

**DETERMINACION *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE
EXTRACTOS DE PROPOLEOS PROVENIENTES DE APIARIOS
LOCALIZADOS EN DOS MUNICIPIOS DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

NANCY SAMARA ORTEGA GOMEZ



UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYAN
2009

**DETERMINACION *in Vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE
EXTRACTOS DE PROPOLEOS PROVENIENTES DE APIARIOS
LOCALIZADOS EN DOS MUNICIPIOS DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

NANCY SAMARA ORTEGA GOMEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Directora:
Neyla Benítez Campo, M.Sc.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYAN
2009

Nota de Aceptación

Directora Msc. Neyla Benítez Campo

Jurado PhD. Fabio Antonio Cabezas

Jurado Msc. Maria Isaura Valdivieso

Popayán, Abril 17 de 2009

DEDICATORIA

A Dios porque nunca me abandonó en mi esfuerzo por aprender;

A la memoria de mi abuelito quien con su cariño y apoyo creo en mí el amor al estudio;

A mis padres quienes me acompañaron en los momentos difíciles e hicieron lo necesario para darme el estudio y la educación;

A mi familia por su fe, tolerancia, paciencia y amor;

A mis profesores por sus valiosas enseñanzas y a todos mis compañeros por su apoyo y su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la sociedad de apicultores del Cauca por los documentos facilitados y a los apicultores que hacen parte de ella porque nos brindaron su consideración y apoyo.

A Darwin Hoyos y Jhon Meléndez, tecnólogos del laboratorio de Biología de la Universidad del Cauca quienes contribuyeron enormemente al desarrollo de este trabajo, por el compromiso con el que me facilitaron los implementos dentro del laboratorio y por la ayuda en el área química y biológica.

A la profesora Neyla Benítez por la paciencia, apoyo, incentivo, y sugerencias compartidas para terminar esta investigación.

Al profesor Silvio Carvajal por la inmensa colaboración que me ofreció para entender el manejo de datos y trabajar la estadística de este trabajo.

Al profesor Nelson Rojas por sus valiosas experiencias y disposición en facilitarme las instalaciones, equipos y reactivos del laboratorio de biología molecular para algunos análisis, y por la asesoría prestada a lo largo de este trabajo.

Al profesor Fabio Cabezas y a los muchachos del grupo QCB (Química de Compuestos Bioactivos) por su ayuda y su adecuada orientación sobre el análisis fitoquímico, el cual fue muy importante en el desarrollo de esta investigación.

A la bacterióloga Lisbety García, de la facultad de ciencias de la salud, por la diligencia con la cual me suministraron las bacterias objeto de este trabajo.

A Manuel Antonio Parra, Elisa Londoño y Jorge Ortega por brindarme su colaboración en el laboratorio para el desarrollo de las pruebas.

A los compañeros del énfasis de biología molecular, del área de biología, todos mis profesores, y a todas aquellas personas que se hicieron partícipes por su constante ayuda y apoyo.

RESUMEN

El propóleo es una mezcla con propiedades biológicas entre las cuales se destaca principalmente su uso como bactericida natural, debido a los compuestos químicos de origen vegetal presentes en su constitución la cual puede variar principalmente por el método de colecta y la localización geográfica de la región de origen por la variedad en la vegetación disponible para las abejas.

En el presente trabajo se estudiaron dos extractos etanólicos de propóleo (EEP) provenientes de apiarios del Departamento del Cauca ubicados en los Municipios de Totoró y Buenos Aires respectivamente los cuales se encuentran en diferentes zonas de vida, con el objetivo de evaluar su actividad antimicrobiana frente a una bacteria Gram positiva y otra Gram negativa mediante el método de concentración mínima bactericida (CMB). Para el análisis de los datos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se aplicó una prueba de comparaciones múltiples T3 de Dunnett. Además se hizo una comparación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los propóleos por pruebas de reacciones coloridas, cromatografía bidimensional y cromatografía de capa delgada.

Los resultados obtenidos en la prueba mostraron que ambos extractos de propóleo tuvieron un efecto bactericida comparados con el control negativo (etanol) que fue el solvente del propóleo, además se observó una diferenciación en cuanto a la actividad antimicrobiana entre los dos propóleos, determinándose que el EEP de Buenos Aires fue más efectivo que el de Totoró frente a la bacteria Gram negativa, (*Pseudomonas aeruginosa*), al presentar mayor actividad antimicrobiana frente al EEP de Totoró ($p < 0,05$), mientras que para la bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) el análisis estadístico en la CMB no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en el efecto bactericida de los dos extractos. Estos resultados fueron conformes con la mayor complejidad química encontrada en el propóleo de Buenos Aires, mediante pruebas de identificación de metabolitos secundarios que fueron realizadas a los dos extractos, pudiendo concluir que la actividad antibacteriana del propóleo depende de la región geográfica en que este sea producido.

Palabras clave: Propóleos, Totoró, Buenos Aires, Actividad antimicrobiana.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	16
1. ANTECEDENTES	19
2. MARCO TEORICO	21
2.1 PROPOLEO	21
2.1.1 Origen.	21
2.1.2 Composición química.	22
2.1.2.1 Compuestos fenólicos.	24
2.1.3 Recolección.	25
2.1.4 Propiedades antimicrobianas.	26
2.2 BACTERIAS UTILIZADAS	27
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .	27
2.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	28

3. METODOLOGIA	30
3.1 OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO	30
3.1.1 Descripción del sitio de donde provienen las muestras.	30
3.1.1.1 Municipio de Buenos Aires.	30
3.1.1.2 Municipio de Totoró.	31
3.2 VEGETACION PREDOMINANTE EN BUENOS AIRES Y TOTORO	32
3.3 DESCRIPCION MACROSCOPICA DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO	34
3.4 MICROORGANISMOS	34
3.5 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS	35
3.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	36
3.6.1 Preparación del inóculo bacteriano.	36
3.6.2 Pruebas de inhibición del desarrollo bacteriano.	36
3.7 COMPARACION CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DEL PROPOLEO	40
3.7.1 Pruebas para determinar flavonoides	40

3.7.1.1 Prueba de Shinoda.	40
3.7.1.2 Prueba de hidróxido de sodio.	40
3.7.2 Prueba para determinar alcaloides	40
3.7.2.1 Prueba de Dragendorff.	40
3.7.3 Prueba para determinar esteroides	40
3.7.3.1 Prueba de Lieberman-Buchard.	40
3.7.4 Prueba de cumarinas.	40
3.7.5 Cromatografía bidimensional.	41
3.7.6 Cromatografía en capa delgada (CCD).	44
3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL	44
4 RESULTADOS	45
4.1 DESCRIPCION DE LAS MUESTRAS Y LOS EXTRACTOS DE PROPOLEO	45
4.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	45
4.3 COMPARACION CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DE LOS	52

PROPOLEOS

5. DISCUSION	59
5.1 DESCRIPCION MACROSCOPICA DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO	59
5.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	59
5.3 COMPARACION CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DEL PROPOLEO	61
6. CONCLUSIONES	65
7. RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFIA	68
ANEXOS	78

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición de diversos propóleos europeos	24
Tabla 2. Especies vegetales reportadas para el municipio de Buenos Aires	32
Tabla 3. Especies vegetales reportadas para el municipio de Totoró	33
Tabla 4. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antibacteriana.	35
Tabla 5. Concentraciones del extracto de propóleo obtenidas en las diferentes diluciones de la tintura madre.	37
Tabla 6. Relación entre el color de la mancha y la estructura del flavonoide	42
Tabla 7. Clases principales de flavonoides y su absorción en determinadas longitudes de onda	44
Tabla 8. Concentración mínima bactericida obtenida después de la evaluación de las replicas de los extractos etanólicos de los dos propóleos sobre las bacterias evaluadas	45
Tabla 9. Concentraciones a las que iba quedando el solvente (etanol mg/ml) en cada tubo de las diluciones seriales que fueron realizadas a los dos extractos de propóleo y al control negativo.	46
Tabla 10. Resultados del análisis estadístico de las concentraciones de los dos extractos que tuvieron un efecto bactericida sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .	48

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico de las concentraciones de los dos extractos que tuvieron un efecto bactericida sobre *Pseudomonas aeruginosa*. 49

Tabla 12. Resultados obtenidos de la determinación cualitativa de algunos metabolitos secundarios presentes en el propóleo de Totoró y Buenos Aires. 52

Tabla 13. Datos cromatográficos y espectroscópicos del propóleo de Buenos Aires 53

Tabla 14. Datos cromatográficos y espectroscópicos del propóleo de Totoró 54

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Origen metabólico de algunos compuestos identificados en propóleo	23
Figura 2. Estructura química básica de flavonoides y ácidos fenólicos	25
Figura 3. Morfología de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 4. Morfología de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Figura. 5. Ubicación de los municipios de Totoró y Buenos Aires en el Departamento del Cauca.	31
Figura 6. Esquema general para obtener la Concentración Mínima Bactericida según la metodología aplicada	38
Figura 7. Esquema general para obtener la Concentración Mínima Bactericida.	39
Figura 8. Plantilla de distribución de los flavonoides en el cromatograma	43
Figura 9. Inhibición del desarrollo de <i>Staphylococcus aureus</i> verificada en placas de cultivo	50
Figura 10. Inhibición del desarrollo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> verificada en placas de cultivo	51
Figura 11. Cromatogramas de los propóleos de: (a) Buenos Aires, (b)	53

Totoró, identificación de color y Rf de la mancha.

Figura 12. Espectro de absorción para la mancha 1(B1)	55
Figura 13. Espectro de absorción para la mancha 2 (B2)	55
Figura 14. Espectro de absorción para la mancha 3 (B3)	56
Figura 15. Espectro de absorción para la mancha 4 (B4)	56
Figura 16. Espectro de absorción para la mancha 1(T1)	57
Figura 17. Espectro de absorción para la mancha 2(T2)	57
Figura 18. Cromatografía en capa delgada de los dos propóleos	58

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A: Prueba no paramétrica de Kruscal -Wallis para el efecto de los extractos sobre la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	78
Anexo B: Prueba de comparaciones múltiples para el efecto de los extractos sobre la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Anexo C: Prueba no paramétrica de Kruscal Wallis para el efecto de los extractos sobre la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
Anexo D: Prueba de comparaciones múltiples para el efecto de los extractos sobre la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81

INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo el propóleo ha sido universalmente utilizado ya que existen reportes según los cuales nuestros antepasados y muchas culturas antiguas lo utilizaban con fines curativos. La palabra propóleo que significa "para la defensa de la colmena" da la idea de un compuesto muy importante para las abejas, pues les permite defender sus panales contra el ataque de muchos microorganismos patógenos (Martínez, 2003).

El propóleo es una mezcla de origen natural; su elaboración la realizan insectos pertenecientes a la familia Apidae y principalmente la especie *Apis mellifera* (Adelmann, 2005) a partir de diferentes resinas y exudados vegetales provenientes de cogollos, brotes y botones florales (Vargas, *et al.*, 2004; Park, *et al.*, 2002), debido a lo cual la composición del propóleo varía de acuerdo a la región, zona de vida, época de colecta por el entorno ecológico y las especies vegetales de las cuales se extraen las resinas incluso, puede variar por las propias condiciones genéticas de las abejas (Park, *et al.*, 2002).

Por lo anterior el propóleo es también una sustancia compleja constituida por una gran variedad de compuestos químicos de origen vegetal (Tolosa y Cañizares, 2002); sus propiedades físico-químicas hacen que se le haya conferido un cierto grado de acción bactericida, como lo confirman diversos estudios realizados en varios países. Por lo menos 200 componentes diferentes han sido identificados en muestras de propóleo de distintos orígenes geográficos entre los que se encuentran ácidos grasos y compuestos fenólicos (Vargas, *et al.*, 2004), predominando los de tipo flavonoide (Tolosa y Cañizares, 2002; Vargas, *et al.*, 2004), a los cuales se les considera responsables de las propiedades bacteriostáticas, bactericidas, antivirales y fungicidas de este producto y que han sido ampliamente documentadas tanto *in Vivo* como *in Vitro* (Principal, *et al.*, 2003).

Debido a que los componentes químicos del propóleo actúan sobre la integridad de la envoltura celular bacteriana, la estructura y complejidad de ésta puede determinar el grado de éxito de su acción sobre las bacterias, lo que podría explicar la eficiencia del propóleo sobre bacterias Gram positivas mas que sobre las Gram negativas; debido tal vez a la complejidad en la composición de la de la envoltura celular de estas últimas. Fue así, como Pereira, (1999) observó que el propóleo no tiene actividad antibacteriana contra cepas Gram negativas pero si contra todas las cepas Gram positivas. Sin embargo varios autores han reportado

actividad antibacterial del propóleo también contra bacterias Gram negativas (Hegazi y Hady, 2002), infiriendo en igual sentido, que la eficacia antibacteriana estaría dada por las cualidades del propóleo según el lugar de procedencia del mismo y estando estrechamente ligado a su efectiva acción sobre las bacterias (Chaillou *et al*, 2004; Orsi *et al*, 2005).

Al propóleo se le considera una mezcla de grandes potencialidades para el tratamiento de afecciones provocadas por diferentes microorganismos en seres humanos y animales domesticados; atribuyéndosele comercialmente numerosas propiedades farmacológicas tanto a nivel sistémico como dermatológico (Marcucci, 1995). Las bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Pseudomonas* son representantes de las bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas respectivamente, consideradas como comensales de la piel y causantes de muchas infecciones entre ellas las del aparato respiratorio (Brooks, Batel y Morse, 2005). Por ello, es importante la observación del efecto producido por el propóleo principalmente en estas dos bacterias ya que en medicina humana el tratamiento con propóleo muestra resultados positivos al usarlo en patologías que habitualmente están asociadas a ellas, tales como afecciones de las vías respiratorias, gripe, sinusitis, laringitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía crónica, tuberculosis pulmonar y en el área dermatológica para procesos tales como abscesos, forúnculos, supuraciones, sabañones, grietas, verrugas, callosidades, eczemas y psoriasis, entre otros (Stangaciu, s.f); (Brooks, Butel y Morse, 2005)

Además en la actualidad se reconoce la importancia de los compuestos de origen natural porque poseen innumerables características y son de bajo costo. Es importante resaltar que sus principios activos están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que se potencian biológicamente entre sí evitando que se acumulen en el organismo, algunos no presentan efectos indeseables o estos están limitados al igual que los efectos secundarios o colaterales (Del Rio, 2006). Debido al uso indiscriminado y prolongado de antimicrobianos artificiales se ha elevado el número de patógenos mutantes resistentes; tomando fuerza el uso de antimicrobianos de origen natural como una alternativa eficaz y económica en el tratamiento de infecciones bacterianas (Vargas *et al*, 2004).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y dado a que en el departamento del Cauca se considera a la apicultura una actividad con mucho potencial productivo a nivel económico, mediante el presente trabajo se pretende determinar si existe influencia regional en la capacidad bactericida de extractos etanólicos de propóleos provenientes de los municipios de Totoró y Buenos Aires, frente

aislados bacterianos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* mediante un bioensayo utilizando el método de Concentración Mínima Bactericida.

1. ANTECEDENTES

Dentro de los productos apícolas, el propóleo al igual que la miel se destaca por sus variadas y diferentes propiedades biológicas, su uso benéfico se conoce desde hace mucho tiempo y ha sido ampliamente utilizado por varias culturas con diversas finalidades, principalmente en medicina (Manrique, 2006; Cañas, 2002; Krell, 1996; Burdock, 1998). Su empleo es descrito por los asirios, griegos, romanos, incas y egipcios. En el primer texto médico conocido por “libro de producción de medicamentos para todas las partes del cuerpo humano”, narrado en el papiro de Ebers y escrito hacia cerca de 1700 A. C. se menciona el propóleo como producto medicinal (Apicultura, s.f). También se encontraba en antiguos recetarios chinos como medicamento activo contra molestias coronarias, hipertensión y disfunciones hematológicas (Nothenberg, 1997).

Los egipcios observaron que tenía la capacidad de evitar la descomposición de los cadáveres, y fue así utilizado en la técnica de embalsamar (Fierro, 2000). Los griegos lo adoptaron como cicatrizante interno y externo. Plinio historiador romano se refiere al propóleo como un medicamento capaz de reducir la hinchazón y aliviar dolores, en cuanto que la élite femenina de la época lo utilizaba en el alivio del síndrome premenstrual y los cólicos. Los médicos europeos particularmente de Rusia y Polonia, en el siglo XVI emplearon el propóleo como antibacteriano, tuberculostático y agente dermatológico antieczematoso y antiacné. En odontología era empleado en el tratamiento de abscesos y encías hemorrágicas (Adelmann, 2005).

El término propóleo ya era descrito en el siglo XVI en Francia y en África del Sur. Al final del siglo XIX fue ampliamente utilizado debido a sus propiedades cicatrizantes y en la segunda guerra mundial fue empleado en varias clínicas soviéticas en la antigua URSS. El propóleo merece especial atención en medicina humana y veterinaria, con aplicaciones inclusive en el tratamiento de la tuberculosis observándose también su uso en problemas pulmonares (Pereira *et al*, 2002).

En 1908 se conoció el primer trabajo científico sobre su composición y propiedades químicas y en 1968 apareció un resumen de la primera patente utilizando propóleo (Pereira *et al*, 2002). Desde la primera patente en 1965 hasta 1999 han sido desarrolladas cerca de 239 patentes; hasta el final de la década de lo 80 las patentes eran dominadas por la antigua URSS y sus países satélites, hoy el 43% de todas las patentes son japonesas encontrándose que la primera patente japonesa fue otorgada en 1987 sobre el uso del propóleo en control de dolores. En relación con el Brasil donde la primera patente surgió solamente hasta 1995 para el uso del propóleo en el tratamiento odontológico, prevención de la caries y gingivitis (Adelmann, 2000).

