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

En la gráfica anterior se puede observar que a las 0 horas de incubación, no existen diferencias importantes en el crecimiento de UFC de *Aerobios mesófilos* en las muestras con propóleo, etanol y el blanco.

A las 24 horas de incubación se puede observar que la muestra con propóleo presenta una diferencia muy significativa en el recuento de UFC de *A. mesófilos* con relación al etanol y al blanco, por tanto a este tiempo se puede evidenciar que el propóleo presenta actividad antibiótica. Por tanto dicha inhibición del crecimiento de bacterias, en la leche con el tratamiento de propóleo presentará menor daño visual en su aspecto (coagulación de la caseína).

Los resultados obtenidos guardan cierta similitud al estudio realizado por (Cedeño Carpio, 2018, pp. 38-40) sobre el efecto conservante del propóleo sobre la leche chocolatada, en el que se demostró que el extracto etanólico de propóleo ejerció un efecto de conservante natural en la leche chocolatada, siendo un inhibidor que ayudó a eliminar la microbiota *mesófila* con mejores resultados que un conservante químico durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones, pero estos estudios fueron realizados con leche pasteurizada por lo que se partió de una muestra de leche con un recuento de UFC menor que en el presente estudio.

### Tratamiento estadístico de datos

Hipótesis: La concentración mínima inhibitoria de propóleo blando obtenido no influye en su efecto antibiótico.

$$H_0 = C_p = C_e = C_b$$

A las 0 horas las concentraciones de propóleo y etanol afectan en forma poco significativa a la capacidad antibiótica, con un nivel de significancia  $p \leq 0,031$ , mientras que a las 24 horas la concentración de propóleo, y etanol afectan significativamente en su actividad antibiótica con un nivel de significancia  $p \leq 0,001$ .

Tukey B <sup>a</sup>		
Concentración	UFC 0horas	UFC 24horas
Propóleo	12,66 a	74,66 a
Etanol	35,11 ab	300 b
Blanco	59,33 c	300 b
<b>Anova</b>	*	***
Los valores en una misma columna seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey a $P < 0,05$ .		

### Porcentaje de inhibición:

El porcentaje de inhibición de la concentración 12,5 mg/mL de propóleos sobre *A.mesófilos* es el siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Recuento inicial} - \text{Recuento final}}{\text{Recuento inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = \frac{3 \times 10^7 - 7.5 \times 10^6}{3 \times 10^7} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = 75$$

Según la metodología aplicada la concentración de 12,5 mg/mL de extracto etanólico de propóleos reduce el 75 % de población expuesta a este agente durante 24 horas. Este resultado demuestra que el propóleo si presenta actividad antibiótica sobre *A.mesófilos*. El 25 % que no se inhibió junto con el resto de la microbiota natural de la leche cruda serían los responsables de la fermentación ácido láctica con precipitación de caseína que tiene lugar en la leche después de un periodo de tiempo.

### 3.6 Propuesta del método de campo para evaluación antibiótica del extracto alcohólico de propóleo.

1. Preparar la muestra experimental de leche cruda según el procedimiento descrito en el numeral 2.3.5.3 (\*\*\*\*\*)
2. Preparar la concentración de propóleo etanólico de concentración 50 veces superior a la concentración mínima inhibitoria, debido a que se requiere preparar la dilución 1:50 (Concentración mínima inhibitoria = 12.5 mg/ mL; Concentración de propóleo 625 mg/ ml = dilución 1:50) Ver procedimiento en el numeral 2.3.3.3 (\*\*).
3. Preparar los frascos como indica la tabla siguiente:

Nº de frasco	mL de leche cruda doblemente desnatada	Sustancia variable inhibitoria	Volumen final en cada frasco (mL)
Frasco 1	49	1 mL de propóleo etanólico de concentración 625 mg/mL	50
Frasco 2	49	1 mL de etanol al 95 %	50
Frasco 3 (BLANCO)	50	-	50

Realizado por: Pilar Minta, 2019

4. Homogenizar los frascos hasta obtener mezclas uniformes.
5. Cerrar los frascos y dejar en reposo a temperatura ambiente.
6. Observar el resultado en el transcurso de unas 72 horas (la alteración fermentativa se observará visualmente con la coagulación de la caseína).
7. La evaluación de la actividad antibiótica del propóleo se centró en determinar si el propóleo retarda la coagulación de la caseína con respecto al efecto del etanol, y empleando un blanco.

### 3.6.1 *Tiempo de coagulación de la caseína en la leche por el método de campo propuesto.*

El indicador en esta prueba es el tiempo necesario para que coagule la caseína de la leche con propóleo, etanol y el blanco correspondiente.

Para la determinación de la actividad antibiótica del propóleo se ensayaron tres replicas cada una con tres repeticiones, que se muestran en el (ANEXO Q). Los promedios de las tres réplicas se observan en la tabla 3-8:

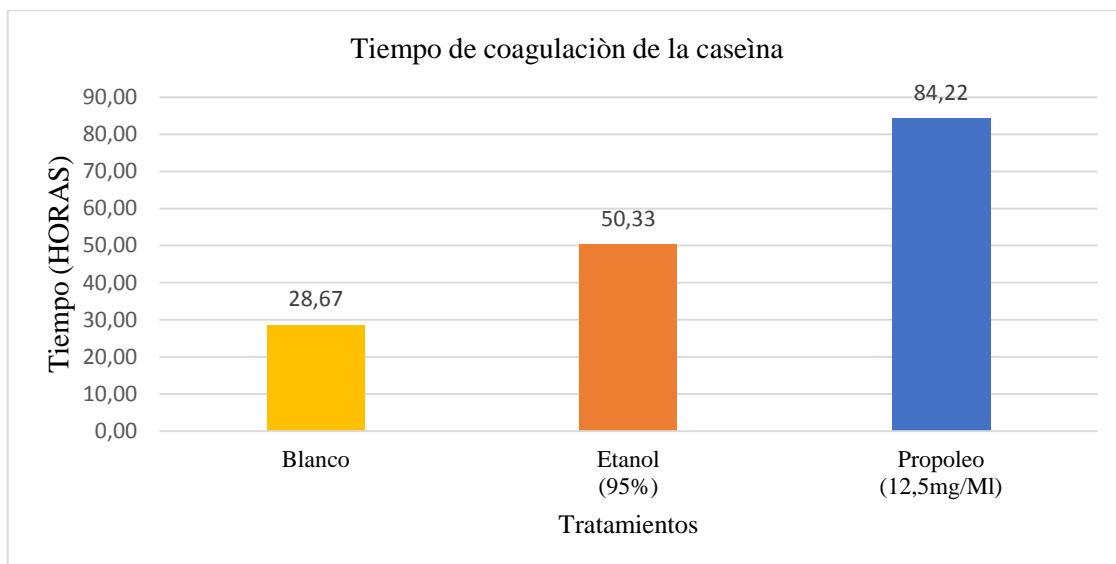
**Tabla 8-3:** Resultados del tiempo de desestabilización de la leche en las muestras de leche con etanol y el blanco.

