

ESTUDIO ANALÍTICO DE LAS PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE ALGUNOS PROPÓLEOS
DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ALEX FERNANDO CUARÁN ZAMORA
ZANDRA MILENA ERIRA QUITIAQUEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

ESTUDIO ANALÍTICO DE LAS PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE ALGUNOS PROPÓLEOS
DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ALEX FERNANDO CUARÁN ZAMORA
ZANDRA MILENA ERIRA QUITIAQUEZ

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Químico

Director
JESÚS CABRERA MONCAYO, M.Sc., Ph D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

Las ideas, aportes y conclusiones que hacen parte en el presente trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores,

Artículo. 1 del acuerdo número 324 de octubre 11 de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Abril de 2010.

DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios por ser mi guía, fortaleza y por brindarme la oportunidad de gozar de salud y sabiduría para tomar el camino y las decisiones correctas haciendo realidad el sueño de mejorar mi nivel educativo y disfrutar la satisfacción personal de lograrlo.

A mis padres María Esperanza y Erasmo Gilberto, quienes me han brindado su apoyo y consejo oportuno para sobrepasar todos los obstáculos presentes en este largo proceso.

A mis apreciadas hermanas Nancy y Andrea por su voz de aliento, su comprensión y colaboración incondicional en la culminación exitosa de este trabajo de grado.

A mi novio Henry por brindarme su amor lleno de fuerza, comprensión, dedicación y perseverancia en todos los proyectos de mi vida, y a todos mis amigos por su incondicional compañía.

ZANDRA MILENA

DEDICATORIA

A las mujeres más bellas que Dios me ha regalado, al más grande de mis tesoros, mi madre Marnely Zamora; mi amorosa y comprensible hermana Arelis, y al motor de mi vida, mi sobrina Manuela. A ellas, mi gratitud permanente por su apoyo, palabras de aliento en mis momentos de tristezas, a sus abrazos, dedicación y sus consejos en los momentos oportunos.

Así también a María del Rosario Carreño, una gran amiga, maestra y consejera, quien fue constante en mi formación profesional, eterna gratitud por todo lo compartido.

A mis amigos, compañeros y profesores gestores de esta su obra, y sobre todo a ese primer lugar, mi Señor Jesucristo.

Señor

Ayúdame a decir la verdad delante de los fuertes.
Y a no decir mentiras para ganarme el aplauso de los débiles.
Si me das fortuna no me quites la razón.
Si me das éxito no me quites la humildad.
Si me das humildad no me quites la dignidad.
Enséñame a querer a la gente como a mí mismo,
No me dejes caer en el orgullo si triunfo,
ni en la desesperación, si fracaso.
Más bien recuérdame que el fracaso,
es la experiencia que precede al triunfo.
Enséñame que perdonar es un signo de grandeza.
Y que la venganza es una señal de bajeza.
Si me quitas el éxito dame fuerzas para aprender del fracaso.
Señor...si yo me olvido de ti, nunca te olvides de mí.

Mahatma Gandhi

ALEX FERNANDO

AGRADECIMIENTOS

A nuestro director Ph. D. Jesús Cabrera Moncayo por su amistad, asesoría y apoyo brindado en la formulación, ejecución y presentación de este trabajo de investigación.

A la vicerrectoría de Posgrados e Investigaciones, VIPRI, por la financiación de ésta investigación.

Al MSc. Jesús Adriano Romo, Director del Departamento de Química periodo 2004-2008, por habernos hecho parte del grupo de investigación de Bioquímica y Estudios Genéticos de la Universidad de Nariño, además de su amistad y apoyo incondicional.

Al grupo de investigación en Estudios Melitopalínológicos y Propiedades Fisicoquímicas de Alimentos de la Universidad del Tolima por la asesoría brindada.

A los profesores del Departamento de Química por habernos compartido su valioso conocimiento y experiencia para nuestra formación académica.