Durante la década de los 70 y 80 se estableció que los propóleos presentaban diferente potencia antibacteriana considerando su origen geográfico (Fierro, 2000), ya que se ha demostrado actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, antifúngicas *Candida albicans* y antivirales *Avian influenza virus* (Lozina *et al*, 2005).

En la primera mitad del siglo XX los mayores avances en el conocimiento del propóleo se produjeron en países detrás de la cortina de hierro, donde los productos de la colmena fueron ampliamente utilizados en el tratamiento clínico como cicatrizante de heridas y quemaduras, como antibióticos, antiparasitarios, y energovitalizantes. Con la publicación "Propóleos" de Apimondia en 1975, se inicia un auge de las investigaciones en occidente para comprobar los diversos efectos de este valioso producto de la colmena encontrando además nuevas actividades como antioxidante, inmunoestimulante, hipocolesterolémico, citostático y antiviral (Marccuci, 1995).

Con el desarrollo de la química farmacéutica y con el auge de las nuevas drogas sintéticas el propóleo dejó prácticamente de utilizarse, pero recientemente se observa un resurgir en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en biología y medicina (Farre, Frassetto y Sanchez, 2004). Las investigaciones del propóleo en distintas especialidades, han mostrado un gran conjunto de aplicaciones de este producto sobre todo en la medicina moderna, revelando su modo de acción y sus propiedades biológicas las cuales están relacionadas con la variabilidad de su composición química. Sin embargo, es sólo en los últimos 50 años que se ha realizado la gran mayoría de los estudios tendientes a determinar la composición química, propiedades farmacológicas y en general el uso farmacológico comercial de los preparados a base de propóleos (Ghisalberti, 1979).

El interés global en el estudio del propóleo se justifica debido a su característica de ejercer varias actividades biológicas. Europa es el continente en donde primero se han caracterizado la mayoría de sus propiedades observándose su amplio espectro de acción y en América del Sur actualmente se están desarrollando trabajos en varios países principalmente en Brasil, Chile y Argentina (Bankova, de Castro and Marcucci, 2000). En Colombia también se han hecho algunas investigaciones sobre el propóleo, destacando algunas de sus propiedades químicas, su composición mineral y las especies vegetales más promisorias de interés apícola en la zona interandina (Salamanca *et al*, 2001).

2. MARCO TEORICO

2.1 PROPOLEO

El propóleo es una compleja sustancia resinosa de consistencia viscosa, producida por las abejas para la construcción, reparación, aislamiento y protección del panal especialmente contra los microorganismos (Bosio *et al*, 2000). Debido a la participación de las abejas, la composición del propóleo difiere de las resinas a partir de las cuales se origina, considerándose por lo tanto un producto de origen mixto, vegetal y animal (Park *et al*, 1998; Del Río, 2006).

Presenta gran cantidad de aceites esenciales por lo que el propóleo suele ser aromático, en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en sus características organolépticas, como la consistencia, el color que puede variar de amarillo claro a castaño oscuro; el olor, que en algunos casos recuerda su origen vegetal es generalmente agradable, el sabor que puede ser amargo ligeramente picante o insípido (Farre, Frasquet y Sánchez, 2001).

Entre sus propiedades químicas, cabe destacar que es fotosensible, por lo que no debe estar mucho tiempo expuesto a la luz, hasta los 15°C es duro y quebradizo, tornándose mas dúctil y maleable a medida que aumenta la temperatura y su punto de fusión varía entre 60 a 70°C (Marcucci, 1996).

Mediante sofisticados métodos analíticos se conoció su compleja composición y se consideró una de las mezclas más heterogéneas encontradas en fuentes naturales; describiéndose más de 100 componentes químicos que actúan en sinergismo incrementando su actividad biológica; los más importantes son los polifenoles entre los que se destacan los flavonoides (Fierro, 2000; Salamanca *et al*, 2001), a los cuales se les atribuye el gran espectro de actividad, ya que puede actuar como hepatoprotector, antitumoral, antioxidante, antimicrobiano y antiinflamatorio entre otras (Fierro, 2000).

2.1.1 Origen. El propóleo es una resina natural fabricada por las abejas a partir de exudados, materiales lipofílicos de las hojas y los brotes foliares, mucílagos, gomas, resinas y látex de diferentes especies vegetales que las abejas recogen con las mandíbulas y en su fabricación las mezclan con sus propias enzimas salivares. Así se ha planteado que los compuestos en el propóleo se originan de tres fuentes: exudado de plantas colectados por las abejas, productos metabólicos secretados por el insecto y materiales introducidos durante la elaboración del producto (Marcucci, 1995; Bankova *et al*, 2000; Park *et al*, 1997).

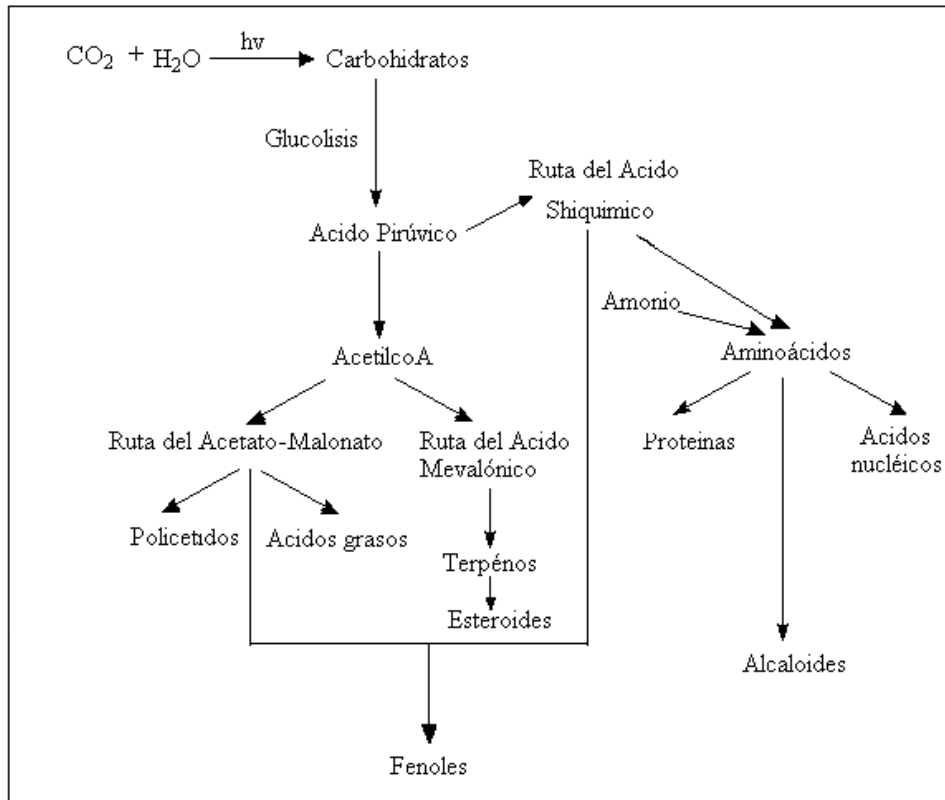
En diversos ecosistemas, diferentes exudados y secreciones de plantas pueden servir como recurso para la obtención de propóleo. En las zonas templadas, como Europa, América del norte y oeste de Asia, la fuente dominante de propóleo es el exudado de brotes de álamo (*Populus sp.*) y sus híbridos (Markham *et al*, 1996; Wollenweber y Buchmann, 1997; Bankova *et al*, 2000). Ejemplos de propóleos provenientes de esas regiones han sido caracterizados, observándose una composición química similar, siendo sus principales constituyentes compuestos fenólicos. Entre tanto en las regiones tropicales como América del Sur esa especie no es nativa, existiendo una gran diversidad vegetal para la obtención de la resina que dificulta la correlación del propóleo con la fuente productora (Park *et al*, 2002). Así los propóleos de regiones tropicales contienen algunas sustancias químicas que no son encontradas en propóleos de las zonas templadas, sin embargo investigaciones sobre el propóleo tropical han revelado que en muchos casos los flavonoides son importantes componentes, los cuales son análogos a los de propóleos europeos aunque sus orígenes botánicos son diferentes (Bankova *et al*, 2000).

Dentro de la flora colombiana existen diversas especies de interés apícola, que han demostrado su utilidad en medicina natural, ya que contienen flavonoides y compuestos relacionados, y que son fuentes de polen, néctar y de propóleos. Se destacan especies de las familias Asteraceae, Ericaceae y Euphorbiaceae (Salamanca *et al*, 2001).

2.1.2 Composición química. En general se compone de un 50% a 60% de resinas y bálsamos vegetales, 30% a 40% de ceras, 5 a 10% de aceites esenciales, 5% de polen, y 5% de diferentes sustancias, incluyendo compuestos orgánicos, micro elementos y pequeñas cantidades de vitaminas (Burdock, 1998; Ghisalberti, 1979).

La composición química del propóleo es muy compleja y variada cualitativa y cuantitativamente estando muy relacionada con la ecología y la flora de las regiones visitadas por las abejas, ya que algunas plantas ligadas a la actividad de estas y de donde obtienen las resinas, llevan asociadas rutas metabólicas (Fig. 1) a través de las cuales sintetizan y utilizan ciertos tipos de compuestos orgánicos, que luego formaran parte de la composición final del propóleo, una vez las abejas lo procesen (Salamanca *et al*, 2000).

Figura 1. Origen metabólico de algunos compuestos identificados en propóleo



Fuente: Modificado de Salamanca *et al*, 2001

En el propóleo la cera y las mezclas mecánicas constituyen casi siempre la mayoría de la masa total, no habiéndose podido demostrar su actividad terapéutica siendo el resto lo que corresponde la parte biológicamente activa, que se relaciona con los polifenoles de ácidos aromáticos donde se encuentran los flavonoides (Salamanca *et al*, 2000).

Se conoce que la proporción de cada componente químico es variable y difiere en función de la variedad de abejas que lo producen, la época de recolección, el dispositivo de recogida y la región donde se encuentra establecida la colmena, por su variación en la flora, el clima, la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, la insolación y la evapotranspiración entre otras (Lozina, *et al*, 2005). Así es como se entiende la variación que se presenta en el contenido de ciertas sustancias entre propóleos provenientes de diferentes países (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de diversos propóleos europeos

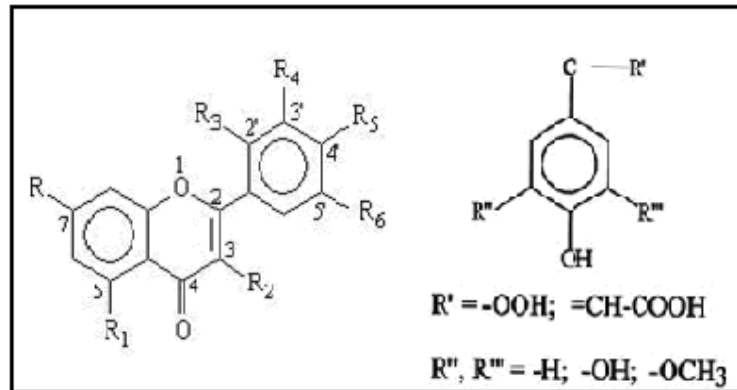
COMPONENTE	Propóleo P. Nigra	Propóleo Suizo	Propóleo Italiano
Pinocembrina	7.2	0.3	0.2
Pinobanksina	3.7	-	-
O-acetato de pinobanksina	8.0	0.5	0.4
Chrysin	8.4	-	0.5
Galangina	7.8	0.3	0.2
Pentenil cafeatos	3.3	0.2	-
Bencil cafeatos	3.0	-	0.9
Prenetil cafeato	2.8	-	0.2
Glicéridos fenólicos	1.1	23.1	-
Ácidos diterpénicos	-	-	53.2

Fuente: Farre, Frasset y Sanchez. 2001.

En las regiones templadas del planeta, las abejas colectan propóleos solo en verano por eso las variaciones estacionales en la composición del propóleo son insignificantes, además una menor variación de la composición química del propóleo es observada en estas zonas, donde sus principales compuestos bioactivos son los flavonoides, ácidos aromáticos y sus ester. En las zonas tropicales en cambio la colecta del propóleo se realiza durante todo el año, de modo que se da una gran variación en su composición y además de los flavonoides se encuentran presentes otros grupos químicos en el propóleo como ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas y algunos terpenóides específicos (Adelmann, 2005).

2.1.2.1 Compuestos fenólicos. Varios estudios realizados han llevado a determinar que la principal clase de constituyentes químicos del propóleo son los compuestos fenólicos y a su aislamiento y determinación estructural. Se originan como metabolitos secundarios que componen los exudados resinosos de las plantas, que las abejas utilizan para la elaboración del propóleo (Park, et al., 1998). Se conoce que el mecanismo de actividad antimicrobial del propóleo es complejo y puede ser atribuido a la sinérgica actividad entre estos componentes, entre los cuales se caracterizan principalmente los ácidos fenólicos y los flavonoides (Fig. 2) (Levi, 1999; Krol, et al, 1993; Marcucci, 1998).

Figura 2. Estructura química básica de flavonoides y ácidos fenólicos.



Fuente: Marcucci, Woisky e Salatino, 1998

Los flavonoides se componen de una amplia clase de sustancias que son sintetizadas por las plantas y presentan un papel de defensa frente a la radiación solar, como también una barrera química contra algunos animales herbívoros. Muestran espectros característicos, pero de un modo general tienen una mayor absorción en la franja de 250 y 350 nm. del espectro visible (Park *et al*, 1995; Adelman, 2005). Fueron descubiertos por Sent-Gyorgy en 1930, y poseen como características sobresalientes, que son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil piranos (C6-C3-C6) compuestos por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico), tienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades antioxidantes (Martínez *et al*, 2000). De acuerdo con sus características químicas y biosintéticas los flavonoides se clasifican como: flavonas, flavonóles, dihidroflavonóides (flavanonas y flavanonóles), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e sus precursores metabólicos conocidos como chalconas (Adelman, 2006).

2.1.3 Recolección. Para la recolección del propóleo se deben tener algunos requisitos básicos de higiene, como la asepsia e inocuidad del producto, además de algunas características que éste presenta para no afectar sus propiedades, ya que por ser fotosensible y termo sensible, no debe estar por mucho tiempo expuesto a la acción de la luz y no es recomendable exponerlo a más de 50°C.

Entre las técnicas de recolección para la obtención de propóleo en bruto existe el raspado y el uso de las mallas. Cuando se raspa la colmena es probable incorporar al propóleo muchas impurezas y residuos sólidos como astillas de madera y resinas de la pintura, además de un porcentaje más elevado de cera si no se es un experto recolector. En la recolección con mallas que consiste en el uso de una lámina plástica con ranuras, que las abejas llenan con propóleos y que

permite su fácil retirada y recolección, se saca un producto mas limpio y sin residuos (Salamanca *et al*, 2001)

2.1.4 Propiedades antimicrobianas. Múltiples estudios bacteriológicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Fernández *et al*, 2005; Gonzáles *et al*, 2005; Orsi *et al*, 2004; Scazzocchio *et al*, 2005; Quintana *et al*, 1997), han confirmado la acción bacteriostática y bactericida que se le atribuye al propóleo. Lozina *et al* (2005) observaron las propiedades antimicóticas del propóleo y ratificaron que tal actividad depende tanto del origen del propóleos como del solvente usado para su extracción. Se han encontrado una gran variedad de solventes orgánicos empleados para las preparaciones de extractos a base de propóleos, pero solo unos pocos no son tóxicos, el más común en su uso es el etanol donde se ha encontrado una mayor concentración de ácidos fenólicos al utilizarlo como solvente (Krell, 1996; Park *et al*, 1998; Lozina *et al*, 2005; Apicultura entre amigos, 1999)

La actividad antimicrobiana del propóleo puede ser debida a la cantidad y al tipo de compuestos fenólicos de que esta constituido, estos pueden estar representados en el propóleo por las agliconas de flavonoides, ácidos fenólicos o sus esterres ya que muchos flavonoides son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos (Modak *et al*, 2002; Adelman, 2005). Se ha observado que la acción antibacteriana del propóleo utiliza varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, desorganización del citoplasma, de la membrana y de la pared celular, causando bacteriolísis parcial e inhibición de la síntesis de proteínas, además inhibición de la división celular en presencia de propóleo, y este hecho sugirió que el propóleo podría actuar inhibiendo la replicación del DNA a través de la RNA polimerasa e indirectamente, afectando la división celular, (Takaisi-Kikuni and Shilcher, 1994; Bosio, 2000). Mirzoeva, Grishanin y Calder, (1997) observaron que el propóleo desactivaba la energía de la membrana citoplasmática por alteración de la permeabilidad iónica, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndola mas vulnerable al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos. Además Krol *et al* (1993) encontraron que la combinación de propóleo con los antibióticos reduce su dosis y disminuye el aumento de resistencia por las bacterias.

El efecto antimicrobiano se observa principalmente sobre bacterias Gram positivas, pero numerosas bacterias Gram negativas también son sensibles (Drago *et al*, 2000; Sforcin *et al*, 2000; Stepanovic *et al*, 2003).

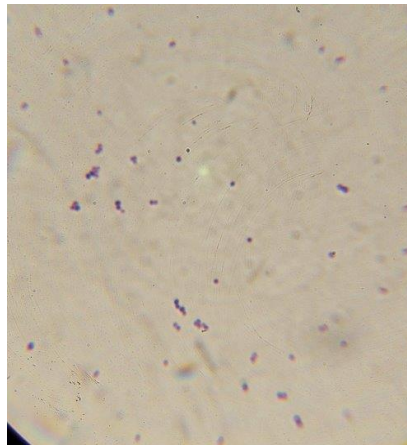
Muchas investigaciones realizadas en sustancias aisladas del propóleo han concluido que si bien, cada una de ellas puede presentar una buena actividad, ninguna individualmente presenta una actividad mayor que la mezcla de todas formando el propóleo (Kujumgiev, 1999). Además, independiente del origen

geográfico de la muestra, todos los propóleos presentan una actividad microbiológica similar, por lo que el propóleo tiene un gran valor como la mezcla de compuestos que es, y no como una fuente para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antibacteriana, antifúngica o antiviral (Del Río, 2006).