Tiempo de coagulación de la caseína de la leche a temperatura ambiente ( HORAS )				
Tratamientos	Prom R1	Prom R2	Prom R3	Prom General
Propóleo (12,5mg/mL)	80,67	85,00	87,00	84,22
Etanol (95%)	46,67	52,67	51,67	50,33
Blanco	26,67	29,00	30,33	28,67
R = Réplica				

**Fuente:** Análisis de Laboratorio.

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019

A continuación se presenta la gráfica de los promedios generales de los tratamientos



**Gráfico 4-3:** Tiempo de coagulación de la leche cruda con propóleo, etanol y el blanco correspondiente.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

La gráfica anterior muestra que la concentración de 12,5 mg /mL de propóleo conserva la leche en un tiempo mayor que el etanol, debido a que en este tiempo no se evidencio la coagulación de la caseína. Este resultado permite la posibilidad que los apicultores visualicen la actividad antibiótica del propóleo cuando lo utilizan en una concentración mínima de 12,5 mg/mL. Estos estudios coinciden con lo demostrado por (Cedeño Carpio, 2018, p. 38) esto es, su efecto conservante sobre las características organolépticas de la leche.

### 3.7 Resultados de la formulación y elaboración de una pasta dental de propóleo asociado a *Azadirachta indica* (Neem).

En la formulación de un dentífrico intervienen como ingredientes: el principio activo responsable de la actividad deseada y los excipientes adecuados que otorgan las características adecuadas al producto para la estabilidad de los activos, la presentación, el manejo del producto y su acción.

#### 3.7.1 Concentración de propóleo activo en la formulación unitaria de 100 g de pasta dental

Miligramos de propóleo blando obtenido necesarios para obtener la concentración de 12,5 miligramos por cada gramo de pasta dental contenidos en 100 gramos de pasta dental.

1g pasta dental                      12,5 mg de extracto blando de propóleo

100 g pasta dental                  X = 1250 mg de extracto blando de propóleo (1,25 g propóleo blando)

### 3.7.2 Formulación de la pasta dental

**Tabla 9-3:** Formulación para 100 gramos de pasta dental. (Propóleo –*Azadirachta indica*)

Ingredientes	Peso (gramos)
Carbonato de calcio	34
Glicerina	40
Infusión de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) al 10 %	16
Sorbitol	5,00
Carboximetilcelulosa	1,60
Extracto blando de propóleo	1,25
Aceite mineral	0,50
Esencia de menta	0,25
monofluorurofosfato de sodio (Flúor)	0,3
Sodio Benzoato	0,05
Sodio Lauril Sulfato	0,05
Etanol 95 %	1
<b>Total de ingredientes</b>	<b>100</b>

Realizado por: Pilar Minta, 2019

El uso previsto en la formulación del dentífrico, tiene lugar por la función de los principios activos, sin embargo es indispensable incorporar los excipientes para vehicular en mejor forma los activos promoviendo su estabilidad y mejorando sus características sensoriales.

### 3.7.3 Metodología de elaboración de la pasta dental

La metodología aplicada para la obtención de la pasta dental de propóleo asociada a *A. indica* (Neem) se encuentra detallada en la parte metodológica (2.3.7)

### 3.7.4 Rendimiento práctico de la formulación

Se calculó el rendimiento de la pasta dental obtenida a partir de la formulación, a través de la siguiente formula:

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

Donde:

P = Peso práctico del pasta obtenida

m = Peso de los ingredientes (100 g)

Peso de los ingredientes (g)	Peso práctico de la pasta dental obtenida (g)	Rendimiento práctico (%)
100 g	96 g	96

Realizado por: Pilar Minta, 2019

El 4 % de disminución se explicaría por efectos en la manipulación y ejecución metodológica.

### 3.7.5 *Estimación de la cantidad de propóleo activo presente en una fracción de pasta dental para un cepillado dental.*

Cantidad promedio de pasta dental para un cepillado dental = 1,98 g (4 mm x 2 cm)

1g de pasta dental                      12.5 mg de propóleo activo

1,98 g de pasta dental                X = 24,75 mg propóleo activo aplicado en un cepillado dental.

La cantidad de propóleo presente en la fracción promedio de pasta dental garantiza aproximadamente el 50 % más de la cantidad mínima inhibitoria de propóleo, particularidad que reforzaría un mayor efecto profiláctico en la cavidad oral.

### 3.7.6 *Resultados del control de calidad de la pasta dental elaborada.*

#### 3.7.6.1 *pH de la pasta dental*

El valor del pH de la pasta dental fue de 7,98.

Este valor se encuentra dentro del rango establecido por la norma NTE INEN 1596.

#### 3.7.6.2 *Determinación de espuma por el método de índice afrosimétrico.*

**Tabla 10-3:** Resultados de la formación de espuma de la pasta dental por el índice afrosimétrico.

<b>Número de tubo</b>	<b>Centímetros de estabilidad de espuma formada por 15 segundos. ( 1 cm de espuma por 15 segundos)</b>
1	0
2	0,3
3	0,5
4	1
5	1,2
6	1,4
7	1,5
8	1,7
9	1,9
10	2,2

**Fuente:** Análisis de laboratorio.

**Realizado por:** Pilar Minta, 2019



La pasta dental de propóleo - *A. indica* formulada garantiza una buena producción de espuma debido a que el 70 % de los tubos alcanzaron 1 cm de espuma después de 15 minutos establecido como medida convencional, el tubo N° 10 fue el que alcanzó el mayor volumen de espuma. El resultado obtenido sustenta que la cantidad de sodio lauril sulfato es adecuada, excipiente importante debido a que ayuda a crear una suspensión estable del abrasivo en la cavidad bucal permitiendo una limpieza efectiva, además que las personas prefieren dentífricos que además de limpiar produzca espuma de manera abundante, proporcionando así una agradable sensación en la boca durante su uso (Rosales Contreras, et al., 2014).

### 3.7.6.3 Resultados del análisis sensorial de la pasta dental

Los parámetros sensoriales fueron evaluados por diez panelistas seleccionados al azar, utilizando una escala de preferencia de Likert, de 1 a 5 puntos. Donde 1 corresponde a me disgusta mucho y 5 a me gusta mucho.