A la profesora Mónica Liliana Guerrero por su asesoría, colaboración y amistad.

A las señoras Piedad Rebolledo, Jefe Sección Laboratorios, María del Rosario Carreño, Analista Laboratorios de Suelos, Sandra Espinosa, Analista Laboratorio de Bromatología, Mónica Hernández, Analista Laboratorio de aguas, por su colaboración durante la ejecución de este proyecto.

A los señores Susana Elizabeth Calpa, Alba Lucy Enríquez y Julián Rodríguez, personal de laboratorios docencia de Química, por su valiosa amistad, apoyo y colaboración.

A nuestros familiares, quienes con sus manos laboriosas, emprendieron nuestro camino en la formación académica, por su apoyo, sacrificio, entrega y amor.

A nuestras amigas Melva Johana Tatalchá y Jazmín Figueroa por haber sido parte fundamental en nuestro proceso formativo y por los inolvidables momentos compartidos.

A nuestros compañeros Juan Pablo Jiménez, Juan Pablo Torres, Gina Suarez, Paola Mier, Leonardo Alvarado, Mauricio Muñoz, Ana María Hernández, Ricardo Rosales, Licenia Hernández, Ana Judith Chaves, Jhon Villareal.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. OBJETIVOS	23
1.1 OBJETIVO GENERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MARCO REFERENCIAL	24
2.1 GENERALIDADES	24
2.2 COMPOSICIÓN	24
2.2.1 Contenido de Compuesto Fenólicos	25
2.2.2 Flavonoides	26
2.3 COMPOSICIÓN DE LOS PROPÓLEOS DE ZONA TROPICAL	34
2.4 PRINCIPIOS ACTIVOS Y EFECTOS FARMACOLÓGICOS	40
2.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	42
2.5.1 Mecanismo de acción de la Estreptomicina	43
2.6 SITUACIÓN DE LA APICULTURA EN NARIÑO	44
3. DISEÑO METODOLÓGICO	46
3.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	46
3.1.1 Áreas de estudio	46
3.1.2 Obtención de muestras	47
3.1.3 Análisis fisicoquímico preliminar	48
3.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES	48

3.2.1 Método colorimétrico de cloruro de aluminio	48
3.2.2 Método colorimétrico de la 2,4-dinitrofenilhidrazina	48
3.3 ANÁLISIS DE MINERALES	49
3.4 ANÁLISIS POR HPLC/MS	49
3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	49
3.5.1 Método de Kirby-Bauer	50
3.5.2 Método de difusión por pozos	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO PRELIMINAR	51
4.1.1 Características organolépticas	51
4.1.2 Análisis fisicoquímico	54
4.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES	60
4.2.1 Método colorimétrico del cloruro de aluminio	60
4.2.2 Método colorimétrico de la 2,4-dinitrofenilhidrazina	61
4.3 ANÁLISIS MINERAL POR ABSORCIÓN ATÓMICA	63
4.4 ANÁLISIS DE LOS EEP POR HPLC/MS	65
4.4.1 Análisis de estándares	65
4.4.2 Análisis de las muestras de los EEP	72
4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	86
CONCLUSIONES	98
RECOMENDACIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXOS	112

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Flavonas asociadas a la actividad apícola.	32
Tabla 2. Flavonoles asociados a la actividad apícola.	33
Tabla 3. Flavanoles asociadas a la actividad apícola.	33
Tabla 4. Flavanonas asociadas a la actividad apícola.	34
Tabla 5. Clasificación química de los antibióticos y modo de acción	43
Tabla 6. Indicadores Climatológicos de las zonas de muestreo.	47
Tabla 7. Características organolépticas de los propóleos recolectados	51
Tabla 8. Floración característica de acuerdo a la zona de vida	53
Tabla 9. Puntos de fusión, porcentaje de sólidos, pH y acidez de EEP	54
Tabla 10. Parámetros de calidad de los propóleos	54
Tabla 11. Contenido compuestos fenólicos e índice de oxidación de EEP	59
Tabla 12. Contenido de flavonoides en EEP determinados por los dos métodos colorimétricos	61
Tabla 13. Contenido mineral de los propóleos de las áreas de estudio	63
Tabla 14. Valores m/z de fragmentos obtenidos a partir de las rupturas de las moléculas de los estándares.	66
Tabla 15. Resultados de los compuestos encontrados en los EEP por MS	74
Tabla 16. Actividad antibacteriana de los EEP contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 9.341 por el método de Kirby- Bauer	89
Tabla 17. Actividad antibacteriana de los EEP contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 por el método de Kirby- Bauer	91