2.2 BACTERIAS UTILIZADAS

2.2.1 *Staphylococcus aureus*. Bacterias esféricas, 0.5-1.5 μm de diámetro, pueden encontrarse solitarias, en parejas o en agrupaciones irregulares (Fig. 3).

Figura 3. Morfología de *Staphylococcus aureus*.



Fuente: SILVA, Marco. Curso de Microbiología y Parasitología. Nov 2007
Disponibile en: [http:// Staphylococcus-aureus.blogspot.com](http://Staphylococcus-aureus.blogspot.com)

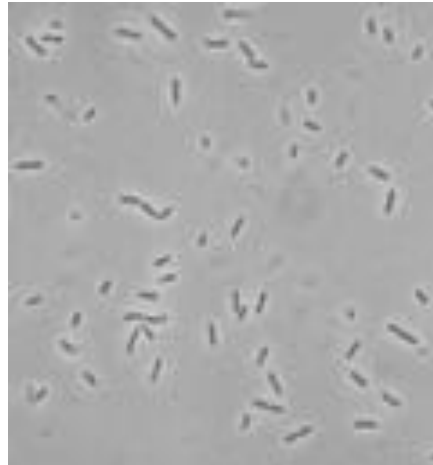
Son Gram positivas, no móviles, no formadoras de esporas, son anaerobias facultativas, quimioorganotróficas, con metabolismo respiratorio y fermentativo. Usualmente son catalasa positivas, el nitrato es con frecuencia reducido a nitrito. Usualmente crecen con 10% de NaCl, su temperatura óptima es 30-37°C. Principalmente se encuentran asociadas con piel y membranas mucosas de vertebrados pero con frecuencia son aislados de productos comestibles, basura y agua (Jones and Keddie, 1996).

Aunque este microorganismo suele formar parte de la microflora humana normal, puede producir infecciones oportunistas importantes, las principales fuentes de infección son las lesiones humanas que los diseminan, los fomites provenientes de estas lesiones, así como el aparato respiratorio y la piel de los humanos. Comúnmente forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso, el *S aureus*

produce varias enzimas que contribuyen a su virulencia y ayudan a su propagación tales como coagulasa, una proteína que produce polimerización de la fibrina alterando su ingestión por células fagocíticas, también forman una exotoxina con propiedades hemolíticas y necrosantes de la piel que suele ser causa de lesiones supuradas que se observan en el organismo humano tales como furúnculos y abscesos, osteomielitis aguda, endocarditis infecciosas, piemia etc. también pueden causar neumonía y meningitis (Brooks, Butel y Morse, 2005; Koneman *et al*, 1999).

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*. Bacilos rectos o ligeramente curvados, pero no helicoidales, 0.5-1.0x 1.5-5.0 μm . (Fig. 4).

Figura 4. Morfología de *Pseudomonas aeruginosa*



Fuente: Institut for Veterinær Mikrobiologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, 2000. Disponible en: [http:// www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/showprod](http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/showprod).

Muchas especies acumulan poly β -hidroxibutirato como material de reserva de carbono, no están rodeados por envoltura. Se tiñen Gram negativamente, la mayoría son móviles por la presencia de uno o varios flagelos polares. Son aeróbicos, tienen un tipo de metabolismo estrictamente respiratorio con O_2 como aceptor terminal de electrones, en algunos casos el nitrato puede ser usado como un aceptor de electrones alternativo. La mayoría de las especies no crecen bajo condiciones ácidas y no requieren factores de crecimiento orgánicos. Oxidasa positivos o negativos, catalasa positivos y quimioorganotrofos, algunas especies son quimiolitotrofos facultativos, capaces de usar H_2 o CO como fuente de energía. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, las especies patógenas

están frecuentemente asociadas a infecciones del tracto respiratorio y urinario (Jones and Keddie, 1996).

Es común en ambientes húmedos, crece bien de 36 a 42°C, no fermenta los carbohidratos pero muchas cepas oxidan la glucosa, produce el característico pigmento azul hidrosoluble pirocianina o el pigmento fluorescente pioverdina que confiere color verdoso al agar, la *P. aeruginosa* produce varias sustancias y enzimas extracelulares, que se supone aumentan la colonización e infección de los tejidos del huésped las cuales incluyen elastasas, proteasas, dos hemolisinas, una fosfolipasa C termolábil y un glucolípido termoestable, una variedad de factores de virulencia incluidos el lipopolisacarido (LPS), la exotoxina A, la leucocidina y otras enzimas que hacen de *P. aeruginosa* una bacteria de importancia clínica. Produce infecciones cuando se introduce en regiones desprovistas de defensas normales como en heridas y quemaduras, causa meningitis e infección del tracto urinario por empleo de catéteres, y del tracto respiratorio por aparatos respiradores contaminados que puede producir neumonía necrosante (Brooks, Butel y Morse, 2005; Koneman *et al*, 1999).

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO

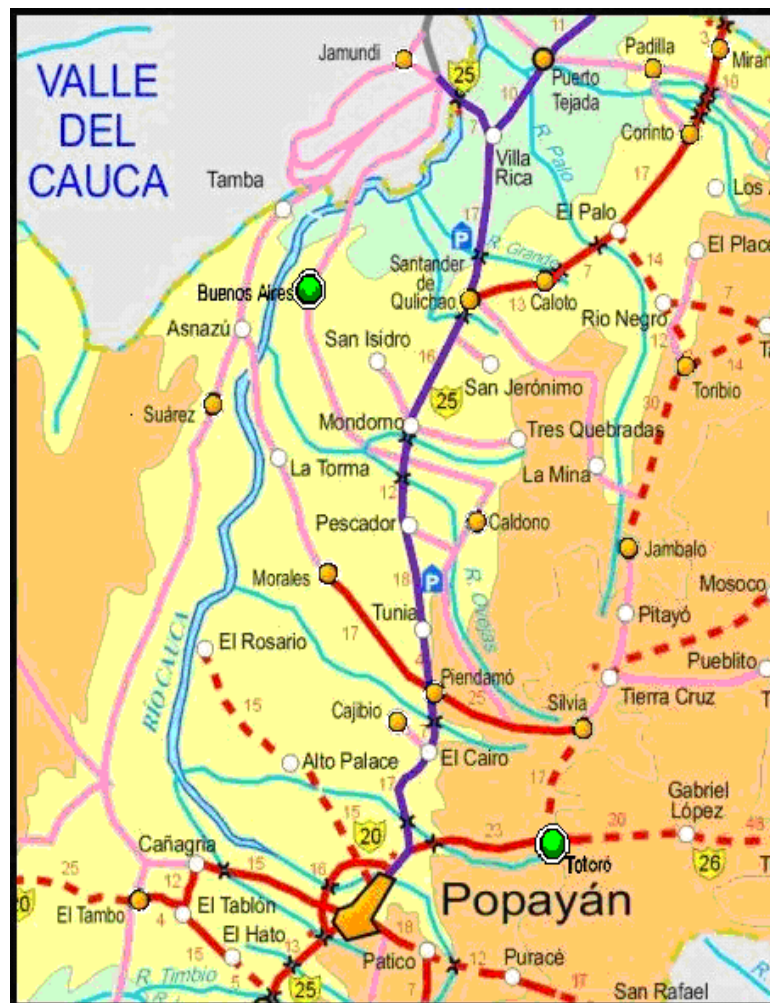
Las muestras de propóleo en bruto se obtuvieron por medio de la Sociedad de Apicultores del Cauca (COAPICA), provenientes de apiarios localizados en los municipios de Totoró y Buenos Aires en el Departamento del Cauca (Fig. 5). Estos dos municipios fueron escogidos porque los apiarios que se encuentran en ellos surten de una basta cantidad de propóleos a la capital del departamento, además difieren en el clima y por ende en la vegetación predominante, parámetro determinante en la composición del mismo. Es de anotar que debido a que las abejas no recogen grandes cantidades de propóleo en corto tiempo, el presente estudio se realizó con muestras ya recolectadas por los apicultores por lo cual fue imposible aplicar técnicas unificadas de recolección que garantizaran un propóleo de alta pureza. En el municipio de Buenos Aires la recolección del propóleo fue realizada mediante raspado de la colmena, mientras que en Totoró utilizaron mallas para su colecta.

3.1.1 Descripción del sitio de donde provienen las muestras. Estas regiones fueron escogidas tomando como base la estratificación del departamento en zonas ecológicas diferentes con relación al tipo de vegetación predominante. Según el modelo de Holdrige (IGAC, 1977) estas regiones se encuentran enmarcadas dentro del contexto de zonas de vida en bosque muy húmedo, bosque húmedo premontano y bosque muy húmedo montano bajo, donde según Salamanca, (2001) se encuentran muchas plantas de interés apícola productoras de resinas y gomas, que son una de las principales fuentes, que las abejas convierten en propóleos en estas regiones tropicales. Para corroborar esto se realizó una revisión de la vegetación predominante en los dos municipios por medio de la información obtenida de los esquemas de ordenamiento territorial de Totoró y Buenos Aires.

3.1.1.1 Municipio de Buenos Aires. Se encuentra ubicado en el Noroccidente del Departamento del Cauca situado entre las coordenadas 03°01'08" latitud Norte y 76°38'37" Longitud Oeste, con temperatura media de 23°C, altura sobre el nivel de mar 1.225 m y precipitación media anual de 2.024 mm. Esta región se encuentra enmarcada dentro de una zona de transición entre la zona de vida del bosque muy húmedo premontano (bmh-PM) y bosque húmedo premontano (bh-PM). (CRC, 1999; IGAC, 1977).

3.1.1.2 Municipio de Totoró. Situado a 02°38'06" N y 02°15'30" O, con temperatura media de 14°C, altura sobre el nivel de mar 2.750 m y precipitación media anual de 2.000 mm. Esta región se encuentra también dentro de la zona subtropical y su formación es de bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB) (CRC, 1999; IGAC, 1977).

Figura. 5. Ubicación de los municipios de Totoró y Buenos Aires en el Departamento del Cauca.



Fuente: Modificado de PLAN DE DESARROLLO MUNICIPAL DE BUENOS AIRES – CAUCA. Introducción, alcances y disposiciones generales. Oscar Marino Tovar. Secretario H. Concejo. Acuerdo No. 015 de 2002. Disponible en: <http://www.buenosaires-cauca.gov.co/index.shtml>

3.2 VEGETACION PREDOMINANTE EN BUENOS AIRES Y TOTORO

Con relación al tipo de vegetación existente en los dos municipios de los cuales se recolectaron las muestras de propóleo, se determinó que las especies vegetales arbustivas y arbóreas entre las cuales se encuentran especies introducidas y especies nativas son (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Especies vegetales reportadas para el municipio de Buenos Aires

Nombre científico	Familia	Nombres comunes
<i>Ilex sp*</i>	Aquifoliaceae	platero
<i>Anacardium excelsum*</i>	Anacardiaceae	caracoli
<i>Mangifera indica*</i>	Anacardiaceae	mango
<i>Didymopanax morototoni</i>	Araliaceae	tumbamaco
<i>Couma macrocarpa</i>	Apocynaceae	popa
<i>Tabebuia crisanta*</i>	Bignoniaceae	guayacán
<i>Ceiba pentandra*</i>	Bombaceae	ceiba
<i>Huberodendron patinoi</i>	Bombacaceae	carra, nogal
<i>Hirtella racemosa</i>	Chrysobalanaceae	carbonero
<i>Calophyllum mariae</i>	Clusiaceae	aceite maría
<i>Chrysochlamys sp</i>	Clusiaceae	zanca de araña
<i>Clusia magniflora*</i>	Clusiaceae	SD**
<i>Weinmannia sp*</i>	Cunoniaceae	encenillo
<i>Vaccinium meridionale*</i>	Ericaceae	mortiño
<i>Gliricidia sepium*</i>	Fabaceae	matarratón
<i>Prosopis juliflora*</i>	Fabaceae	trupillo
<i>Quercus humboldtii*</i>	Fagaceae	roble
<i>Sacoglottis procera</i>	Humiriaceae	chanul
<i>Aniba sp</i>	Lauraceae	laurel
<i>Nectandra sp</i>	Lauraceae	comino, laurel
<i>Persea sp*</i>	Lauraceae	aguacate
<i>Eschweilera sp</i>	Lecythidaceae	guasco
<i>Meriania speciosa</i>	Melastomataceae	mayo
<i>Tibouchina grossa</i>	Melastomataceae	siete cueros
<i>Guarea sp</i>	Meliaceae	cedrillo
<i>Inga sp*</i>	Mimosaceae	guamo
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Mimosaceae	piñon de oreja
<i>Pseudosamanea guachapele*</i>	Mimosaceae	SD**
<i>Samanea saman</i>	Mimosaceae	saman

<i>Eucaliptos sp*</i>	Mirtaceae	eucalipto
<i>Psidium guajava*</i>	Mirtaceae	guayabos
<i>Otoba lehmanii</i>	Mirysticaceae	otoba
<i>Virola reidii</i>	Mirysticaceae	cuangare
<i>Brosimum utile</i>	Moraceae	sande, árbol de leche
<i>Clarisia racemosa</i>	Moraceae	SD**
<i>Picus sp</i>	Moraceae	higuerón, caucho
<i>Cespedesia spathulata</i>	Ochnaceae	paco
<i>Pinus sp*</i>	Pinaceae	pino
<i>Piper sp*</i>	Piperaceae	SD**
<i>Podocarpus rospigliosii</i>	Podocarpaceae	SD**
<i>Ladenbergia sp</i>	Rubiaceae	cascarillo
<i>Citrus sinensis*</i>	Rutaceae	cítricos
<i>Citrus limonum*</i>		
<i>Citrus nobilis*</i>		
<i>Sapindus saponaria*</i>	Sapindaceae	chambique
<i>Pouteria eugeniifolia</i>	Sapotaceae	caimito blanco
<i>Guazuma sp*</i>	Sterculiaceae	guacimo
<i>Sterculia apetala</i>	Sterculiaceae.	SD**
<i>Vochysia ferruginea</i>	Vochysiaceae	soroga

*Estas especies son reportadas como flora apícola mundial, según Polain (2000) y Salamanca *et al* (2004)

** Sin datos

FUENTE: Esquema de ordenamiento territorial municipio de Buenos Aires (2001)

Tabla 3. Especies vegetales reportadas para el municipio de Totoró

Nombre científico	Familia	Nombres comunes
<i>Trichanthera gigantea*</i>	Acanthaceae	nacedero
<i>Diplostephium sp</i>	Asteraceae	romero
<i>Espeletia sp*</i>	Asteraceae	frailejón
<i>Guazuma ulmifolia*</i>	Boraginaceae	guasimo
<i>Alnus sp*</i>	Betulaceae	alisos
<i>Jacaranda caucana</i>	Bignoniaceae	gualanday
<i>Brunnellia sp</i>	Brunelliaceae	nogal
<i>Hypericum sp*</i>	Clusiaceae	chite
<i>Baccharis sp*</i>	Compositae	chilco
<i>Weinmania sp*</i>	Cunoniaceae	encenillo
<i>Befaria glauca*</i>	Ericaceae	uvito
<i>Pseudosamanea guachapele*</i>	Fabaceae	igua

<i>Quercus humboldtii</i> *	Fagaceae	roble
<i>Nectandra pichunin</i>	Lauraceae	jigua
<i>Persea americana</i> *	Lauraceae	aguacate
<i>Bertholletia excelsa</i>	Lecythidaceae	castaño
<i>Cedrela sp</i>	Meliaceae	cedro
<i>Guarea sp</i>	Meliaceae	cedrillo
<i>Inga sp</i> *	Mimosaceae	guamo
<i>Mimusops quitensis</i> *	Mimosaceae	guarango
<i>Pithecellobium dulce</i> *	Mimosaceae	chiminango
<i>Eucalyptus sp</i> *	Mirtaceae	eucalipto
<i>Rapanea guianensis</i>	Myrcinaceae	cucharo
<i>Podocarpus sp</i>	Podocarpaceae	pino espatula
<i>Prunus persica</i> *	Rosaceae	durazno
<i>Lademburgia magnifolia</i>	Rubiaceae	cascarillo
<i>Citrus sinensis</i> *	Rutaceae	cítricos
<i>Citrus limonum</i> *		
<i>Citrus nobilis</i> *		
<i>Cyphomandra bfacea</i> *	Solanaceae	tomate de árbol
<i>Guazuma ulmifolia</i> *	Sterculiaceae	guasimo
<i>Freziera sp</i>	Theaceae	moton
<i>Drymis winteri</i>	Winteraceae	canelo de páramo

*Estas especies son reportadas como flora apícola mundial, según Polain (2000) y Salamanca *et al* (2004)

FUENTE: Esquema de ordenamiento territorial municipio de Totoró (2003)

3.2 DESCRIPCION MACROSCOPICA DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO

La caracterización organoléptica del propóleo se realizó con cada una de las dos muestras, se observó el aspecto físico, el color y el olor.

3.3 MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados se seleccionaron de acuerdo con su empleo en ensayos de susceptibilidad a antibióticos y ser representativos de grupos bacterianos que difieren en morfología, reacción al Gram. y de gran importancia clínica (Tabla 4).

Tabla 4. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antibacteriana.

MICROORGANISMO	REACCION AL GRAM	PROCEDENCIA	PATOLOGIAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco Gram. Positivo	MUC*	Neumonía, bronquitis, amigdalitis, otitis, forunculosis, celulitis abscesos, piodermatitis. (1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo Gram. negativo	MUC	Infecciones oportunistas en personas inmunosuprimidas neumonía y septicemia. (1)

*MUC = Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina interna, Universidad del Cauca.