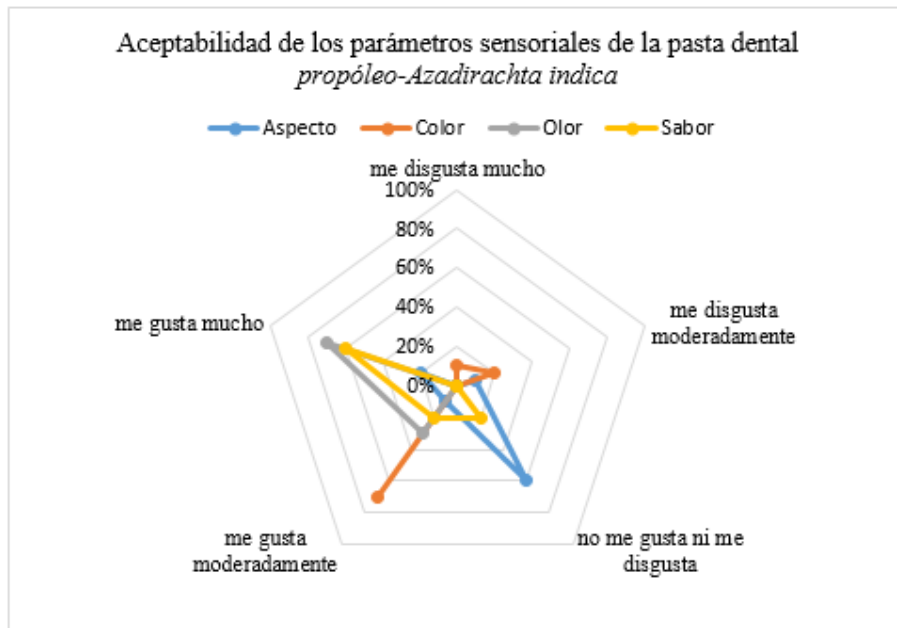
La valoración de los 10 panelistas para cada parámetro se encuentra en la siguiente tabla

**Tabla 11-3:** Resultados de análisis sensorial.

Parámetro	Valoración para cada parámetro				
	me disgusta mucho	me disgusta moderadamente	no me gusta ni me disgusta	me gusta moderadamente	me gusta mucho
Aspecto	0 %	10 %	60 %	10 %	20 %
Color	10 %	20 %	0 %	70 %	0 %
Olor	0 %	0 %	0 %	30 %	70 %
Sabor	0 %	0 %	20 %	20 %	60 %

Realizado por: Pilar Minta, 2019

A continuación se presenta la gráfica de la aceptabilidad de los parámetros sensoriales de la pasta dental.



**Gráfica 5-3:** Aceptabilidad de los parámetros sensoriales de la pasta dental propóleo- *A. indica*.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

En la gráfica anterior se observa que al 60 % de los panelistas el aspecto de la pasta dental les pareció indiferente, al 70% de los panelistas el color de la formulación les gustó moderadamente pero al 30 % les disgustó esto puede ser debido al efecto psicológico sobre el color de las pastas dentales normalmente utilizadas. El olor y el sabor de la formulación presentaron una alta aceptabilidad puesto que a la mayoría de los panelistas les gustó mucho esto se puede deber al uso de esencia de menta como saborizante y aromatizante.

Las características sensoriales de la fórmula dentífrica desarrollada alcanzan una aceptabilidad sobre el 60 % de los panelistas.

### 3.8 Socialización del proceso de obtención de propóleo, método de campo para la evaluación antibiótica y antimicótica del propóleo en ASOPROACH.

La socialización a ASOPROACH se realizó en las instalaciones del centro de Bioenergía molecular, el día jueves 21 de diciembre del 2018 a las 14:00 horas con el aval del Decano de la Facultad de Ciencias. Se realizó la presentación de productos y una conferencia magistral sobre el procedimiento de obtención de propóleo blando, metodología de campo para determinar la actividad antimicótica y antibiótica del propóleo y la elaboración de la pasta dental del propóleo y *Azadirachta indica* (Neem). (ANEXO R-S)

## CONCLUSIONES

- La calidad del propóleo crudo se asegura con una recolección adecuada de este material siguiendo las especificaciones técnicas de la Normativa Salvadoreña 2003 NSO 65.19.02.03.
- El extracto blando de propóleo con características de calidad antibacteriana, antimicótica y alta pureza exige el empleo de propóleo crudo limpio, pulverizado y libre de solvente.
- El extracto blando de propóleo debe mantenerse estabilizado en condiciones de ausencia de etanol, obscuridad y en refrigeración
- La concentración inhibitoria mínima del propóleo muestra actividad sobre *Sacharomyces cerevisiae* a una concentración de 12,5 mg/mL determinada por el método de macro dilución en caldo.
- El método de campo diseñado para determinar la actividad antimicótica del propóleo sobre *S.cerevisiae*, mediante su capacidad fermentativa en sacarosa al 40% evidencia que 12,5 mg/mL de extracto alcohólico de propóleo, inhibe a *S. cerevisiae*, coincidiendo con el resultado *in vitro*, la actividad antibiótica del mismo extracto se evidencia al reducir notablemente el nivel de viables (*Aerobios mesófilos*) presentes en la leche sometidas al ensayo.
- El CO<sub>2</sub> producto de la fermentación alcohólica de *S.cerevisiae* en sacarosa al 40 % y el tiempo de coagulación de la caseína permiten evaluar el efecto del extracto de propóleo como antimicótico sobre *S. cerevisiae* y antibacteriano sobre la microbiota ácido láctica natural de la leche.
- El empleo de 1,25 g/mL de extracto blando de propóleo y 16 g de una infusión de *A.indica* al 10 % como principios activos de una formula unitaria de 100 g de dentífrico requiere la adición de excipientes que se incorporan mediante mezclas apropiadas para obtener una pasta dental con actividad antibiótica y antimicótica prevista, así como las características bioactivas reportadas para *A.indica*.
- Es importante la socialización puntual a los socios de ASOPROACH sobre la metodología de obtención de propóleo blando activo, ejecución de metodología de valoración de su actividad antibiótica, antimicótica y elaboración de la pasta dental.

## RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio preliminar sobre el diseño y desarrollo de métodos de campo para evaluar la actividad antibiótica y antimicótica de un extracto alcohólico de propóleo será posible más adelante:

- Evaluar *in vitro* e *in vivo* la capacidad del propóleo como conservante de distintas matrices.
- Evaluar *in vivo*, en infecciones orales la actividad antibacteriana y antimicótica de la pasta dental elaborada en este trabajo.
- Preparar un enjuague bucal a partir del propóleo y evaluar su actividad antimicrobiana.

## **GLOSARIO**

CIM: Concentración inhibitoria mínima.

UPC: Unidades Propagadoras de Colonia.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

BPM: Buenas prácticas de manufactura.