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura básica del sistema anular para flavonoides	27
Figura 2. Estructura de algunos flavonoides y compuestos relacionados	27
Figura 3. Interconversión química del ácido Shiquímico en varios derivados aromáticos, incluyendo a los aminoácidos fenilalanina y tirosina	29
Figura 4. Conversión de la fenilalanina y tirosina en cinamaldehído y p-hidroxicinamaldehído respectivamente.	30
Figura 5. Biosíntesis de los núcleos chalcona, flavanona, flavanol y antocianidina.	30
Figura 6. Estructura general de las flavonas	32
Figura 7. Estructura general de los flavonoles	32
Figura 8. Estructura general de los flavanoles	33
Figura 9. Estructura general de las flavanonas	34
Figura 10. Benzofuranos aislados de propóleos de Brasil	35
Figura 11. Benzofuranos aislados de propóleos de Brasil	36
Figura 12. Compuestos fenólicos aislados de propóleos de Brasil	36
Figura 13. Benzofenonas preniladas aisladas de propóleos de Venezuela	37
Figura 14. Compuestos aislados de propóleos de Cuba	38
Figura 15. Lignanos aislados de propóleos de Chile	39
Figura 16. Diterpenos de tipo labdano aislados de propóleos colombianos	39
Figura 17. Áreas de estudio	46
Figura 18. Método artesanal de raspado	47
Figura 19. Relación entre pH y acidez de los EEP	58
Figura 20. Formación y estabilización por resonancia de complejos de flavonas con iones aluminio	60
Figura 21. Formación y estabilización por resonancia de complejos de flavonoles 3-hidroxilados con iones aluminio	60
Figura 22. Secuencia de reacciones entre la 2,4-D y las flavanonas presentes en los propóleos.	61
Figura 23. Perfil para el contenido mineral en las zonas de muestreo	65
Figura 24. Perfil de HPLC/DAT de los estándares	66
Figura 25. Numeración rutas de fragmentación del sistema anular flavonoide	76
Figura 26. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar Naringenina	68
Figura 27. Espectro MS para el estándar Naringenina	68
Figura 28. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar Quercetina	69
Figura 29. Espectro MS para el estándar Quercetina	69