1. Brooks, Butel y Morse, 2005

3.4 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

Una vez obtenido el propóleo en bruto se procedió a preparar los extractos, estos se prepararon de forma similar a los de uso comercial de acuerdo a las recomendaciones de preparación indicadas en COAPICA con el fin de hacer los ensayos lo mas cercano posible a la aplicación real de estos productos.

Las dos muestras de propóleo en bruto se llevaron al laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca (QCB) donde se pesaron y manualmente se fraccionaron en trozos más pequeños. Se tomaron 250 gramos de cada propóleo los cuales se depositaron en frascos de vidrio de boca ancha, en cada frasco se añadió un volumen conocido de etanol al 96% (600 ml), de tal manera que el solvente adicionado solo cubrió los trozos de propóleo en cada recipiente y luego se taparon herméticamente. Se dejaron en extracción a temperatura ambiente (23 °C), protegidos de la luz y con agitación ocasional por aproximadamente un mes, luego se filtraron con papel filtro whatman N°1 y el filtrado final se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su utilización.

Se utilizó etanol al 96% porque es el solvente más utilizado y mejor reconocido con el fin de estudiar la actividad del propóleo, conociéndose que extrae sus elementos y principios activos más importantes (Stangaciu, 1998), además se ha descubierto que existe una relación directa entre la concentración del etanol utilizado para la extracción y la actividad biológica del propóleo, encontrándose que a mayores concentraciones de etanol esta se incrementa (Park *et al*, 1998; Sawaya *et al*, 2002)). Se ha encontrado también que se obtienen mayores rendimientos en sólidos solubles con etanol que con otros solventes (Tolosa y Cañizares, 2002)

3.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Estos extractos fueron evaluados en su capacidad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Inicialmente se realizó tinción de Gram. y se estableció la curva de crecimiento de ambas bacterias midiendo la densidad óptica por el método espectrofotométrico a 600 nm (Gottenbos, Vandermei and Busscher, 2000) para determinar el tiempo al que se obtenía el número máximo de células de cada cepa. También se efectuó un recuento en cámara de Neubauer para establecer el número de células en cada cepa bacteriana, de las cuales se estimó alcanzaron aproximadamente una población de $5,4 \times 10^7$ a $11,0 \times 10^7$ células / ml para *P. aeruginosa* y *S. aureus* respectivamente.

3.6.1 Preparación del inóculo bacteriano. Los microorganismos fueron mantenidos bajo refrigeración en tubos tapa rosca con agar nutritivo, para la prueba se activaron sembrándolos en caldo nutritivo e incubándolos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Una vez activados se resembraron dichos microorganismos nuevamente en caldo nutritivo, incubándolos por un periodo de 9 horas para la bacteria Gram. positiva y 15 horas la bacteria Gram. negativa de acuerdo a lo reportado en la curva de crecimiento, para asegurar que las bacterias se encontraran en el punto máximo de la fase exponencial, inmediatamente antes del ensayo.

3.6.2 Pruebas de inhibición del desarrollo bacteriano. Se ensayaron distintos métodos de siembra y evaluación, resultando más adecuado el método de Concentración Mínima Bactericida (CMB) mediante dilución en caldo reportado por Tolosa y Cañizares (2002); Quintana *et al*, (2005) (Fig. 6 y 7). En el que al primer tubo se le añadieron 2 ml de extracto de propóleo, de este se tomó una alícuota de 2 ml que se añadió al tubo siguiente y así se procedió sucesivamente con los tubos restantes hasta desechar los últimos 2 ml, homogenizándose en un vortex cada tubo antes de realizar cada dilución, de esta forma la concentración del extracto de propóleo en cada tubo queda según se muestra en la (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones del extracto de propóleo obtenidas en las diferentes diluciones de la tintura madre.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	Control agua
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	0

Con el objetivo de descartar el efecto del etanol en el control negativo, se prepararon paralelamente una serie con la misma cantidad de tubos para cada bacteria, pero en lugar del extracto de propóleo al primer tubo se le añadieron 2ml de etanol al 96%, realizándose las diluciones correspondientes y lo mismo se hizo con el control positivo para el cual se utilizó ciprofloxacina (200 mg/10 ml) ya que según las pruebas de susceptibilidad a antibióticos (antibiograma), los dos microorganismos fueron sensibles a este antibiótico, además se realizó un control de crecimiento con agua destilada.

A cada tubo se le inocularon 100 µl (0.1ml) de la suspensión bacteriana en el punto máximo de la fase exponencial. Luego se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, posteriormente se tomaron 100 µl de cada uno de ellos y se sembraron en agar Mueller Hinton, se incubaron por otras 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, y al cabo de ese tiempo se observó si había crecimiento o no en las placas de petri, por la ausencia o presencia de colonias de los microorganismos inoculados, los aislados fueron considerados sensibles al extracto de propóleo cuando no hubo crecimiento en las placas después de 24 horas de incubación.

En las figuras 6 y 7 se observa un esquema general del montaje experimental realizado para las dos bacterias, cada ensayo fue sometido a 10 repeticiones.

Figura 6. Esquema general para obtener la Concentración Mínima Bactericida según la metodología aplicada.

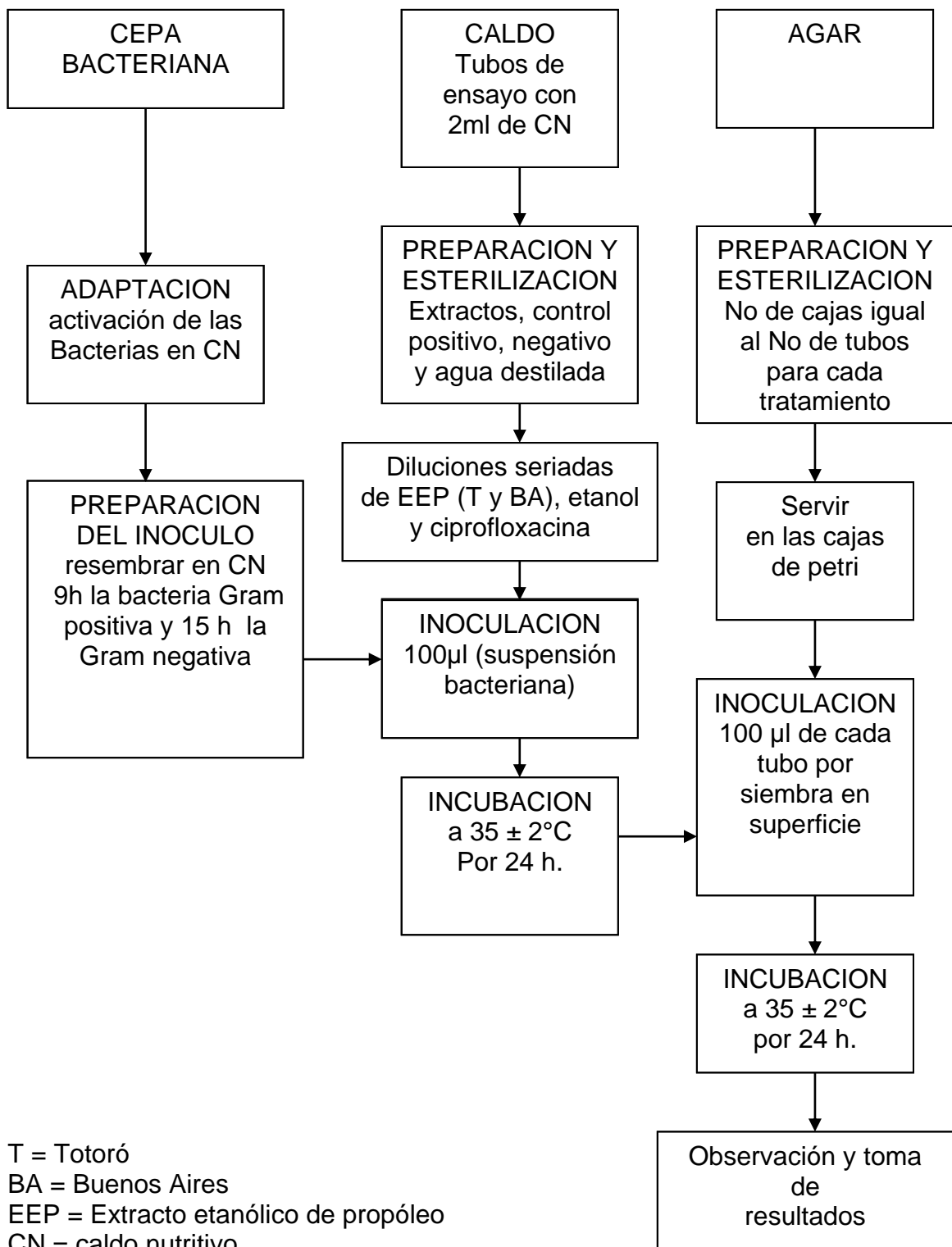
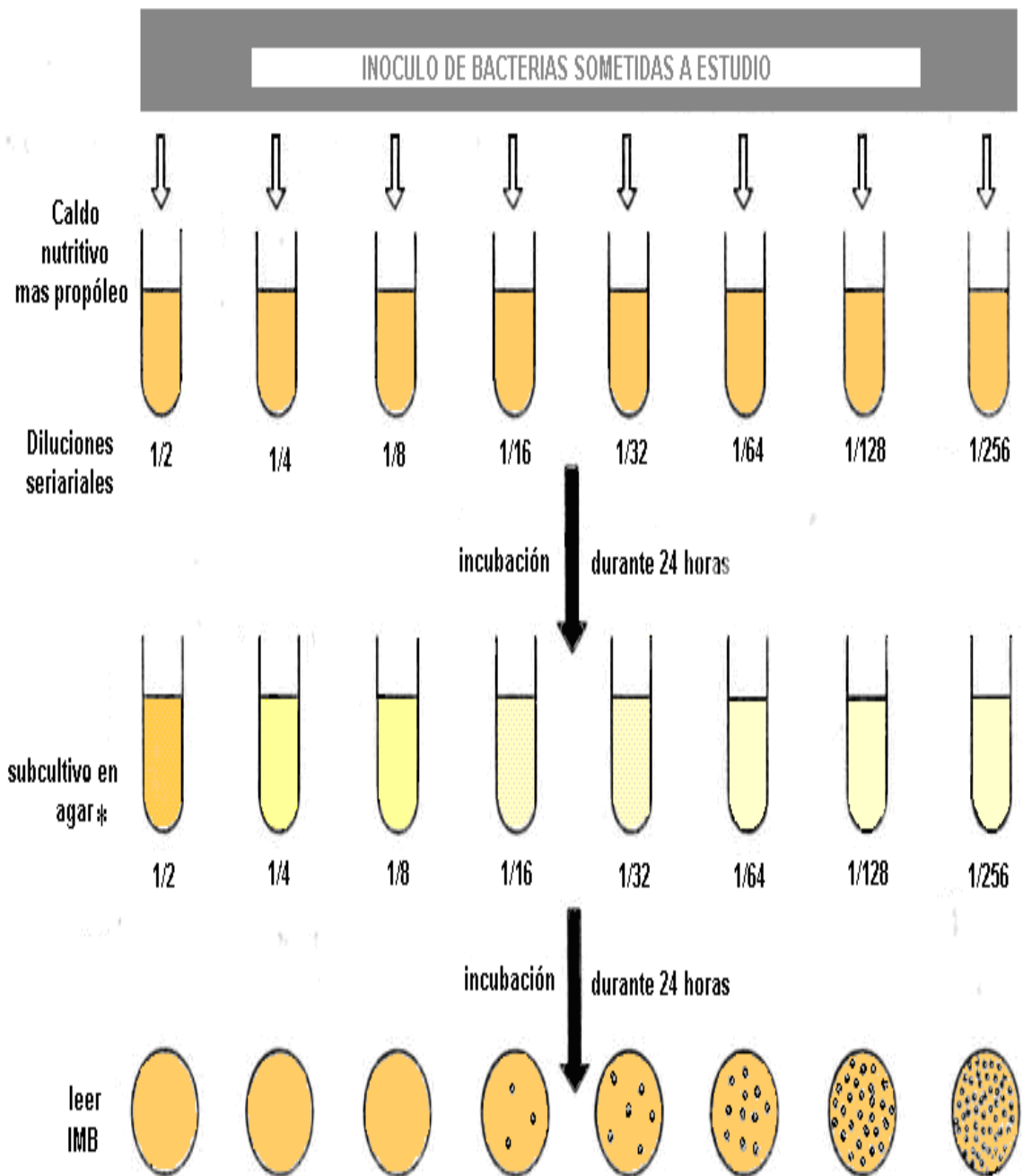


Figura 7. Esquema general para obtener la Concentración Mínima Bactericida.



*Debido a la turbiedad producida por el propóleo no se pudo determinar el efecto en este punto.

3.7 COMPARACION CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DEL PROPOLEO

Con el fin de establecer la presencia de algunos metabolitos secundarios relacionados con las actividades biológicas mencionadas se realizó la identificación de estos en los dos propóleos mediante algunas reacciones coloridas.

3.7.1 Pruebas para determinar flavonoides

3.7.1.1 Prueba de Shinoda. En tubos de ensayo que contengan los extractos alcohólicos de propóleo diluidos, colocar trocitos de magnesio y adicionar lentamente unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La aparición de una coloración anaranjada, roja, roja azulosa o violeta indica la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas. (Domínguez, 1973).

3.7.1.2 Prueba de hidróxido de sodio. A tubos de ensayo que contengan los extractos alcohólicos de propóleo diluidos, agregar unas gotas de hidróxido de sodio diluido. La aparición de colores amarillo o naranja se considera indicativa de la presencia de flavonoides (Fragoso, 2001).

3.7.2 Prueba para determinar alcaloides

3.7.2.1 Prueba de Dragendorff. A tubos de ensayo que contengan los extractos alcohólicos de propóleo adicionar el reactivo de Dragendorff. La formación de cristales rojizos o un precipitado indica la presencia de alcaloides. (Domínguez, 1973)

3.7.3 Prueba para determinar esteroides

3.7.3.1 Prueba de Liebermann-Burchard. A los extractos alcohólicos de propóleo se les adiciona este reactivo. La formación de colores azul, verde, rojo o anaranjado indica un resultado positivo

3.7.4 Prueba de cumarinas. En tubos de ensayo colocar 2 ml de los extractos etanolicos de propóleo, taparlos con papel filtro impregnado con solución de hidróxido de sodio y calentarlos (en baño maría) por algunos minutos, luego colocar

el papel filtro bajo la luz ultravioleta, la presencia de fluorescencia amarilla cuando indica un resultado positivo

3.7.5 Cromatografía bidimensional. Se realizó a cada propóleo una cromatografía bidimensional para hacer una comparación con la plantilla de coloración y de distribución de los flavonoides en el cromatograma que presenta J.J Mabry (Ramírez, 1998), para relacionar la posición con la estructura de los flavonoides.

Se emplearon dos solventes una solución de TBA (terbutanol, ácido acético y agua) y HOAc (ácido acético y agua), los cromatogramas se obtienen en láminas de papel cromatográfico Whatman N°3 colocando una cantidad de muestra de propóleo en la esquina izquierda y corriendo la cromatografía en la primera dimensión con el solvente TBA, el cual tiene una duración de aproximadamente 12 horas, terminada esta fase se retira la lámina de papel cromatográfico y se deja secar para correr la segunda fase, para lo cual se utiliza el segundo solvente HOAc, se gira el cromatograma 90 grados hacia la izquierda con respecto a la primera posición. Este recorrido de la muestra tarda de 5 a 6 horas.

Cuando se ha desarrollado la cromatografía en sus dos dimensiones se retira el cromatograma de la cámara y se deja secar; luego se revela por medio de la lámpara ultravioleta y se identifican los diferentes componentes de la muestra después de demarcar cada mancha en el cromatograma se compara la ubicación de estas con la plantilla de distribución de flavonoides propuesto por Mabry (1970) (Fig. 8), se identifica su color y así mismo se compara con la plantilla de coloración que presenta JJ Mabry (1970) (Tabla 6)

Después de demarcar la mancha en el cromatograma se calcula el Rf para cada componente (manchas en la lámina) mediante la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia entre el origen y el centro de la mancha}}{\text{Distancia entre el origen y el frente del solvente}}$$

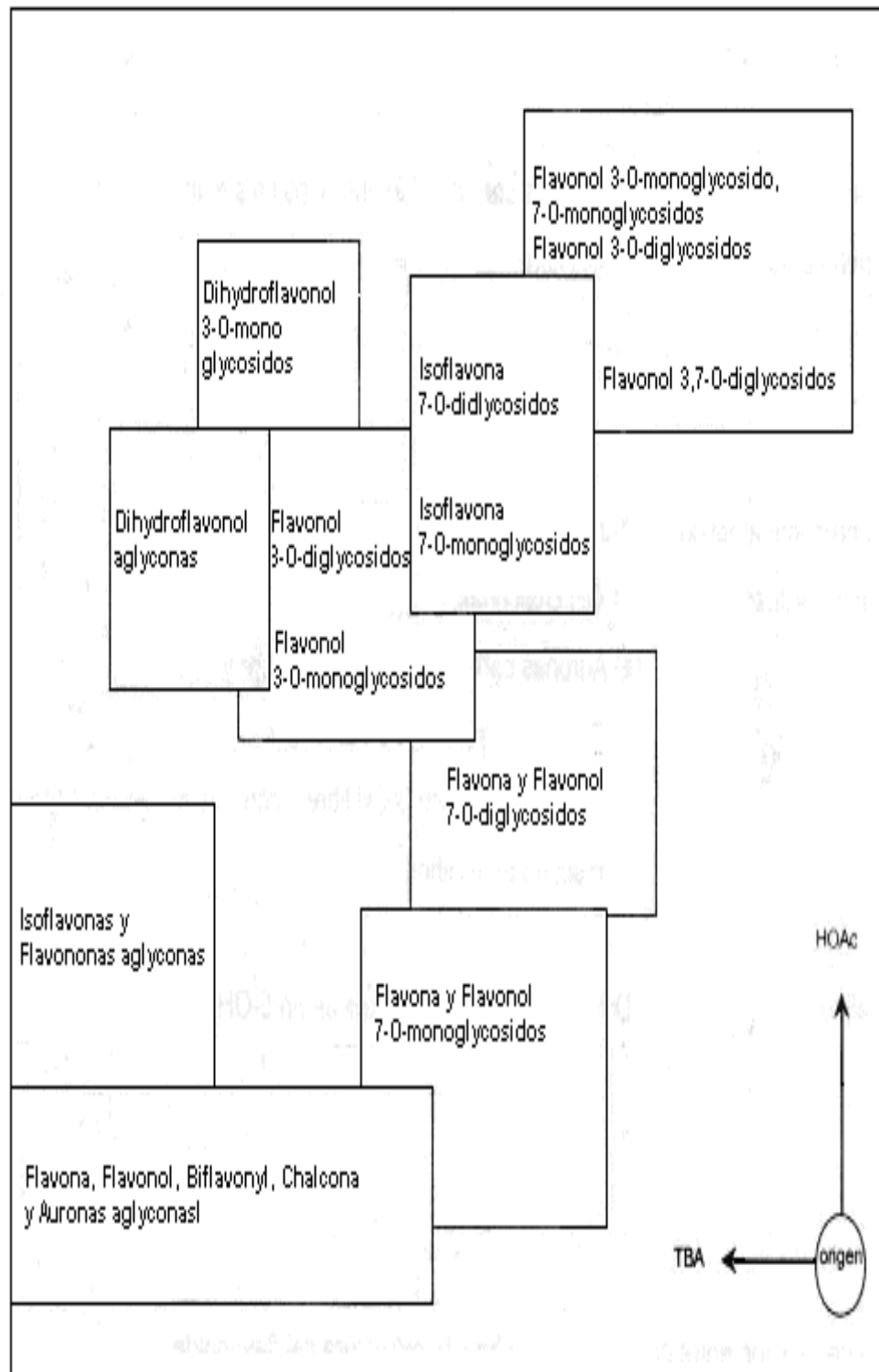
Luego se recorta cada mancha la cual se deposita en un beaker junto con solución metanólica y un agitador magnético para aislar el pigmento del papel y realizar el análisis espectral por medio del espectrofotómetro.