ASOPROACH: Asociación de producción apícola de Chimborazo

PCA: Plate Count Agar ( Recuento en placa de agar)

## BIBLIOGRAFÍA

**Acevedo, C., et al.** "ACTIVIDAD DE DISTINTAS PRESENTACIONES COMERCIALES DE SACCHAROMYCES BOULARDII". *Revista Chilena de Nutrición* [en línea], 2004.(Chile), Vol. 31 (1), pp. 33-38.[Consulta: 12 enero 2018].ISSN 0717-7518. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182004000100004](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004000100004)

**Akeel, R., et al.** "Analysis of anti-bacterial and antioxidative activity of Azadirachta indica bark using various solvents extracts". *Saudi Journal of Biological Sciences* [en línea], 2017, Vol. 24(1), pp.11-14.[Consulta:23enero2018].ISSN1319562X.Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.08.006>

**Aymar a, J., et al.** "Acción Anticariog nica del Propóleo". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [en línea], 2018.(Argentina)Vol. 55(2), pp. 19-22. [Consulta: 13 noviembre 2018]. ISSN 19420994.Disponible en: <https://www.ateneodontologia.org.ar/articulos/lviii01/articulo5.pdf>

**Carrillo, L., et al.** *Levaduras*. En: *Manual de microbiología de alimentos*[en línea]. Primera ed. San Salvador de Jujuy:- Alberdi,2007. [Consulta: 10 octubre 2017]. Disponible en: <https://docplayer.es/6090599-Levaduras-manual-de-microbiologia-de-los-alimentos-capitulo-4.html>

**Carrillo, M., et al.** "Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina ". *Scielo* [en línea],2011,(México)Vol. 22(5), pp. 21-28. [Consulta: 13 noviembre 2018]. ISSN 0718-0764.Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642011000500004](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642011000500004)

**Cayuela , M. & Serrano, J.** " Propóleo: aplicaciones terapéuticas". *Medicatrix*[en línea],2003,Vol. 21(2), pp. 94-96. [Consulta: 13 noviembre 2018].ISSN 94-104.Disponible en: [file:///C:/Users/usuario/Downloads/Dialnet-Propoleo-4956307%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/Dialnet-Propoleo-4956307%20(1).pdf)

**CEDEÑO CARPIO, XAVIER.** Evaluación de propóleo como conservante natural en la leche chocolatada [en línea] (Tesis).(Maestria) Instituto Tecnológico de Leiria .2018.pp.36-46 [Consulta:

19 diciembre 2018]. Disponible en:

<https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/3476/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20prop%C3%B3leos%20como%20conservante%20natural%20en%20la%20leche%20chocolatada.pdf>

**Chandra, S.,et,al."** Neem (Azadirachta indica ): An indian traditional panacea with modern molecular basis". *Phytomedicine* [en línea],2017. Vol .34, pp. 14-20. [Consulta: 9 octubre 2018].ISSN 1618095X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.001>

**Corrales, L.,et,al.** "Bacterias anaerobias: Procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta". *NOVA*[en línea], 2015.Vol .13(23), p. 61. [Consulta: 9 abril 2018] ISSN 2462-9448. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a06.pdf>

**Cuesta, O.,et ,al.** "Chemical profile and antileishmanial activity of three Ecuadorian propolis samples from Quito,Guayaquil and Cotacachi regions".*Fitoterapia* [en línea], 2017, (Ecuador) Vol. 120, pp. 177-183. [Consulta: 10 mayo 2018].ISSN 18736971. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.016>

**Galvez,D.,et,al.** "La actividad microbiana en la fermentaciòn ruminal y el efecto de la adiciòn de *Saccharomyces cerevisiae*". *Notas* [en línea], 2007.Vol.11(32),pp. 51-62. [Consulta: 10 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.utm.mx/temas/temas-docs/nota3t32.pdf>

**Garcia,Harris.,** *ODONTOLOGIA PREVENTIVA PRIMARIA* [en línea]. segunda ed. Buenos Aires-Argentina : MANUAL MODERNO,2006. [Consulta: 10 septiembre 2017].Disponible en : <https://books.google.com.ec/books?id=a4THCQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Garcia,Harris.,+ODONTOLOGIA+PREVENTIVA+PRIMARIA.&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwigg-W32f3fAhXOnuAKHWUwB68Q6AEIKDAA#v=onepage&q=Garcia%20Harris.%20%20ODONTOLOGIA%20PREVENTIVA%20PRIMARIA.&f=false>

**Gonzalez, S.,et,al."** Epidemiología de la caries dental en la población venezolana menor de 19 años" *Revista de ciencias medicas La Habana*,[en línea],2014,(Cuba) Vol. 14(1), pp. 42-48. [Consulta: 10 septiembre 2017]. ISSN: 1029-3019. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/pdf/3684/368445237008.pdf>

**Hernández, A., Alfaro, I. & Arrieta, D.** *Microbiología Industrial* [en línea]. primera ed. San Jose-Costa Rica: Universidad estatal a distancia, 2003. [Consulta: 10 mayo 2018]. Disponible en : [https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PR6&dq=Microbiologia+Industrial.+Hernandez+ALICIA&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjTr\\_240\\_3fAhVSdt8KHSqtCdwQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Microbiologia%20Industrial.%20Hernandez%20ALICIA&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PR6&dq=Microbiologia+Industrial.+Hernandez+ALICIA&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjTr_240_3fAhVSdt8KHSqtCdwQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Microbiologia%20Industrial.%20Hernandez%20ALICIA&f=false)

**INEN, 2015.** *Norma inen 2794 para productos de apicultura. Propòleo*, s.l.: s.n.

**In-Kyoung, L., et, al.** "Phenylpropanoid acid esters from Korean propolis and their antioxidant activities". *ELSERVIER*, [en línea], 2014 , Vol.24(15), p. 3504. [Consulta: 08 mayo 2018] ISSN 18736971. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.065>

**Joya , M., et, al.** " Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de cepas del género Candida". *Tecnología*, [en línea], 2017, Vol 30(3), pp. 3-11. [Consulta: 08 mayo 2018]. 10.18845/tm.v30i3.3268. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v30n3/0379-3982-tem-30-03-00003.pdf>

**Muñoz, L., et, al.** "PROPIEDADES DEL PROPÓLEO COMO ADITIVO NATURAL FUNCIONAL EN LA NUTRICIÓN ANIMAL". *SciELO*, [en línea], 2016. Vol. 10(2), pp. 1-3. [Consulta: 14 mayo 2018] ISSN 1657-9550. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S165795502011000200010&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S165795502011000200010&script=sci_abstract&tlng=es)

**Ministerio de salud publica.** *Caries: Guía práctica Clínica (GPC)*[en línea]. Primera ed. Quito-Ecuador: Dirección Nacional de Normatización, 2017. [Consulta: 18 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2014/05/CARIES.pdf>