Tabla 6. Relación entre el color de la mancha y la estructura del flavonoide

Color de la mancha del flavonoide bajo luz uv.	Tipo de flavonoide
1. Violeta intenso	(a) Usualmente flavonas con 5-OH y 4-OH (b) Algunos 5-OH flavonas y 4-OH chalconas de anillo B carentes de grupos hidroxilo (c) Flavonas o flavonoles con 5-OH pero con el 4-OH ausente o sustituido (d) isoflavonas, dihidroflavonoles y algunas flavonas con 5-OH (e) Chalconas con 2-o 6-OH pero sin un 2- o 4 -OH Algunas 5-OH flavonas Chalconas con un 2-y/o 4-OH
2. Azul fluorescente suave	(a) Flavonas y flavononas carentes de un 5-OH libre (b) Flavonoles carentes de un 5-OH libre pero con el 3-OH sustituido (c) Isoflavonas carentes de un 5-OH libre
3. Amarillo suave, amarillo naranja o naranja fluorescente	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin un 5-OH libre
4. Amarillo fluorescente, amarillo verdoso, azul verdoso o verde	(a) Auronas con un 4-OH libre y algunas 2- o 4-OH chalconas (b) Auronas carentes de un 4-OH libre y flavononas carentes de un 5-OH (c) Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin un 5-OH libre
5. Amarillo pálido	Dihydro flavonoles carentes de un 5-OH

Fuente: Mabry, 1970

Figura 8. Plantilla de distribución de los flavonoides en el cromatograma.



Fuente: Mabry, 1970

Tabla 7. Clases principales de flavonoides y su absorción en determinadas longitudes de onda

Variación en la absorción UV de los flavonoides (nm)	
Esqueleto	MeOH
Flavonas	315-350
Flavonoles	350-385
Flavanonas	275-295
Isoflavonas	250-270
Chalconas	370-395
Auronas	385-415
Antocianinas	475-545

Fuente: Marcano y Hosegawa, 1991.

3.7.6 Cromatografía en capa delgada (CCD). Los análisis por la técnica de cromatografía en capa delgada (CCD) fueron realizados aplicando las muestras de cada propóleo en cromato placas de sílica gel. Se utilizó un sistema de fase móvil conteniendo una mezcla de solventes: hexano / acetato de etilo/ ácido acético según Sawaya *et al*, (2004) en una proporción de 80:20:1 (v/v). La visualización del perfil general de las muestras fue realizado a través de lámpara con UV a una longitud de onda de 365 y 254 nm.

3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL.

El experimento se hizo con un diseño de bloques completamente aleatorizado, en el cual las repeticiones del experimento son los bloques y en cada experimento o bloque se evaluaron todas las concentraciones de propóleo de las dos procedencias por triplicado. Como variable independiente se consideró la procedencia de los propóleos con dos categorías (Buenos Aires y Totoró) y como variable dependiente las concentraciones bactericidas.

Para el análisis estadístico estas fueron sometidas a las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk $p < 0,05$) y de homogeneidad de varianzas (Levene; $p < 0,05$) y como no cumplieron con estos requisitos, el análisis comparativo se hizo mediante la prueba no paramétrica de Kruscal Wallis, complementada con la prueba de comparaciones múltiples T3 de Dunnet, para varianzas no homogéneas, Todo el análisis estadístico se hizo con el paquete estadístico SPSS, con un nivel máximo de significancia de 0.05.

4. RESULTADOS

4.1 DESCRIPCION DE LAS MUESTRAS Y LOS EXTRACTOS DE PROPOLEO

Se pudo observar que ambas muestras de propóleo presentaron aspecto de trozos irregulares, opacos, duros y difíciles de fraccionar. El extracto etanólico de Buenos Aires presentó color amarillo, mientras el de Totoró café oscuro, el olor de ambas muestras fue resinoso aunque el propóleo de Totoró fue mas aromático. El pH de los extractos fue también determinado en valores de 4,94 y 5,54 para Buenos Aires y Totoró respectivamente.

4.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los valores de Concentración mínima Bactericida (CMB) para las dos especies bacterianas empleando los dos extractos etanólicos de propóleo. Esta lectura fue registrada como el valor de la menor concentración del extracto que fue capaz de eliminar completamente el desarrollo bacteriano.

Tabla 8. Concentración mínima bactericida (CMB) obtenida después de la evaluación de las replicas de los extractos etanólicos de los dos propóleos sobre las bacterias evaluadas.

Procedencia del propóleo	Concentración mínima bactericida	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Totoró	15,39 mg/ml	30,78 mg/ml
Buenos Aires	17,03 mg/ml	17,03 mg/ml

También se determinaron las concentraciones del solvente (etanol) en el control negativo con las cuales no se afecta el crecimiento de los microorganismos utilizados, para compararlos con las concentraciones del solvente en cada una de las diluciones de los extractos (Tabla 9). De esta manera se asegura que la actividad antimicrobiana no sea debida a la acción del solvente.

Tabla 9. Concentraciones a las que iba quedando el solvente (etanol mg/ml) en cada tubo de las diluciones seriales que fueron realizadas a los dos extractos de propóleo y al control negativo.

	Concentración de etanol en tubos con propóleo de Totoró	Concentración de etanol en tubos con propóleo de Buenos Aires	Concentración de etanol en tubos con etanol (control negativo)
Concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano	274 mg/ml *(1)	265 mg/ml (1)	240 mg/ml (1)
	137 mg/ml (2)	132,5 mg/ml (2)	
	68,5 mg/ml (3)	66,25 mg/ml (3)	
	34,25 mg/ml (4)		
Concentraciones que no inhibieron el crecimiento bacteriano	17,12 mg/ml (5)	33,12 mg/ml (4)	120 mg/ml (2)
	8,56 mg/ml (6)	16,56 mg/ml (5)	60 mg/ml (3)
	4,28 mg/ml (7)	8,28 mg/ml (6)	30 mg/ml (4)
	2,14 mg/ml (8)		15 mg/ml (5)

*Numero de diluciones realizadas a cada extracto en donde se determinó la concentración de etanol

Como se observa en la Tabla 9 solo en la primera dilución que se realizó a ambos propóleos, el etanol se encontraba a una concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, por lo cual la primera caja correspondiente a esta concentración no se considero en el ensayo.

Por otra parte los resultados del análisis estadístico indicaron que las concentraciones de los extractos en general no se ajustaron a la distribución normal ni a la homogeneidad de varianzas, en consecuencia los análisis para el efecto antimicrobiano del propóleo sobre las dos bacterias se realizaron mediante prueba no paramétrica de Kruscal-Wallis. Luego mediante análisis de comparaciones múltiples con la prueba T3 de Dunnet se logró establecer que entre los extractos de propóleos provenientes de Totoró y Buenos Aires no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en las concentraciones bactericidas frente a *S. aureus*; pero si frente a *P. aeruginosa* ($p < 0.05$) (Tablas 10 y 11). De acuerdo con este resultado se encontró que el extracto más efectivo fue

el de Buenos Aires ya que, aunque la concentración bactericida fue muy similar entre los dos extractos de propóleo contra la bacteria Gram positiva, la concentración bactericida contra la Gram negativa fue mucho menor, aproximadamente la mitad de la concentración requerida del propóleo de Totoró.

En las Figuras 9 y 10, se observan las cajas que contenían concentraciones decrecientes de los dos extractos de propóleo a partir de la segunda dilución, además de las correspondientes a las mismas diluciones en el control negativo, constituyendo las últimas cajas en donde no hubo crecimiento de los microorganismos, la concentración mínima bactericida que fue reportada para ambos propóleos.

En las demás placas las colonias se desarrollaron con normalidad al igual que en las placas de control de crecimiento testigo que solo contenían el medio, agua destilada y el inóculo, observándose las características típicas de estas dos especies bacterianas, como lo son las colonias blancas redondeadas del *S. aureus* y la pigmentación verdosa del medio producida por la *P. aeruginosa*,

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico de las concentraciones de los dos extractos que tuvieron un efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus*

SITIOS DE ORIGEN DEL PROPOLEO		EFECTO				P Sig.
		Concentraciones Bactericidas		Concentraciones No Bactericidas		
TOTORO	123,13 mg / ml *(1)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 55,33±6,50 (42,19-68,47)	7,69 mg / ml (5)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 3,39±0,40 (2,57-4,21)	0,000 Sig ***	
	61,57 mg / ml (2)		3,85 mg / ml (6)			
	30,78 mg / ml (3)		1,12 mg / ml (7)			
	15,39 mg / ml (4)		0,96 mg / ml (8)			
BUENOS AIRES	68,12 mg / ml (1)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 39,74±3,94 (31,67-47,80)	8,51 mg / ml (4)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 4,97±0,49 (3,96-5,97)	0,000 Sig ***	
	34,06 mg / ml (2)		4,26 mg / ml (5)			
	17,03 mg / ml (3)		2,13 mg / ml (6)			
P Sig.	0,234 No significativa		0,092 No significativa			

*Numero de diluciones realizadas a cada extracto

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico de las concentraciones de los dos extractos que tuvieron un efecto bactericida sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

SITIOS DE ORIGEN DEL PROPOLEO		EFECTO				P Sig.
		Concentraciones Bactericidas		Concentraciones No Bactericidas		
		TOTORO	123,13 mg / ml *(1)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 71,82±6,78 (58,0-85,65)	15,39 mg / ml (4)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 8,97±0,84 (7,24-10,70)
61,57 mg / ml (2)	7,65 mg / ml (5)					
30,78 mg / ml (3)	3,85 mg / ml (6)					
BUENOS AIRES	68,12 mg / ml (1)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 42,0±3,89 (34,04- 49,96)	8,51 mg / ml (4)	$\bar{x} \pm E.E (I.C 95\%)$ 4,53±0,70 (4,53-7,41)	0,000 Sig ***	
	34,06 mg / ml (2)		4,26 mg / ml (5)			
	17,03 mg / ml (3)		2,13 mg / ml (6)			
P Sig.	0,001 significativa		0,001 significativa			

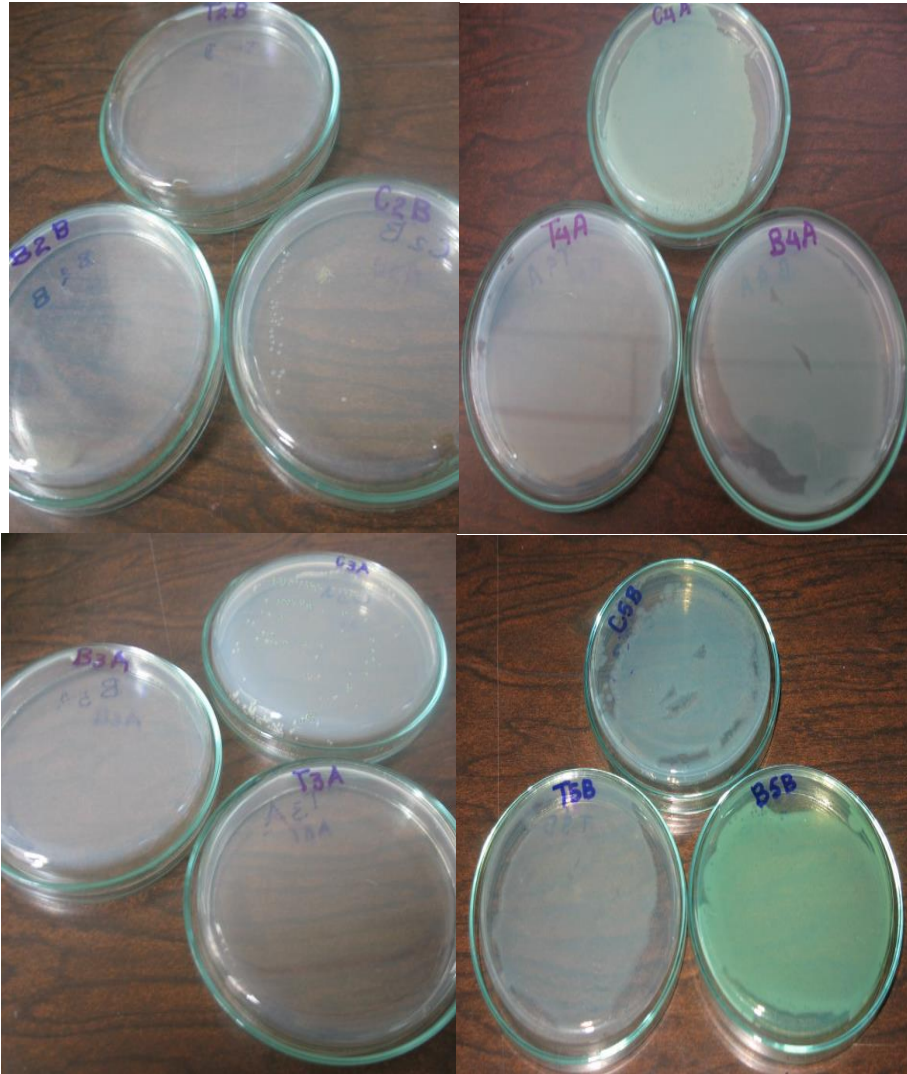
*Numero de diluciones realizadas a cada extracto.

Figura 9. Inhibición del desarrollo de *Staphylococcus aureus* verificada en placas de cultivo



Las placas contenían los extractos alcohólicos de propóleos de Totoró (T), Buenos Aires (B) y el control (C).

Figura 10. Inhibición del desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* verificada en placas de cultivo



Las placas contenían los extractos alcohólicos de propóleos de Totoró (T), Buenos Aires (B) y el control (C).

4.3 COMPARACION CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DE LOS PROPOLEOS

El análisis fitoquímico de los extractos etanólicos de los propóleos se expresa en la Tabla 12.

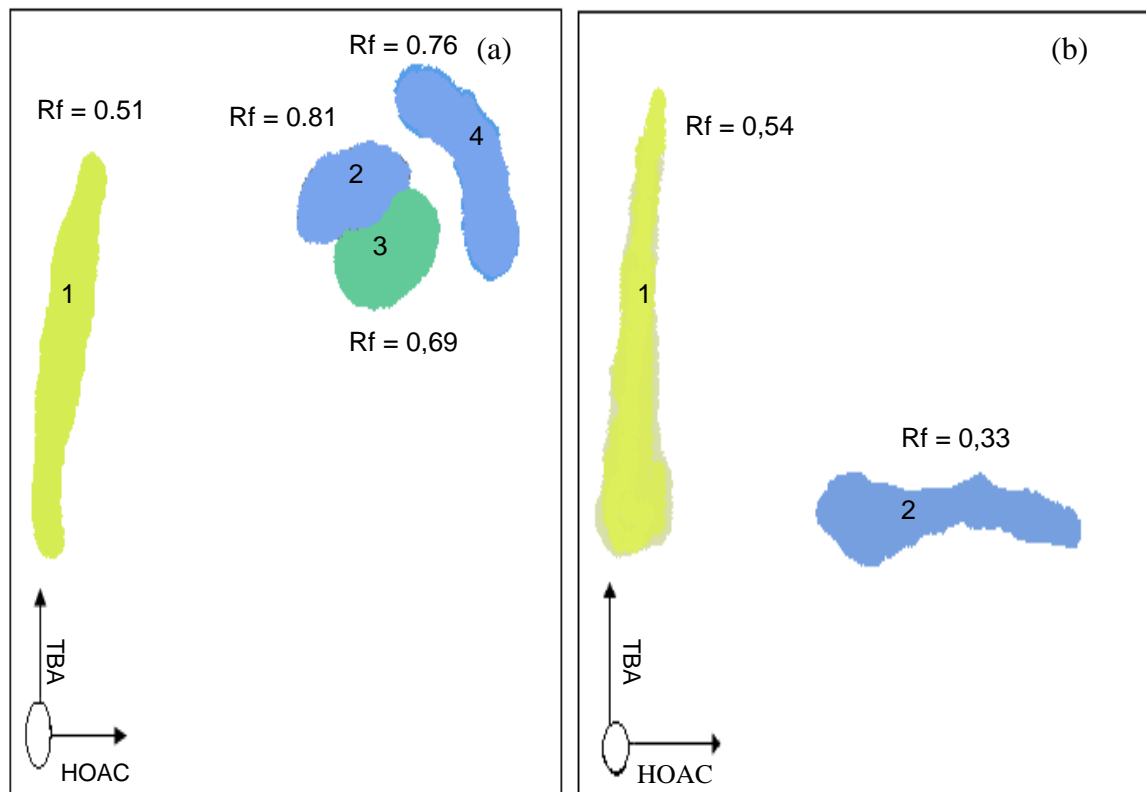
Tabla 12. Resultados obtenidos de la determinación cualitativa de algunos metabolitos secundarios presentes en el propóleo de Totoró y Buenos Aires.