**Miñana, V., et, al.** "Promoción de la salud bucodental". *Revista Pediatría de Atención Primaria* [en línea], 2011(Madrid) Vol, XIII(51), p. 436. [Consulta: 14 marzo 2018] ISSN1139-7632. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322011000300010](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322011000300010)



**Muñoz Sánchez, J.,"** Higiene bucodental. Pastas dentífricas y enjuagues bucales". *ELSEVIER*[en línea], 2009 Vol.19(3), pp. 1-171. [Consulta: 18 marzo 2018] .ISSN 0212-047X. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-15465>

**Norma Ramal de agricultura Cubana,** 1994.. *Extractos de Propóleos. Especificaciones. NRAG,* La Habana: s.n.

**NSO 67.03.01:01.** *Norma Salvadoreña para Calidad De Propoleo Crudo.* San Salvador, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.2003

**NT INEN 1602, 2014.** *Requisitos para las pastas dentales.*

**Ochoa, A., et al."**Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Redalyc* [en línea] 2013, (México) Vol.44(1), pp. 52-59. [Consulta: 18 marzo 2018] ISSN1139-7632 .Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57929946007.pdf>

**OMS.** *Salud Bucodental Nota informativa N° 318*[en línea],2012. [Consulta: 15 marzo 2018].Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>

**Padró Rodríguez, L. y Chil Nuñez, I.**Caracterización preliminar de la jalea de propóleos al 10 % para uso estomatológico. *Revista cubana de Química* [en línea]2014,(Cuba) Vol.26(2), pp. 147-158. [Consulta: 16 marzo 2018] ISSN 2224-5421 .Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2224-54212014000200007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2224-54212014000200007)

**Padrón González,et.al.** "El propóleo una alternativa de todos los tiempos". *Pinareña,* [en línea]2012,p. 3. [Consulta: 20 marzo 2018].ISSN 1990-7990.Disponible en: [file:///C:/Users/usuario/Downloads/117-232-1-SM%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/117-232-1-SM%20(2).pdf)

**Pandey, G.,et.al."** Evaluation of phytochemical, antibacterial and free radical scavenging properties of *Azadirachta indica* (Neem) leaves". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*

*Sciences*[en línea] 2014. Vol.6(2), pp. 444-447. [Consulta: 20 marzo 2018].ISSN 09751491.Disponible en: file:///C:/Users/usuario/Downloads/Neem.pdf

**Picazo, J. J.,***Metodos especiales para el estudio de las sensibilidad de los antimicrobianos.* En: *Procedimientos en microbiología* [en línea] 2001. [Consulta: 20 marzo 2018] Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

**Rojas Silva, M.,et,al.** "Determinación de propiedades fisicoquímicas de propóleos provenientes de cinco especies de abejas sin aguijón de Norte de Santander-Colombia". *Bistua*, [en línea] 2016 .Vol. 14(1), pp. 3-16. [Consulta: 16 marzo 2018]. Disponible en: [http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs\\_viceinves/index.php/BISTUA/article/view/1928](http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/BISTUA/article/view/1928)

**Rosales Contreras, J.,et,al.** "Dentrificos fluorados: composición". *VERTIENTES*, [en línea] 2014.Vol. 17(2), pp. 114-119. [Consulta: 21 mayo 2017] .Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2014/vre142g.pdf>

**Rúa, M.,***Ficha técnica de Azadirachta Indica* [en línea].1 ed. Colombia: Catálogo de Arbóreas,2017.[Consulta: 21 mayo 2018].Disponible en: <https://culturaempresarialganadera.files.wordpress.com/2017/02/ft-azadirachta-indica-neem-ceg-2017-mrf.pdf>

**Salamanca Grosso , G.,** *Origen, naturaleza,propiedades fisicoquímicasy valor terapéutico del propoleo* [en línea].Tolima-Colombia:Univeridad de tolima, 2018.[Consulta: 02 enero 2019].Disponible en: file:///C:/Users/usuario/Downloads/Ch10Propoleo.pdf

**Samara Ortega, N.**"Actividad Antibacteriana y Composición Cualitativa de Propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca". *Bioteología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, [en línea] 2011., Vol.9(1), pp. 8-16. [Consulta: 22 julio 2018].Disponible en: file:///C:/Users/usuario/Downloads/Dialnet-ActividadAntibacterianaYComposicionCualitativaDePr-6117879%20(1).pdf

**Sánchez ,V y Urrutía, T.,** "El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria".*Redalyc* [en línea].2013 .(España) Vol.38, pp. 705-711. [Consulta: 22 julio 2018]  
Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/339/33929482003/>

**Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos,** 2008. *Código alimentario Argentino*, Argentina: Resolución conjunta.

**Souto Román , M.,et,al.,** Eficacia de la aplicación del propóleo al 8 % en alveolitis dentaria..*Multimed*, [en línea],2016,(Cuba),Vol. 20(83), pp. 83-94. [Consulta: 22 julio 2018.ISSN 1028-4818  
Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/multimed/mul-2016/mul165g.pdf>

**Suárez Machin , C.,et,al.,** "Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol Revisión bibliográfica",*Redalyc*, [en línea],2016,(Cuba) Vol.50(1), pp. 20-28. [Consulta: 22 julio 2018. ISSN 0138-6204 <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>

**Suarez Quinodoz, M. A.,et,al.,** "Propiedades del Propóleo y su relación". *DIVULGACIÓN*, [en línea], 2013, Vol. VI(1), pp. 21-26. [Consulta: 16 marzo 2018]. ISSN1668-7280.Disponible en: [file:///C:/Users/usuario/Downloads/1684-4516-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/1684-4516-1-PB%20(1).pdf)

**Thimann, R. y Manrique, A. J.,**" Recolección de propóleos en colonias de abejas africanizadas durante la temporada de lluvias en Guanare", *SCielo* [en línea],2002,(Venezuela)Vol.20(4),p.2.[Consulta: 16 marzo 2018].ISSN 0798-7269.Disponible en: [http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692002000400006](http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692002000400006)

**Ulloa, J. A. ,et,al.,** La miel de abeja y su importancia. *Fuente*[en línea], 2010,Vol.2(4), pp. 11-18.[Consulta: 16 marzo 2018].ISSN 2007 - 0713.Disponible en:  
<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/01-04/2.pdf>

**Vaculik , P. et,al.,**Aplicación del Propóleo en Ciencias de la salud.. *Divulgación*[en línea], 2011,Vol.4(1) pp. 43-47. [Consulta: 20 marzo 2018].Disponible en :<file:///C:/Users/usuario/Downloads/984-2686-1-PB.pdf>

**Valencia, E., et, al.**, "EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SAPONINAS EN *Agaricus bisporus*". *Biotempo* [en línea], (Mexico) Vol. 5, pp. 31-36. [Consulta: 17 junio 2018]. Disponible en:

<http://www.urp.edu.pe/pdf/biologia/SAPONINAS.pdf>

**Vargas Sanchez, R.**. "El propóleos : conservador potencial para la industria alimentaria". *Interciencia* [en línea] 2013, ( España )Vol.38(10), pp. 705-711. [Consulta: 20 marzo 2018] ISSN 0378-1844. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/339/33929482003/>

**Zhang, H., et, al .,**"Enhanced antioxidant activity and in vitro release of propolis by acid induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan". *ELSEVIER* [en línea], 2018. Vol.81, pp. 104-112.[Consulta: 20 marzo 2018]. ISSN 2018.02.019. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X17320490>

## ANEXOS

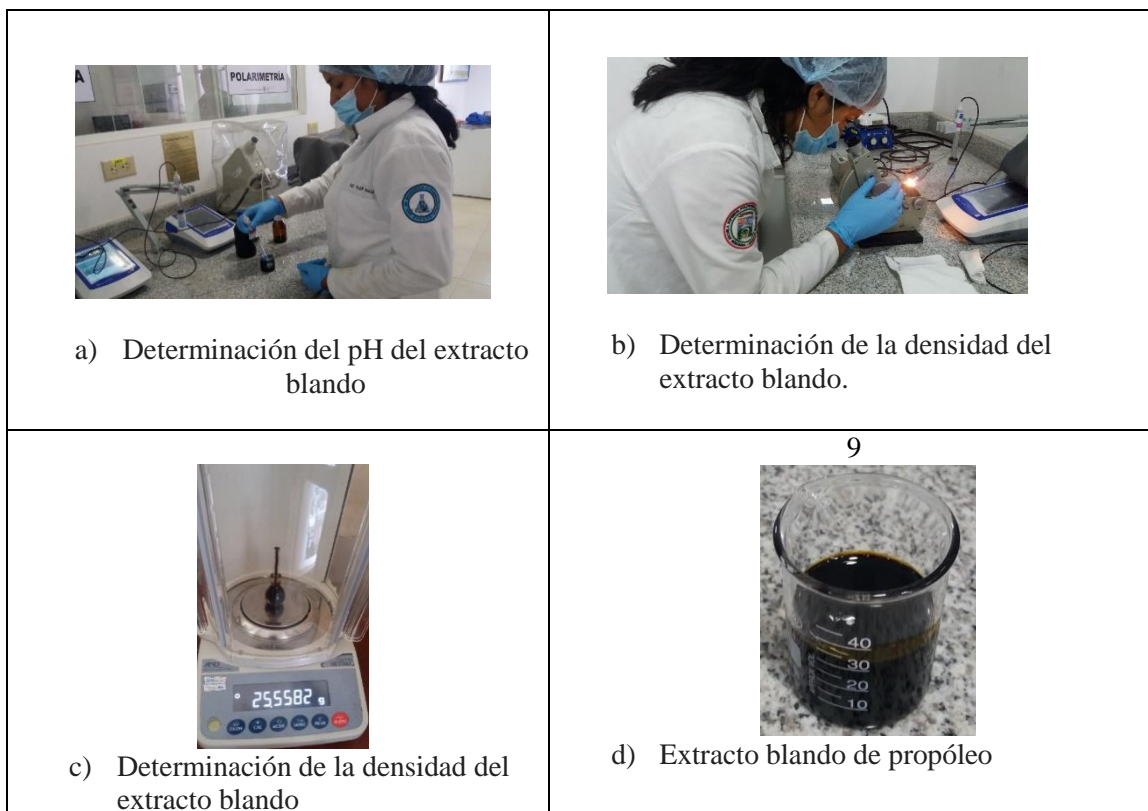
### Anexo A: Obtención del extracto blando de propóleo.

 <p>a) Propóleo bruto</p>	 <p>b) Congelamiento de propóleo</p>
 <p>c) Pulverización del propóleo</p>	 <p>d) Propóleo pulverizado</p>
 <p>e) Preparación del extracto de propóleo</p>	 <p>f) Maceración del extracto</p>
 <p>g) Filtración del extracto del propóleo</p>	 <p>h) Sonnicación del extracto de propóleo</p>
 <p>i) Concentración del extracto de propóleo</p>	 <p>j) Almacenamiento del extracto blando de propóleo</p>

**Fotografía 1-4:** Obtención de extracto blando de propóleo.

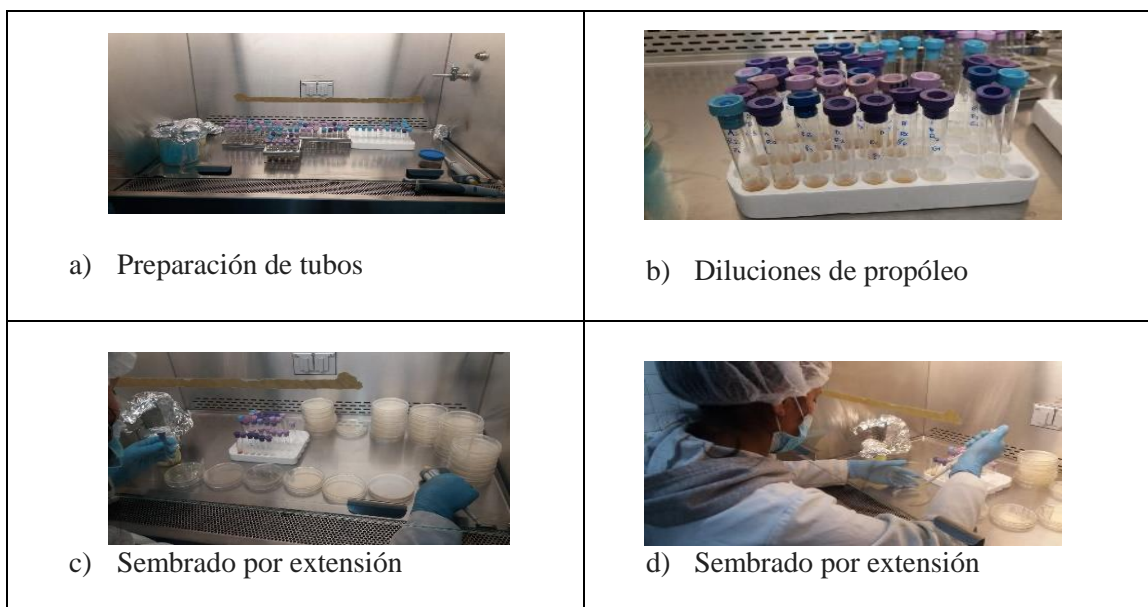
Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo B:** Control de calidad físico-químico del extracto blando de propóleo.