METABOLITOS	PRUEBA	RESULTADO
Flavonoides	Shinoda	Positivo
	Hidróxido de sodio	Positivo
Alcaloides	Dragendorff	Positivo
Esteroides y Terpenos	Liebermann-Burchard	Negativo
Cumarinas		Positivo

La presencia de flavonoides fue detectada en las reacciones coloridas y los resultados de los cromatogramas indican que se separaron 6 compuestos. Las manchas solo se observaron con luz ultravioleta, por definición los fenoles son compuestos aromáticos y en consecuencia generalmente fluorescen o atrapan luz, por lo cual se tiene la seguridad que las manchas observadas son compuestos fenólicos.

Se encontraron 4 manchas (Fig. 11.a) y dos manchas (Fig. 11.b) de distinta intensidad para los propóleos de Buenos Aires y Totoró respectivamente, a las que se denominó B1(Buenos Aires-mancha1), B2 (Buenos Aires-mancha2), B3 (Buenos Aires-mancha 3), B4 (Buenos Aires-mancha 4), T1 (Totoro- mancha 1) y T2 (Totoro-mancha 2)

Figura 11 Cromatogramas de los propóleos de: (a) Buenos Aires, (b) Totoró, identificación de color y Rf de la mancha.



En las Tablas 13 y 14 se presentan los resultados obtenidos a partir de la separación mediante cromatografía de papel en dos dimensiones y su análisis espectroscópico.

Tabla 13. Datos cromatográficos y espectroscópicos del propóleo de Buenos Aires

Mancha	Color	Rf Encontrad	Λ (nm) Encontrad	Posible Clase de Flavonoide
B1	Verde limón	0.51	277	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>flavonol</p> <chem>O=C1C(=O)C(O)=C(O)C=C1</chem> </div> <div style="text-align: center;"> <p>flavanona</p> <chem>O=C1C(=O)C(O)C(O)C=C1</chem> </div> </div>

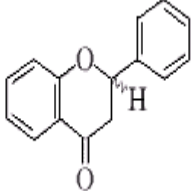
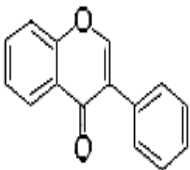
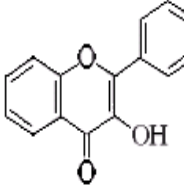
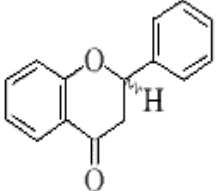
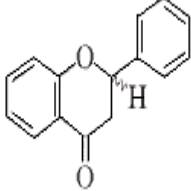
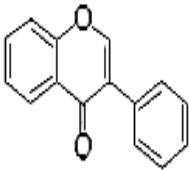
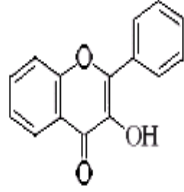
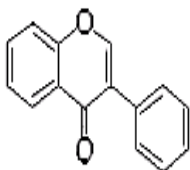
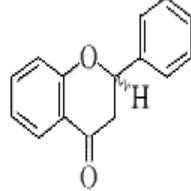
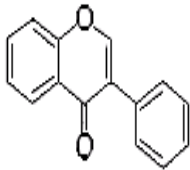
B2	Azul ciano	0.81	276	flavanona 	isoflavona 
B3	Verde Turquesa	0.69	277	flavonol 	flavanona 
B4	Azul ciano	0.76	275	flavanona 	isoflavona 

Tabla 14. Datos cromatográficos y espectroscópicos del propóleo de Totoró

Mancha	Color	Rf Encontrado	Λ (nm) Encontrado	Posible Clase de Flavonoide	
T1	Amarillo limón	0.54	246	flavonol 	isoflavona 
T2	Azul ciano	0.33	276	flavanona 	isoflavona 

En las figuras 12, 13, 14 y 15 se muestran los espectros de absorción de las manchas detectadas para el propóleo de Buenos Aires.

Figura 12. Espectro de absorción para la mancha 1(B1)

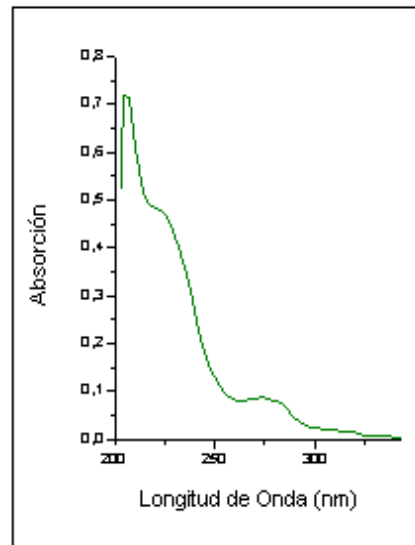


Figura 13. Espectro de absorción para la mancha 2 (B2)

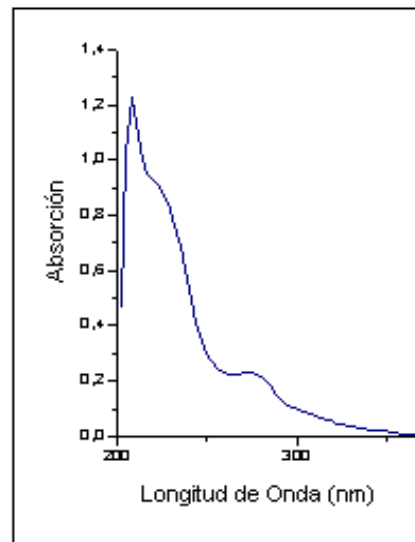


Figura 14. Espectro de absorción para la mancha 3 (B3)

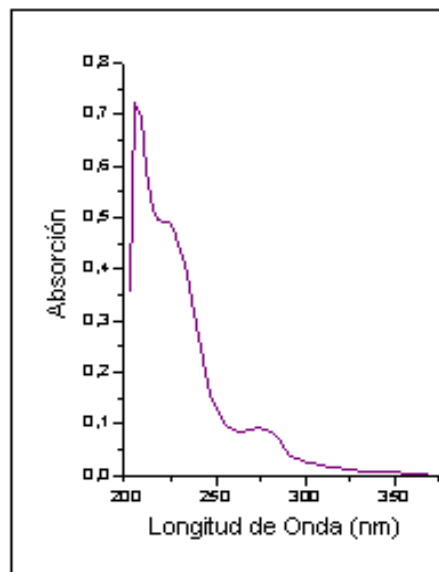
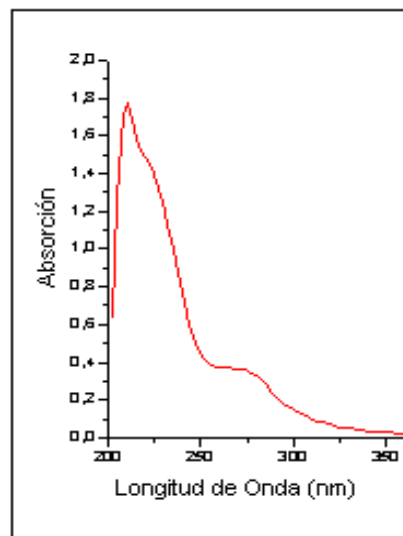


Figura 15. Espectro de absorción para la mancha 4 (B4)



En las figuras 16 y 17 se muestran los espectros de absorción de las manchas detectadas para el propóleo de Totoró.

Figura 16. Espectro de absorción para la mancha 1(T1)

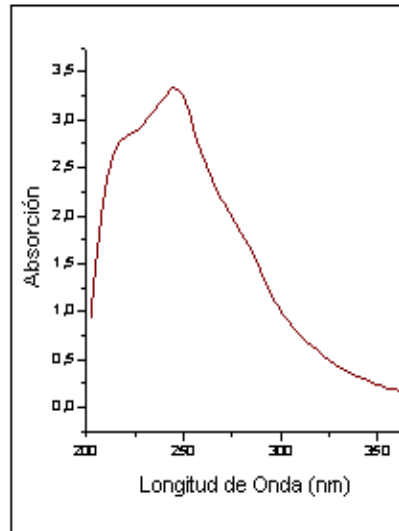
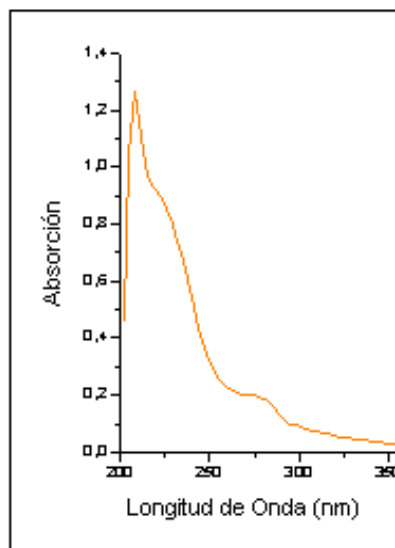
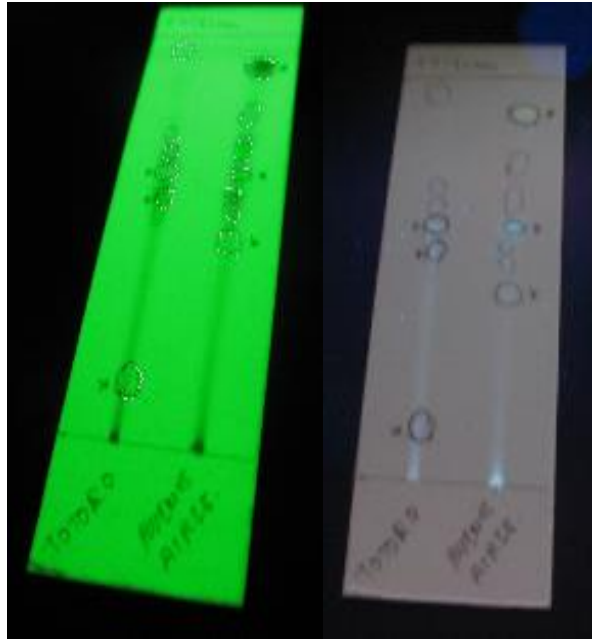


Figura 17. Espectro de absorción para la mancha 2 (T2)



En la figura 18 se presentan los cromatogramas que resultaron de aplicar la técnica de cromatografía en capa delgada, para los dos propóleos estudiados

Figura 18. Cromatografía en capa delgada de los dos propóleos



(Totoró- muestra a la izquierda en las placas) (Buenos Aires-muestra a la derecha en las placas) observadas con lámpara UV a una longitud de onda de 365 (verde) y 254 (blanca) donde se pudo observar una mayor diversidad de compuestos químicos en el propóleo de Buenos aires

5. DISCUSION

5.1 DESCRIPCION MACROSCOPICA DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO

El aspecto, estructura, consistencia, color y olor se determinaron mediante pruebas sensoriales y como se observó se detectaron variaciones en los colores obtenidos, lo mismo observaron Tolosa y Cañizares (2002) en 10 extractos de propóleos los cuales variaban en coloración desde el ámbar claro al café oscuro pasando por el amarillo, el pardo y el rojo. Esta diferenciación en la pigmentación era esperada ya que según Asís (1989) la coloración de los propóleos depende de la vegetación existente en las zonas donde se ubican las colmenas. Además en el Boletín apícola (2000) reportaron una relación apreciable entre el olor del propóleos y el contenido de impurezas, encontrándose que muestras de propóleo con olor aromático o muy aromático poseen bajo contenido de ceras e impurezas mecánicas, lo cual estuvo de acuerdo con lo encontrado a través de las pruebas sensoriales, ya que por el modo de extracción se espera que el propóleo de Totoró sea más limpio.

Se encontró que en las condiciones de este estudio y para las dos muestras analizadas, la cantidad de extracto blando de propóleo fue diferente entre las dos zonas biogeográficas, ya que para las dos muestras aun cuando las mismas cantidades de propóleo provenientes de Totoró y Buenos Aires fueron disueltas en el mismo volumen de etanol su concentración final fue distinta, obteniéndose una mayor concentración en el extracto de Totoró que en el de Buenos Aires, lo cual se podría explicar según Uzel *et al* (2005) por los diferentes constituyentes en las muestras, ya que si el contenido de los componentes hidrofílicos en los extractos de propóleo son altos, la solubilidad de estos se podría ver incrementada, de igual manera ellos reportaron que los constituyentes flavonoides de los propóleos podrían encontrarse en mayor concentración cuando el propóleo es más soluble.

5.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Con relación a la efectividad antimicrobiana, en la tabla 8, se muestran los resultados de los valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB) para las especies bacterianas ensayadas utilizando los dos extractos de propóleo, en donde el solvente se encontraba a una concentración que no mostró inhibición del crecimiento de las bacterias estudiadas. Estos resultados sugieren que la acción antibacteriana de los extractos se debió principalmente a la presencia de compuestos con actividad inhibitoria constituyentes de los propóleos.

Como se muestra en la tabla 8 las concentraciones requeridas para inhibir a *Staphylococcus aureus* fueron 15,39 mg/ml y 17,03 mg/ml de extracto etanólico

de Totoró y Buenos Aires respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto a la inhibición de esta bacteria. (Tabla 10) (Anexo 2) Valores mas altos de CMB fueron reportados por Morse (1975) y Marcucci (1995) donde ellos encontraron que *Staphylococcus aureus* se inhibía totalmente con 60-70 mg/ml y 120 mg/ml de propóleo, respectivamente. Entretanto otros autores han reportado rangos menores de concentración inhibitoria para la misma (Sawaya, 2004; Fontana, 2000). Estas diferencias podrían ser explicadas por distintas razones, entre ellas la composición de los medios de cultivo usados en los diferentes estudios, ya que se ha visto que los biocidas son influenciados por los componentes de los medios en que se realizan los ensayos de susceptibilidad (Del Río Martínez, 2006). Además de la heterogeneidad que presenta la composición química de los diferentes propóleos, que se han estudiado.

De acuerdo a la tabla 8, *Pseudomonas aeruginosa* resultó la especie bacteriana más resistente ya que se necesitó mayor concentración del extracto proveniente de Totoró para ser inhibida. Similares resultados han reportado varios investigadores (Bankova *et al*, 1999; Marcucci, 1995), lo cual era de esperar por tratarse de una bacteria Gram negativa, debido a que estas bacterias a pesar de poseer una estructura de pared celular menos rígida que las Gram positivas, tienen una pared celular químicamente más compleja, así mismo tienen una proporción lipídica mayor, tales características pueden estar involucradas con la mayor resistencia a los extractos. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Valdez *et al* (1985) en donde observó que los extractos alcohólicos de propóleo son significativamente mas activos frente a bacterias Gram positivas y resultan más sensibles las cepas de *Staphylococcus aureus*.

La (CMB) encontrada para la bacteria Gram negativa utilizando el propóleo de Buenos Aires (17,03 mg/ml), fue menor que la hallada para el propóleo de Totoró (30,78 mg/ml). El análisis de comparación de medias de Duncan además mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la actividad antimicrobiana, indicando que para la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* el propóleo de Buenos Aires fue más efectivo.

Este resultado es aparentemente contradictorio debido a que en la detección cualitativa de los metabolitos, se comprobó que tanto el propóleo de Totoró como el de Buenos Aires presentaban los mismos componentes (Tabla 12), por lo que se pudiera esperar una acción antimicrobiana similar e incluso mayor para el propóleo de Totoró ya que por su método de recolección se esperaría un propóleo más limpio y se podría pensar que los metabolitos se encontrarán en mayor cantidad en este extracto. Pero según Martínez (2003) la concentración del extracto seco no necesariamente indica un potencial específico, puesto que los patrones de una molécula o grupo de moléculas en particular pueden ser suficientemente distintos para permitir la discriminación entre propóleos de diferente origen geográfico, por lo que otro factor que muy seguramente determina el resultado obtenido es la diversidad de flavonóides y otros compuestos químicos

presentes en los extractos (Tablas 13 y 14) pues se ha especulado que ellos actúan en sinergismo para optimizar su acción y no solo la cantidad sino también la variedad de compuestos fenólicos y de diferentes grupos químicos aumenta enormemente la funcionalidad del propóleo. Similares resultados obtuvo Adelman (2005) con extractos de propóleo de Curitiba (Brasil) en donde a pesar de que la proporción de flavonoides y compuestos fenólicos variaron mucho entre las muestras de propóleo, no siempre las que tenían mayores concentraciones de estos compuestos presentaron mayor actividad antimicrobiana, y Koo *et al* (2002); Fontana *et al* (2000) donde evaluando los efectos antibacterianos de distintos grupos químicos encontrados en el propóleo, ácidos fenólicos y los principales flavonoides constituyentes, concluyeron que su actividad biológica definitivamente esta relacionada con el efecto sinérgico de todos sus compuestos mas que a la acción de cada uno de ellos por separado, ya que de forma aislada estos tuvieron muy poca o ninguna actividad.