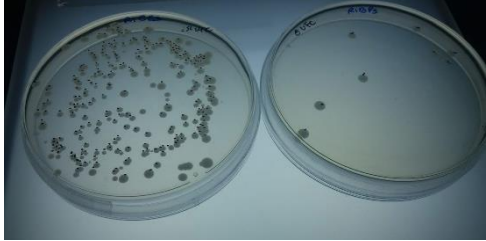
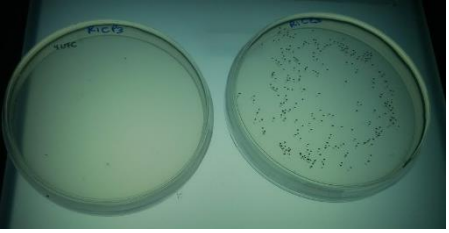

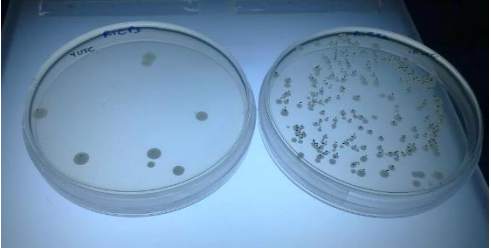
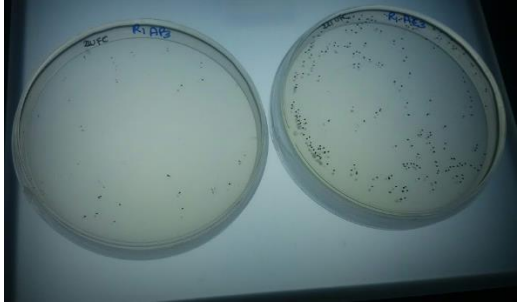
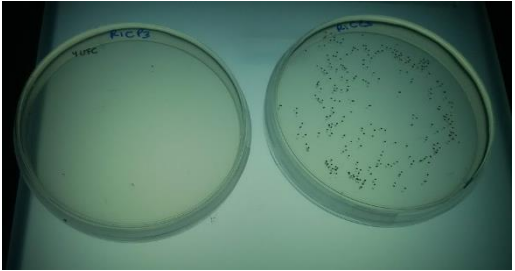
**Fotografía 2-4:** Control de calidad físico-químico del extracto blando de propóleo  
Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo C:** Determinación de la actividad antimicótica del propóleo



**Fotografía 2-4:** Fotos de la determinación de la actividad antimicótica del propóleo sobre *S. cerevisiae*.  
Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo D:** UFC de *Saccharomyces cerevisiae* por el método de macrodilución en caldo

	
<p>a) UFC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tubo 3 para propóleo y etanol</p>	<p>b) UFC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tubo 3 para propóleo y etanol</p>
	
<p>c) UFC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tubo 3 para propóleo y etanol</p>	<p>d) UFC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tubo 3 para propóleo y etanol</p>
	
<p>e) UFC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tubo 3 para propóleo y etanol</p>	<p>f) UFC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tubo 3 para propóleo y etanol</p>

**Fotografía 3-4:** UPC de *Saccharomyces cerevisiae* en el método de macrodilución en caldo.

Realizado por: Pilar Minta, 2019



**Anexo E:** Sustento para la propuesta del método de campo de actividad antimicótica para propóleo



a) Preparación de la solución de sacarosa



b) Preparación de tubos



c) Absorción de cada tubo con jeringuillas



d) Eliminación de burbujas de las jeringuillas



e) Sellado de las Jeringuillas



f) Incubación de jeringuillas

**Fotografía 4-4:** Metodología de evaluación antimicótica del propóleo por el método de campo.

Realizado por: Pilar Minta, 2019



**Anexo F:** Preparación de frascos de leche cruda con propóleo, etanol y el blanco



Preparación de frascos de leche con propóleos

**Fotografía 5-4:** Metodología de evaluación antibiótica del propóleo.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo G:** Frascos experimentales.



Frascos experimentales

**Fotografía 6-4:** Frascos experimentales.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo H:** Recuento de UFC de *Aerobios mesófilos* en leche cruda.

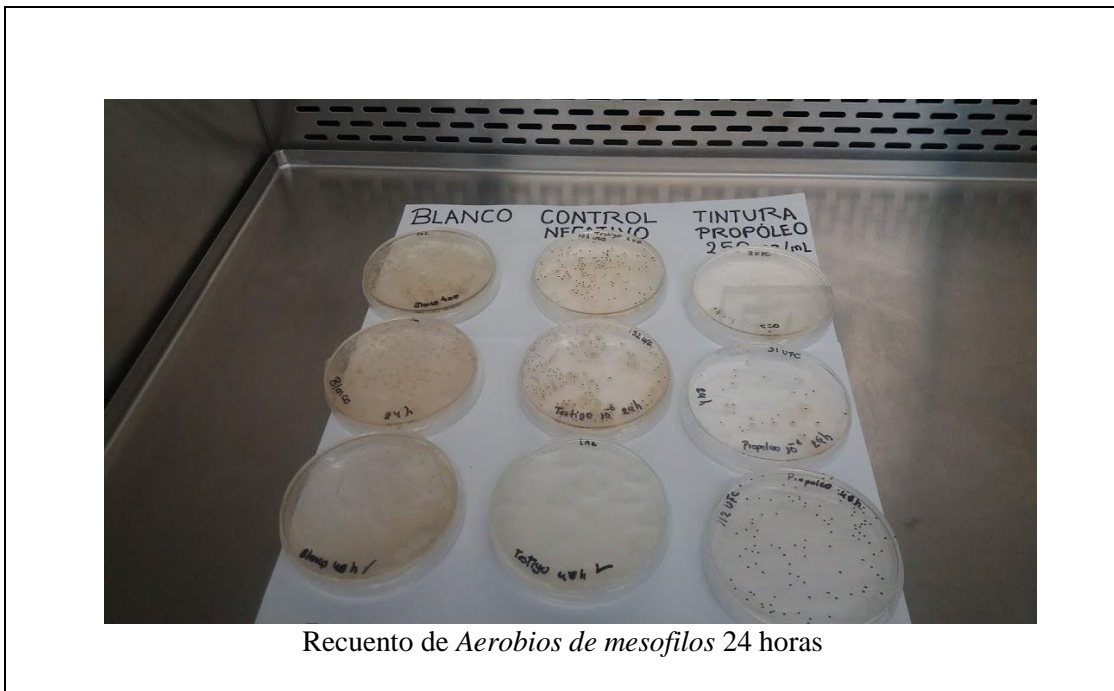


Recuento de *Aerobios mesófilos* 0 horas

**Fotografía 7-4:** Recuento de UPC de *Aerobios mesófilos* 0 horas.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo I:** Recuento de *Aerobios mesófilos* en leche cruda tras 24 horas de incubación.