Como se ha señalado el propóleo es una sustancia de composición compleja en la cual se han detectado distintos tipos de flavonoides y otras sustancias, esto nos permite afirmar que las diferencias detectadas en la acción antibacteriana de los extractos evaluados muy posiblemente estén asociadas a las diferencias en composición lo cual requerirá de estudios posteriores, pues Serra *et al* (1994); Orsi *et al* (2006); Fernández (2006); Park *et al* (2002) también reportan haber encontrado diferencias significativas en la actividad antibiótica de propóleos de diferente origen geográfico. Incluso Lozina (2005) encontró que la tintura de propóleo a una concentración de 0,30 mg/ml, inhibió el desarrollo de microorganismos tan resistentes como lo son las levaduras y en las que por lo general el propóleo no ejerce acción, demostrando así el poder antimicrobiano que tiene el propóleo de algunas regiones.

Otra característica de los extractos que puede estar relacionada con su efectividad como antimicrobiano es su medida de acidez, un parámetro fisicoquímico muy importante si se tiene en cuenta que en rangos generales el pH óptimo para el crecimiento de las bacterias esta alrededor de 7, pero su disminución puede influir drásticamente en la reducción de la población bacteriana (Chavarrias, 2006). Esto también podría explicar el hecho de que el propóleo de Buenos Aires tuviera mayor éxito como bactericida.

5.3 COMPARACION CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DEL PROPOLEO

Mediante el estudio fitoquímico, el análisis preliminar para esteroides y terpenoides por medio de la prueba de Liebermann-Burchard dio negativa encontrándose ausencia de estos en los dos extractos de propóleo, mientras que para ambos estuvieron presentes metabolitos secundarios como las cumarinas (Tabla 12).

Se reveló también la presencia de alcaloides en los dos extractos estudiados, similar con el reporte de Tolosa y Cañizares (2002) quienes también encontraron presencia de alcaloides en propóleos de Campeche en México.

Se detectaron asimismo flavonoides en los dos extractos de propóleo mediante las pruebas que indican la presencia del núcleo de la γ -benzopirona. Muchas investigaciones sobre el propóleo han atribuido la acción antibacteriana principalmente a estos metabolitos, por lo cual su hallazgo es interesante para los fines de la efectividad antibacteriana de los extractos estudiados, pero también los otros grupos químicos encontrados, se encuentran entre los más importantes con actividad antimicrobiana según Domingo y López-Brea (2003).

Todos estos resultados fueron contrarios a los reportados por Solano y Coronado (2000) quienes encontraron ausencia de alcaloides y cumarinas, pero estando presentes los esteroides en su estudio fitoquímico a tres muestras de propóleo Nacional provenientes de los departamentos de Boyacá, Quindío y Cundinamarca pudiéndose de esta manera establecer grandes diferencias entre la composición química de los propóleos entre departamentos cercanos y el departamento del Cauca.

El hallazgo de estos compuestos químicos debe estar relacionado con el hecho de que en ambas localidades se encontró abundancia de plantas que hacen parte de la flora utilizada por las abejas para la obtención de néctar, polen y otras sustancias que son necesarias para la elaboración de sus productos (Polaina, 2000; Salamanca *et al*, 2001; Salamanca *et al*, 2004), además, gran parte de la vegetación que se encuentra en estos municipios son especies arbustivas y arbóreas productoras de resinas, látex, mucílago y gomas que son señaladas por Salamanca (2001) como una de las principales fuentes que las abejas convierten en propóleos en las regiones tropicales, y en muchas de las secreciones producidas por estas especies según estudios químicos (Fernández, Batista y Sarduy, 1995; Baldizan *et al*, 2006), se han encontrado una gran variedad de metabolitos secundarios incluidos trazas de alcaloides lo cual podría explicar la presencia de estos en los propóleos. Estos resultados coinciden con lo planteado por algunos autores en relación a que los polifenoles y compuestos nitrogenados constituyen los dos grupos de metabolitos secundarios de mayor distribución en las plantas superiores (Baldizan, 2006) que de esta manera formarían parte de la composición química final de los propóleos.

Además el resultado positivo en la identificación de flavonoides también fue corroborado a través del análisis por cromatografía bidimensional, observando por espectroscopia UV visible en el cromatograma la presencia de varias manchas, se obtuvieron 6 componentes a los que denominamos T1, T2, B1, B2, B3, y B4, los cuales al ser luego analizadas por espectrofotometría (Fig. 12 a 17) exhibieron un perfil de barrido similar a los reportados por Ademán (2005; Park *et al* 1998)

con propóleos de diferentes regiones de Brasil y con máximos de absorción entre las longitudes de onda que se conoce son atribuidos a los flavonóides y fenoles.

Entre los extractos el que presento una mayor absorbancia en esa región fue el de Totoró (Fig. 16) debido posiblemente a que por el método de recolección este extracto se encontraba más concentrado que el de Buenos Aires, y a que este último podría contener un alto contenido de ceras. Pero como se dijo anteriormente la concentración de flavonóides no siempre coincide con las actividades biológicas de las muestras, esto también pudo ser observado en este estudio en donde a pesar de que la concentración de flavonóides fue mas reducida en el extracto etanólico proveniente de Buenos Aires este poseía una elevada actividad antimicrobiana por contener mayor diversidad de compuestos químicos. (Fig 11.a, b y 18). Debiéndose considerar que ningún componente aisladamente tiene una actividad biológica mayor que todo el extracto en conjunto como lo planteo Marcucci (1996); Kujumgiev *et al.* (1999).

Bajo conformidad con lo reportado por Mabry (1970) según la posición en el cromatograma y el color mostrado al ser revelados bajo UV (Tabla 6, Fig. 8) además del estudio espectroscópico que reveló la absorción en determinadas longitudes de onda (Tabla 7), señalamos la presencia de flavonoles, flavononas, e isoflavonas como posibles grupos estructurales presentes en los propóleos evaluados, no podemos definir un flavonóide en específico porque los métodos y pruebas empleadas en este estudio son generales, permitiendo solamente dar una aproximación a los tipos de flavonóides presentes en los extractos. Sin embargo según la literatura (Galiano, 2007; Muñoz *et al*, 2007; PRONARA, s,f; Salamanca *et al*, 2007; Salamanca *et al*, 2001) los núcleos de flavonoides señalados se encuentran entre los principales identificados en propóleos. Además según los colores y valores de R_f de las manchas se puede plantear que presentan diferente composición.

Un método cromatográfico analítico rápido para verificar el perfil de componentes de un extracto de propóleo se vuelve imprescindible conforme aumenta el uso de esta sustancia y como la cromatografía en capa delgada requiere apenas de cromatoplacas, esta metodología demostró ser buena para evaluar estas muestras. Además según Ademán (2005) como la composición del propóleo varia de acuerdo con la región donde fue colectado, una CCD (cromatografía en capa delgada) parece ser una metodología útil en el rápido control de calidad del mismo. De acuerdo con los análisis por CCD (Figura 18) aunque algunas bandas fueron similares para ambas muestras en general se presentaron variaciones en el perfil cromatográfico entre los dos extractos, observándose que el extracto etanólico de la muestra proveniente de Buenos aires tuvo mayor variedad de compuestos químicos que la proveniente de Totoró, esto puede explicar que el propóleo de Buenos Aires haya presentado mayor inhibición de la bacteria Gram negativa frente al otro propóleo, lo que corrobora lo dicho anteriormente sobre la

importancia que tiene la composición química de los propóleos para su efectiva acción.

Estas diferencias en la composición pueden estar determinadas también por la diversidad de la flora predominante en cada zona biogeográfica donde están situados los apiarios (Tablas 2 y 3). El municipio de Buenos Aires posee un clima calido el cual probablemente favorece el desarrollo en esta zona de una mayor diversidad de especies vegetales de interés apícola.

6. CONCLUSIONES

La acción bactericida de los propóleos de Totoró y Buenos Aires sobre la bacteria Gram positiva *S. aureus* no fue significativamente diferente, pero si mostró que este microorganismo fue más sensible al propóleo que la bacteria Gram negativa.

Los dos propóleos mostraron diferencias en su actividad bactericida frente a la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa*, presentando el propóleo procedente de Buenos Aires una inhibición a menor concentración que la obtenida para el propóleo de Totoró.

Dado su efecto antibacteriano *in vitro* resulta muy significativa la mayor actividad del extracto de propóleo observada contra *Staphylococcus aureus* en este estudio, ya que el uso de dicha sustancia natural podría considerarse como una alternativa viable y económica para controlar las infecciones producidas por esta bacteria y tomando en cuenta las otras propiedades curativas atribuibles al propóleo como son la capacidad antiinflamatoria y cicatrizante se podría inferir un potencial uso de este producto principalmente en la curación de heridas infectadas con *S. aureus*.

Las condiciones geográficas y climáticas de una región como altitud, suelos temperatura, precipitaciones, humedad, etc. influyen notoriamente en la calidad del propóleo obtenido, al inhibir diferencialmente el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Se encontraron en ambos propóleos metabolitos secundarios como los flavonoides, que según la literatura son los principios biológicamente activos en este compuesto, entre otros a los que también se les atribuye un amplio espectro de acción.

Se determinó que la composición química del propóleo de Buenos Aires es más compleja; variación que puede presentarse debido a diversidad particular en la flora existente en la región de donde las abejas toman la materia prima para producir los propóleos.

7. RECOMENDACIONES

Es conveniente continuar la investigación acerca del propóleo combinando tanto ensayos químicos como biológicos, especialmente antimicrobianos con el fin de identificar la composición responsable de su acción y que varía dependiendo de las condiciones ecológicas, así mismo en el control de calidad de las muestras.

La preparación de los extractos como lo hacen en algunas casas comerciales y las personas en general incluidos pequeños apicultores es buena, ya que de esta forma se obtuvieron concentraciones con efecto bactericida, pero se podría mejorar teniendo en cuenta que según la composición de los propóleos algunos van a contener mayor cantidad de compuestos insolubles en etanol que es el solvente normalmente utilizado y que podía interferir en la concentración final del extracto.

Promover estudios mas exhaustivos con el propóleo procedente del municipio de Buenos Aires a fin de determinar si este podría tener una mejor acción que la reportada en este trabajo si es obtenido por el método de mallas, tratado con solventes de diferente polaridad o sometido a algún procedimiento químico que permita extraer las ceras a fin de establecer su verdadero potencial terapéutico.

Se considera conveniente el uso de mallas en la colmena para la recolección de propóleos, ya que no solamente se evita la incorporación de impurezas por raspado, sino también que se obtiene un producto con mayor cantidad de resinas y compuestos fenólicos.

Desarrollar estudios adicionales con propóleos de otras regiones del país obtenidos de igual manera, si fuera posible mejor con mallas para garantizar la mayor pureza de los extractos.

Aun cuando el desarrollo de métodos que permitan establecer la calidad se encuentran en desarrollo, los protocolos actuales no necesariamente consideran la gran diversidad de propóleos existentes y sus propiedades farmacológicas. Es evidente la necesidad de pruebas adicionales y de investigar en profundidad los efectos biológicos del propóleos, especialmente considerando la variabilidad de su composición y teniendo en cuenta todos sus componentes químicos, así también la presencia cualitativa de alcaloides vislumbra un potencial terapéutico y por tanto se podría analizar en un futuro en otros estudios.

Seria interesante evaluar otras propiedades biológicas del propóleo tendientes a determinar otras posibles funciones terapéuticas, para de esta manera buscar alternativas para el control de enfermedades mediante medicamentos fitoterapéuticos y homeopáticos entre otros y así presentar un respaldo científico acerca de la eficacia de acción contra agentes patógenos

El uso de productos naturales ha sido una de las mas asequibles estrategias para el descubrimiento de nuevas medicinas, estos estudios son fundamentales para expandir el rango de productos naturales que pueden ser usados para la búsqueda de nuevas drogas, en este contexto el propóleo es un producto natural relativamente no explorado que bien podría llegar a ser un recurso de valor para la salud.

BIBLIOGRAFIA

ADELMANN, Juliana. Propolis: variabilidade composicional, correlacao com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Curitiba, 2005, 176 p. Trabajo de grado (Maestría en ciencias farmaceuticas). Universidad Federal de Paraná. Facultad de Ciencias de la Salud.

APICULTURA. Página web [online] Paraná (Brasil): Breyer & Cia Ltda, s.f. (citado 2006-03-17). Available from: <http://www.breyer.ind.br/apicultura/imagens/apic-propolis-01p.jpg>

ASIS, M. Cuba, Los productos de la colmena. La Habana, Cuba. Centro de información y documentación Agropecuario, 1989. p. 45-52. Citado por: TOLOSA, L. y CAÑIZARES, E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica Review* [online]. 2002, vol. 43, no 1/2. [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.ugr.es/~ars/abstract/43-187-02.pdf>.

BALDIZAN, A *et al.* Metabolitos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque deciduo tropical de los llanos centrales venezolanos. *Zootecnia tropical Review* [online]. 2006, vol 24, no 3 [citado 2007-07-15]. Available from: <http://www.ceniapen.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/ZootecniaTropical.htm>. ISSN 0798-7269.

BANKOVA, V. S., POPOV, S. S. e MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. En: *Phytochemistry*. Vol. 28, No 3 (1989); p. 871-873.

BANKOVA, V. S; DE CASTRO, S. L and MARCUCCI M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie Review* [online]. 2000, vol. 31 Available from: <http://www.apidologie.org/index.php?option=article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/abs/2000/01/M0105/M0105.html>

BARRAGAN OLAYA, L. E y ORTIZ ZARATE, J. J. Estudio de la actividad biológica del propóleo. Santafé de Bogotá, 1988. 92 p. Trabajo de grado (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

Boletín apícola N° 14 Review [online]. Argentina; Programa Miel, octubre 2000 [citado abril 14, 2008]. Available from: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola/Bol_Api_14.html

BONVEHI, J.S and COLL, F.V. Phenolic composition of propolis from China and from South America. En: *Naturforsch.* Vol. 49, (1994); p.712-718.

BOSIO, K. *et al.* In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes. En: Appl Microbiol. Vol. 31, (2000); p. 174-177.

BROOKS, F. G; BUTEL, S. J y MORSE, A. S. Microbiología Medica: de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18 ed. México : Manual Moderno, 2005. p. 219-224, 257-259. ISBN 970-729-136-2.

BURDOC, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. En: Food Chem Toxicol. Vol. 36, No 4 (1998); p.347-363.

CAÑAS, S. Els Productes del Rusc. Mètode: Revista de difusió de la investigació de la Universitat de València Review [online]. 2002, vol. 33 p.51-55. [citado 2006-10-21]. Available from: http://dialnet.unirioja.es/servlet/oalart_codigo=309143 .ISSN 1133-3987.

CAVALIERI, S, *et al.* Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana Review [online]. Washington; Marie Coyle. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington, 2005 [citado 2008-11-22]. Available from: http://www.paho.org/-Spanish/AD/THS/EV/labs_susep_antimicro.htm. ISBN 1-55581-347-X

CHAILLOU, L.L. HERRERA, H.A y MAIDANA, J.F. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. Ciencia e Tecnología de Alimentos Review [online], 2004, vol 24, no 1. [citado 2008-03-15]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000100003 ISSN 0101-2061.

CHAVARRIAS, M. Antimicrobianos naturales y conservación de alimentos : Aumenta el uso de antimicrobianos naturales en la UE para garantizar la seguridad de los alimentos manteniendo sus características organolépticas. Consumer Eroski Review [online], octubre 2006 [citado 2008-11-05]. Available from: <http://www.consumer.es/>

CORPORACION AUTONOMA REGIONAL DEL CAUCA. Información preliminar de los municipios del Departamento del Cauca. Popayán : Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1999. p. 14-15, 76-77.

DEL RIO MARTINEZ, P.I. Actividad Biocida de un Propolis Chileno frente a Porphyromonas gingivalis : Estudio in Vitro. Santiago de Chile, 2006, 120 p. Trabajo de grado (Cirujano Dentista). Universidad de Chile. Facultad de Odontología. Área de microbiología.

DOMINGEZ, X. A. Métodos de investigación fitoquímica. 3 ed. México : Limusa, 1985. 281 p. ISBN 968-18-0115-6.

DOMINGO, D y LOPEZ BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. Revista española de quimioterapia Review [online], 2003, vol. 16, no 4. [citado 2008-03-15]. Available from: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>.

DRAGO, I *et al.* In Vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. En: Chemotherapy. Vol 12. No 1 (2002) p.390-395.

Estar Informado: Portal de Noticias. Apicultura entre Amigos [online]. Argentina Rodrigo Javier González 1999. [citado 1 Noviembre 2006]. Disponible en versión HTML en: <http://www.estarinformado.com.ar>.

FARRE, R; FRASQUET, I y SANCHEZ, A. El propolis y la salud. Ars Pharmaceutica Review [online]. 2004, vol. 45, no 1. [citado 2008-03-15]. Available from: http://www.cravoecanela.com/propolis_1.pdf.

FERNANDES JUNIOR, A *et al.* Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. Ciencia Rural Review [online]. 2006, vol. 36, no. 1 [citado 2006-11-08]. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php>. ISSN 0103-8478.

------. Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz Review [online]. 2005, vol 100, no 5. [citado 2006-11-08]. Available from: <http://www.scielo.br/scielo>. ISSN 0074-0276.

------. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. Journal of Venomous Animals and Toxins Review [online]. 2001, vol. 7, no 2. [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.scielo.br/scielo>. ISSN 0104-7930.

FERNANDEZ DE CORDOBA, H; BATISTA BAEZ, M y SARDUY DOMINGUEZ, R. Tamizaje de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. II Península de Guanahacabibes. Revista cubana de enfermería Review [online]. 1995, vol 11, no 3. [citado 2008-08-10]. Available from: <http://www.scielo.sld.cu/scielo>.