Recuento de *Aerobios de mesofilos* 24 horas

**Fotografía 8-4:** Recuento de *Aerobios mesófilos* en la leche cruda tras 24 horas de incubación.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo J:** Resultados de la precipitación de la caseína de la leche.



**Fotografía 9-4:** Coagulación de la caseína en muestras con etanol y propóleo.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo K:** Preparación de la infusión de *Azadirachta indica*.



a) Hojas de *Azadirachta indica* pulverizada



b) Preparación de la infusión

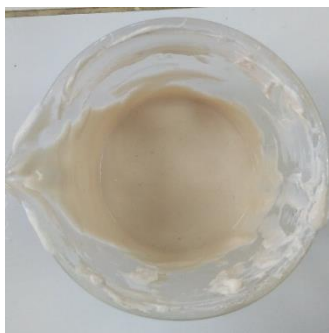


c) Filtración de la infusión

**Fotografía 10-4:** Preparación de la infusión de *Azadirachta indica*.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

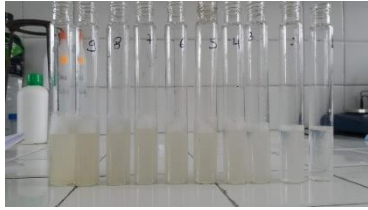
**Anexo L:** Elaboración de la pasta dental de propóleo-*Azadirachta indica*.



a) Preparación de la pasta dental



b) Determinación de pH de la pasta dental



c) Determinación del índice afrosimétrico



d) Aceptabilidad de la pasta dental

**Fotografía 11-4:** Elaboración de la pasta dental.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo M:** Socialización en ASOPROACH.



Socialización en ASOPROACH

**Fotografía 12-4:** Socialización de resultados en ASOPROACH.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo N:** Resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria del propóleo sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>																																									
Diluciones para propóleo																		Diluciones para etanol																							
T	[ ]	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3			Réplica 4			Réplica 5			Réplica 6			[ ]	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3			Réplica 4			Réplica 5			Réplica 6					
	P (mg/mL)	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	E (%)	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
T <sub>1</sub>	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	47,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T <sub>2</sub>	G25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T <sub>3</sub>	12,5	8	6	7	7	8	5	7	5	5	8	7	5	5	7	5	8	6	6	11,87	221	256	279	146	220	268	271	264	269	279	272	258	261	274	256	278	272	269			
T <sub>4</sub>	6.25	96	94	96	93	96	95	96	97	95	96	95	96	93	95	97	96	95	97	5,93	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
T <sub>5</sub>	3.12	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	2,96	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
T <sub>6</sub>	1.52	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	1,48	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
		T: Tratamiento						[ ]: Concentración						E: Etanol						R: Repetición						P: Propóleo															

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo O:** Tabla de resultados del tiempo de fermentación de las jeringuillas del método de campo

Tiempo de fermentación (horas)									
Tratamientos	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Propóleo ( 12,5 mg/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Etanol ( 95 %)	101	103	104	107,5	104,5	111,5	104,5	104	102
Blanco	41,5	38,5	40	41	34	41,5	33	34	32
R=Repetición									

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo P:** Resultados del recuento de *Aerobios mesófilos* de muestras de leche con propóleo, etanol y el blanco.

UFC ( 10 <sup>-4</sup> ) <i>Aerobios mesófilos</i>																		
Tratamientos	t = 0 HORAS									t = 24 HORAS								
	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3			Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Propóleo (12,5 mg/mL)	3	9	9	24	20	27	5	7	10	55	43	32	112	152	121	57	49	51
Etanol (95 %)	19	17	13	51	38	41	48	54	35	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Blanco	23	31	51	77	63	79	64	76	70	300	300	300	300	300	300	300	300	300
R= Repetición																		

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

**Anexo Q:** Resultados del tiempo de estabilización de la caseína en muestras de leche con propóleo, etanol y el blanco.

Tiempo de desestabilización de la leche a temperatura ambiente ( HORAS )									
Tratamientos	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Propóleo (12,5mg/MI)	76	79	87	83	77	95	94	79	88
Etanol 95%	45	48	47	51	50	57	48	49	58
Blanco	27	24	29	31	29	27	30	29	32
R = Repetición									

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Pilar Minta, 2019

## Anexo R: Certificado de socialización en ASOPROACH.

### CERTIFICADO

A petición de parte interesada, certifico que el día 20 de Diciembre del 2018, 14h00, se realizó la socialización de resultados a los miembros de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo, de los dos trabajos de titulación del proyecto interinstitucional (ESPOCH, SAGID, ASOPROACH), titulado "ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO, PARA EL DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO", los trabajos socializados fueron:

- ✓ OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA (*Apis mellifera*) PARA ASEGURAR AUSENCIA DE MOHOS Y LEVADURAS, PARA APLICACIONES MEDICINALES.  
Autor. Crislina Daquilema. (Tesisista)
- ✓ DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA Y ANTIMICÓTICA PARA PROPÓLEOS Y SU UTILIZACIÓN ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (Neem) PARA LA ELABORACIÓN DE UNA PASTA DENTAL.  
Autor. Pilar Minta. (Tesisista)

Particular que certifico, pudiendo los interesados hacer uso necesario del presente certificado

Riobamba 11 de enero del 2019



Dr. Eduardo Fonseca.  
PRESIDENTE ASOPROACH



**Anexo S: Aval para la realizar la socialización en ASOPROACH.**



**ESPOCH**

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES

Diciembre, 18 de 2018  
Oficio 0284 FC.INV.2018

Doctor  
Carlos Pílamunga  
**DIRECTOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN SAGID**  
Presente

De mi consideración:

Con un saludo cordial, en atención al Oficio N° 009-2018-PROY MIEL SAGID, mediante el cual solicita el Aval para la fase de socialización de los resultados generados en el proyecto de investigación titulado **"ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO, PARA EL DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO"** y de interés en la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo (ASOPROACH), sobre los trabajos de titulación siguientes:

- OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA (*Apis mellifera*) PARA ASEGURAR AUSENCIA DE MOHOS Y LEVADURAS, PARA APLICACIONES MEDICINALES. Autor: Cristina Daquilema (Tesisista).
- DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA PARA PROPÓLEOS Y SU UTILIZACIÓN ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (Neem) PARA LA ELABORACIÓN DE UNA PASTA DENTAL. Autor: Pilar Minta (Tesisista).

A tal pedido se concede el Aval para la socialización de los trabajos de titulación mencionados anteriormente a los miembros de (ASOPROACH), que se realizará el día 20 de diciembre del 2018, en los altos de la Farmacia Silvana de la dolorosa en horario de 14h00.

Particular que informo para los fines pertinentes.

Atentamente,  
"SABER PARA SER"

  
Dr. Fernando Catuna  
**DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**

Estheio C.