FIERRO MORALES, W. Evidencia científica del propóleo desde el punto de vista medico. En: CONGRESO INTERNACIONAL DE PROPOLEOS. (1º: 2000: Argentina). Conferencias plenarias y semiplenarias del I congreso internacional de propoleos, 2000. 31p.

FONTANA, J. D *et al.* Profiling propolis flavonoids by means of micellar electrokinetic capillary chromatography, capillary gas chromatography and bactericidal action. *Chromatographia Review* [online]. 2000, vol. 52 no 3/4. [citado 2008-03-02]. Available from: <http://www.springerlink.com/content/ep67n0k4227701w1/fulltext.pdf>.

FRAGOSO, A *et al.* Síntesis y Caracterización físico-química y biológica de complejos de inclusión de naproxeno con polímeros de dextrana-B-Ciclodextrina. *Revista Cubana de Farmacia Review* [online]. 2004, vol 38 no 2 [citado 2007-03-11]. Available from: <http://www.scf.sld.cu/pdf/congreso04/libro-resumenes.pdf>. ISSN 0034-7515.

GALIANO, A. (ed). Propoleo. Monografía Review [online]. Instituto de Investigación y Desarrollo Químico Biológico (IQB). s.i, 5 noviembre 2007. [citado 2007-11-15]. Available from: <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha082.htm>.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. En: *Bee World*. Vol. 60 (1979); p.59-84.

DRAGO, I *et al.* In Vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. En: *Chemotherapy*. Vol. 12. No 1 (2002) p.390-395.

GONSALES, G. Z *et al.* Antibacterial Activity of Propolis Collected in Different Regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Review* [online]. 2006, vol 12, no 2 [citado 2008-08-21]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v12n2/v12n2a09.pdf>. ISSN 1678-9199.

GOTTENBOS, B; VANDERMEI, H. C. and BUSSCHER, H. Institute of Biomedical Materials Science and Applications. The development of antimicrobial biomaterial surfaces. Amsterdam : Ponsen & Looijen, 2001. p. 39-55. ISBN 90-367-1447-8

HAMMOND, S.M. and Lambert, P.A. *Antibiotics and Antimicrobial Action*, London : Edward Arnold, 1981. 63 p.

HEGAZI, A.G. and HADI, F.E. Egyptian propolis : Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lans. *Zeitschrift fuf* En: *Naturforsch.* Vol. 57, No 3 (2002); p. 395-402.

HILL R. *Propolis, The Natural Antibiotic*, England : Thorsons Publishers, 1977. 64 p.

HOLT, J *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Mariland, USA : Williams and Wilkins, 1994. p.93, 532. ISBN 0-683-00603-7.

Instituto Geografico Agustin Codazzi. Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia : Memoria explicativa sobre el Mapa Ecológico. Bogota : IGAC 1977. Vol.13, No. 11. 238 p

KOO, H *et al.* Avaliação do potencial anti-cárie e anti-placa da própolis de *Apis mellifera* da região sudeste e sul do Brasil : Atividade antimicrobiana in vitro sobre patógenos bucais. En: Revista da Universidade de Franca. Vol 7, no 7 (1999); p 48-49.

----- Effects of Compounds Found in Propolis on Streptococcus mutans Growth and on Glucosyltransferase Activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Review [online]. 2002, vol. 46, no. 5 [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=11959560>.

KRELL, R. Value-added products from beekeeping Review [online]. Roma (Italia), FAO Agricultural Services Bulletin, 1996, no. 124. [citado 2007-10-11]. Available from: http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/libros/value_added_products.pdf. ISSN 92-5-103819-8

KONEMAN, W. E *et al.* Texto y atlas a color de diagnostico microbiológico. 5 ed. Buenos Aires, Argentina : Panamericana, 1999. p. 263-266,529-535. ISBN 84-7903-437-8.

KROL, W *et al.* Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. En: Arzneimittel-Forsch. Vol. 43, No 5 (1993) p. 607-609.

KUJUMGIEV, A *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. En: Journal of Ethnopharmacology. Vol.84 (1999) p. 235-240.

LEVI, N. C. Actividade antimicrobiana da propolis. En: Revista da Universidade de Franca, Vol. 7, No 7 (1999). p 18.

LOZINA, L *et al.* Acción del propóleos sobre una levadura (*Malassezia pachydermatis*) aislada a partir de otitis externa canina. Revista Veterinaria Review [online]. 2005, vol.16, no.1 [citado 2007-10-12]. Available from: http://vet.unne.edu.ar/revista/16-1/08_Lzn.pdf.

MABRY, T.J, MARKHAM, K.R and THOMAS, M.B. The sistematic identification of flavonoids. New York : Springer Verlag, 1970. 354 p.

MANRIQUE, A. J. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical Review* [online]. 2006, vol.24, no.1 [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.scielo.org.ve/scielo>.

MARCANO, D. y HOSEGAWA, M. Universidad Central de Venezuela. *Fitoquímica Orgánica Review* [online]. Caracas : UCV, 1991. [citado 2007-10-19]. Available from: <http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/bolilla7.pdf>.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie Review* [online]. 1995, vol. 26, no. 2 [citado 2008-08-22]. Available from: http://www.apidologie.org/index.php?option=article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/pdf/1995/02/Apidologie_0044-8435_1995_26_2_ART0002.pdf

----- Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova Review* [online]. 1996, vol.19, no. 5 [citado 2008-07-23]. Available from: http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1996/vol19n5/v19_n5_12.pdf.

MARCUCCI, M. C; WOISKY, R. G. e SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. *Mensagem doce Review* [online]. 1998, vol. 46 [citado 2008-07-23]. Available from: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm>.

MARKHAM, R *et al.* HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. *En: Phytochemistry*. Vol..42, No.1 (1996) p. 205-211.

MARTINEZ ANZOLA, T. Espectro antimicrobiano del propóleo proveniente de apiarios de la zona norte del Valle del Cauca y Sur del Quindío. Santafé de Bogota, 2003, 76 p. Trabajo de Grado (Zootecnista). Universidad Nacional de Bogotá. Facultad de medicina veterinaria y de zootecnia.

MARTINEZ FLORES, S *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria Review* [online]. 2002, vol. 17, no 6 [citado 2008-03-21]. Available from: http://www.grupoaulamedica.com/web/nutricion/pdf/062002/03_Los_flavonoides.pdf. ISSN 0212-1611

MIRZOEVA OK, GRISHANIN RN, y CALDER PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrana potencial and motility of bacteria. *En: Microbiol. Research*. Vol 152, No 3 (1997): p.239-46.

MODAK, B. et al. Actividad Antibacteriana de Flavonoides Aislados del Exudado Resinoso de *Heliotropium sinuatum* : Efecto del Tipo de Estructura. Boletín de la Sociedad Chilena de Química Review [online]. 2002, vol. 47, no1. ISSN 0366-1644.

MORSE, G. D. Acerca del propóleos su utilización en la colmena : Propóleos investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización con fines terapéuticos. Bucarest, Rumania : Apimondia, 1975. p. 59-63.

MUÑOZ, O *et al.* Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Química Nova Review [online].2007, vol. 30, no 4. [citado 2007-11-11]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n4/a17v30n4.pdf>

MURPHY, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. En: Clinical Microbiology Reviews. Vol 12, No 4 (1999). p. 564-582.

NOTHENBERG, M. Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas. En: Química e Derivados. Vol. 348 (1997). p. 24-28.

ORSI, R *et al.* Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases Review [online]. 2005, vol. 11, no. 2 [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.scielo.br/scielo>. ISSN 1678-9199.

------. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella* Typhi. Brazilian Journal of Microbiology Review [online]. 2006, vol 37, no. 2 [citado 2006-11-26]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000200002. ISSN 1517-8382.

OSCANOA LAGUNAS, J. M. Estudio Fármaco-Botánico de *Desmodium molliculum* Review [online] (monografía electrónica). 2005, Huancayo (Perú), disponible en: www.botanical-online.com/col/manapuya.htm.

PARK, Y. K *et al.* Estudo da preparacao dos extratos de propolis e su as aplicacoes. Ciencia e Tecnología de Alimentos Review [online]. 1998, vol. 18, no. 3 [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.scielo.br/scielo>. ISSN 0101-2061.

------. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. Ciencia Rural Review [online]. 2002, vol. 32, no. 6 [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.scielo.br/scielo>. ISSN 0103-

8478.

----- Estudo de algunos componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. En: Arquivos de biología e tecnologia, Vol. 38, No 4. (1995). p. 1253-1259,

PEREIRA, A *et al.* Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Química Nova Review [online]. 2002, vol. 25, no 2 [citado 2007-11-03]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000200021. ISSN 0100-4042.

PEREIRA, M.L. Actividade antibacteriana. En: Revista da Universidade de Franca. Vol 7 (1999); p. 20.

POLAINO, Carlos. Manual practico del apicultor. Madrid : Cultural, 2000. p.109-163. ISBN 84-8055-915-2.

PRINCIPAL, *et al.* Actividad antibacteriana in Vitro del extracto etanólico de propóleo sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus*. Gaceta de Ciencias Veterinarias Review [online]. 2003, vol. 10. [citado 2007-10-02]. Available from: <http://pegasus.ucla.edu/ve/CCC/REVISTA/Vol111/Principal%20articuloGCVcorregido%5B2%5D.htm>.

PRONARA .Review [online]. Morelos (México); Productos Naturales y Apícolas, Rebollo y Asociados, s.f [citado 2008-10-02]. Available from: <http://www.pronara.com.mx/contacto.html>

QUINTANA, J. *et al.* Empleo de la tintura de propoleo al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. Revista Cubana de Estomatología Review [online]. 1997 vol. 34 no 1. [citado 2006-09-01]. Available from: http://bvs.sld.cu/revistas/est/vol34_1_97/est05197.htm.

QUINTANA HORNA, G *et al.* Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Revista Medica Herediana Review [online]. 2005, vol. 16, no 1. [citado 2008-04-08]. Available from: <http://www.upch.edu.pe/famed/rmh/16-1/v16n1ao6.htm>.

RAMIREZ AGREDO, J.C. Estudio preliminar de flavonoides de hemiparasitas andinas aislados mediante cromatografía 2D. Popayán, 1998, 69 p. Trabajo de grado (Licenciado en Educación, Especialidad Biología). Universidad del Cauca.

Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

SALAMANCA GROSSO, G. *et al.* Origen, naturaleza y características de los propóleos Colombianos. *Apicervices Review* [online], Colombia (Tolima): Universidad del Tolima 2001 [citado 2006-10-02], Available from: <http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origenpropoleos1.htm>.

----- El sistema de control y puntos críticos en la extracción y beneficio de propóleos. *Apiservices Review* [online] CONGRESO INTERNACIONAL DE PROPOLEOS. (1º: 2000 : Buenos Aires). Ponencias del IV Congreso Internacional De Propóleos . Buenos Aires, 2000. Available from: <http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origenpropoleos1.htm>.

----- Flora apicola indicadora departamento de Tolima. *Apiservices Review* [online], Colombia (Tolima): Universidad del Tolima 2004 [citado 2006-10-02]. Available from: http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/flora_apicola.htm.

----- Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical Review* [online] 2007, vol. 25, no 2 [citado 2008-04-08]. Available from: <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/ZootecniaTropical/zt2502/pdf/salamanca.pdf>.

SAWAYA, A. *et al.* Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology Review* [online]. 2004, vol. 35, no 1 / 2. [citado 2006-09-01]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822004000100017&script=sci_arttext&tlng=en. ISSN 1517-8382.

----- Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. En: *Applied Microbiology*. Vol. 35 (2002) p. 203-207.

SCAZZOCCHIO, F *et al.* Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. En: *Microbiological Research*. Vol. 161, No 4. (2006): p. 327-333.

SERRA, B. J; VENTURA, CF and ESCOLA, JR. The composition, activated components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. En: *JAOCS*. Vol 71, No 5 (1994).

SFORCIN, J.M. *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. En: *Ethnopharm*. Vol. 73, (2000). p. 243-249.

SOLANO GOMEZ, S. C y CORONADO VARGAS, Á. M. Actividad antibacteriana de tres muestras de propóleo nacional. Santafé de Bogotá, 2000. 60 p. Trabajo de grado (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia.

STANGACIU, S. Cuidados para la obtención y extracción del propóleos. En: Espacio apicola, No 33 (1998).

------. El propolis Espagnol [boletín informativo en línea]. Available from: http://propolis-sana.com/espagnol/es_propolis.html s.f [citado 29 noviembre 2006]

STEPANOVIC S *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. En: Microbiology Research. Vol. 158. (2003).p. 353-357.

TAKAISI-KIKUNI NB and SHILCHER H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. En: Planta Médica. Vol. 60 No.3 (1994); p. 222-227.

TOLOSA, L. y CAÑIZARES, E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica Review* [online]. 2002, vol. 43, no 1/2. [citado 2006-11-29]. Available from: <http://www.ugr.es/~ars/abstract/43-187-02.pdf>.

VALDES G, ROJAS, N y MORALES C. Estudio de la acción antimicrobiana del propóleos con antibióticos y desinfectantes convencionales. En: Ciencia técnica agricultura. Vol. 1 (1985).p. 23-36.

VARGAS, A. C. de et al. Alcoholic propolis extract : antimicrobial activity. *Ciencia. Rural Review* [online]. 2004, vol. 34, no. 1. [citado 2006-11-29], Available from: <http://www.scielo.br/scielo>. ISSN 0103-8478.

WOLLENWEBER, E., BUCHMANN, S. L. Feral honeybees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus sp.*). En: Z Naturforsch, Vol. 52, No 7/8, (1997).p.530-535.

ANEXOS

Anexo A: Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para el efecto de los extractos sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*

	EXTRACTO-EFECTO	N	Rango promedio
CONCENTRACION (mg/ml)	TOTORO-NO CRECE	42	103,12
	TOTORO-SI CRECE	38	26,55
	BUENOS AIRES-NO CRECE	30	105,50
	BUENOS AIRES-SI CRECE	30	45,50
	Total	140	

Estadísticos de contraste(a,b)

	CONCENTRACION (mg/ml)
Chi-cuadrado	106,056
Gl	3
Sig. asintót.	,000

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: EXTRACTO-EFECTO

Anexo B: Prueba de comparaciones múltiples para el efecto de los extractos sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*

Variable dependiente: CONCENTRACION (mg/ml)

T3 de Dunnett

(I) EXTRACTO-EFECTO	(J) EXTRACTO-EFECTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
TOTORO-NO CRECE	TOTORO-SI CRECE	51,9452*	6,51802	,000	33,9831	69,9074
	BUENOS AIRES-NO CRECE	15,5986	7,60771	,234	-5,0197	36,2168
	BUENOS AIRES-SI CRECE	50,3686*	6,52404	,000	32,3929	68,3442
TOTORO-SI CRECE	TOTORO-NO CRECE	-51,9452*	6,51802	,000	-69,9074	-33,9831
	BUENOS AIRES-NO CRECE	-36,3467*	3,96494	,000	-47,4772	-25,2161
	BUENOS AIRES-SI CRECE	-1,5767	,63767	,092	-3,3086	,1553
BUENOS AIRES-NO CRECE	TOTORO-NO CRECE	-15,5986	7,60771	,234	-36,2168	5,0197
	TOTORO-SI CRECE	36,3467*	3,96494	,000	25,2161	47,4772
	BUENOS AIRES-SI CRECE	34,7700*	3,97482	,000	23,6189	45,9211
BUENOS AIRES-SI CRECE	TOTORO-NO CRECE	-50,3686*	6,52404	,000	-68,3442	-32,3929
	TOTORO-SI CRECE	1,5767	,63767	,092	-,1553	3,3086
	BUENOS AIRES-NO CRECE	-34,7700*	3,97482	,000	-45,9211	-23,6189

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Anexo C: Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para el efecto de los extractos sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

	EXTRACTO-EFECTO	N	Rango promedio
CONCENTRACION (mg/ml)	TOTORO-NO CRECE	33	105,00
	TOTORO-SI CRECE	33	39,00
	BUENOS AIRES-NO CRECE	33	94,00
	BUENOS AIRES-SI CRECE	33	28,00
	Total	132	

Estadísticos de contraste(a,b)

	CONCENTRACION (mg/ml)
Chi-cuadrado	101,685
Gl	3
Sig. asintót.	,000

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: EXTRACTO-EFECTO

Anexo D: Prueba de comparaciones múltiples para el efecto de los extractos sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

Variable dependiente: CONCENTRACION (mg/ml)

T3 de Dunnett

(I) EXTRACTO-EFECTO	(J) EXTRACTO-EFECTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
TOTORO-NO CRECE	TOTORO-SI CRECE	62,8500*	6,83978	,000	43,7777	81,9223
	BUENOS AIRES-NO CRECE	32,0900*	7,75638	,001	10,8861	53,2939
	BUENOS AIRES-SI CRECE	66,8600*	6,80316	,000	47,8659	85,8541
TOTORO-SI CRECE	TOTORO-NO CRECE	-62,8500*	6,83978	,000	-81,9223	-43,7777
	BUENOS AIRES-NO CRECE	-30,7600*	3,84938	,000	-41,4535	-20,0665
	BUENOS AIRES-SI CRECE	4,0100*	,96916	,001	1,3605	6,6595
BUENOS AIRES-NO CRECE	TOTORO-NO CRECE	-32,0900*	7,75638	,001	-53,2939	-10,8861
	TOTORO-SI CRECE	30,7600*	3,84938	,000	20,0665	41,4535
	BUENOS AIRES-SI CRECE	34,7700*	3,78392	,000	24,2187	45,3213
BUENOS AIRES-SI CRECE	TOTORO-NO CRECE	-66,8600*	6,80316	,000	-85,8541	-47,8659
	TOTORO-SI CRECE	-4,0100*	,96916	,001	-6,6595	-1,3605
	BUENOS AIRES-NO CRECE	-34,7700*	3,78392	,000	-45,3213	-24,2187

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