Figura 30. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar Crisina	70
Figura 31. Espectro MS para el estándar Crisina	70
Figura 32. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar Galangina	71
Figura 33. Espectro MS para el estándar Galangina	71
Figura 34. Perfil de HPLC/MS de las muestras sobrepuestas	73
Figura 35. Perfil de HPLC/MS de las muestras sobrepuestas (Ampliación de los primeros 10 minutos)	73
Figura 36. Espectro de masas compuesto 1	74
Figura 37. Espectro de masas compuesto 3	75
Figura 38. Posible ruta de fragmentación del compuesto 3	77
Figura 39. Espectro de masas compuesto 4	77
Figura 40. Posible ruta de fragmentación del compuesto 4	78
Figura 41. Espectro de masas compuesto 5	79
Figura 42. Posible ruta de fragmentación del compuesto 5	80
Figura 43. Espectro de masas compuesto 6	80
Figura 44. Posible ruta de fragmentación del compuesto 6	81
Figura 45. Espectro de masas compuesto 7	82
Figura 46. Posible ruta de fragmentación del compuesto 7	83
Figura 47. Espectro de masas compuesto 8	83
Figura 48. Posible ruta de fragmentación del compuesto 8	84
Figura 49. Espectro de masas compuesto 9	85
Figura 50. Posible ruta de fragmentación del compuesto 9	86
Figura 51. a) Blanco (Etanol). Método Kirby-Bauer, b) Control Sulfato de Estreptomina. Método de difusión en pozos.	88
Figura 52. Halos de Inhibición en <i>E.coli</i> . EEP Granja Botana. Método Kirby-Bauer	90
Figura 53. Halos de Inhibición en <i>S. Aureus</i> . EEP Granja Botana. Método Kirby-Bauer.	91
Figura 54. Halos de Inhibición en <i>E.coli</i> . EEP Municipio Buesaco. Método Kirby-Bauer.	92
Figura 55. Halos de Inhibición en <i>S. Aureus</i> . EEP Municipio Buesaco. Método Kirby-Bauer.	93
Figura 56. Halos de Inhibición en <i>E.coli</i> . EEP Municipio La Unión. Método Kirby-Bauer.	93
Figura 57. Halos de Inhibición en <i>S. Aureus</i> . EEP Municipio La Unión. Método Kirby-Bauer.	94
Figura 58. Halos de Inhibición en <i>E. coli</i> . Método de difusión en pozos.	95
Figura 59. Halos de Inhibición en <i>S. Aureus</i> . Método de difusión en pozos.	95

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Muestras de resinas propólicas granuladas.	112
Anexo B. Muestras de resinas propólicas pulverizadas.	112
Anexo C. Protocolo del análisis fisicoquímico preliminar.	113
Anexo D. Condiciones del análisis por absorción atómica.	114
Anexo E. Contenido mineral de los propóleos municipio de Buesaco.	114
Anexo F. Contenido mineral de los propóleos Granja Experimental Botana.	115
Anexo G. Contenido mineral de los propóleos municipio La Unión.	115
Anexo H. Análisis comparativo del contenido mineral de los propóleos del municipio de Buesaco.	115
Anexo I. Análisis comparativo del contenido mineral de los propóleos de la Granja Experimental Botana UdeNar.	116
Anexo J. Análisis comparativo del contenido mineral de los propóleos del municipio de La Unión.	116
Anexo K. Espectro UV para el estándar Naringenina	117
Anexo L. Espectro UV para el estándar Quercetina	117
Anexo M. Espectro UV para el estándar Crisina	118
Anexo N. Espectro UV para el estándar Galangina	118
Anexo Ñ. Perfil de HPLC con detección UV (panel superior) y MS (panel inferior) de muestras de EEP Granja Botana UdeNar.	119
Anexo O. Perfil de HPLC con detección UV (panel superior) y MS (panel inferior) de muestras de EEP Municipio de Buesaco.	119
Anexo P. Perfil de HPLC con detección UV (panel superior) y MS (panel inferior) de muestras de EEP del municipio de La Unión.	120
Anexo Q. Actividad antibacterial de los EEP contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 9.341 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 por el método de Kirby-Bauer	120
Anexo R. Actividad antibacterial de los EEP contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 9.341 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 por el método de Difusión en Pozos.	121
Anexo S. Diagrama de dispersión evaluación antibacteriana. (Izq). Método de Kirby- Bauer. (Der) Difusión en Pozos. <i>E. coli</i>	121
Anexo T. Gráfico de cajas Box-Plot. Método Kirby-Bauer para <i>E. coli</i>	122
Anexo U. Gráfico de cajas Box-Plot. Método de Difusión en Pozos para <i>E. coli</i>	122
Anexo V. Gráfico de cajas Box-Plot. Método de Kirby- Bauer para <i>S. aureus</i>	123
Anexo W. Gráfico de cajas Box-Plot. Método de Difusión en Pozos para <i>S. aureus</i>	123

Anexo X. Curva de calibración compuestos fenólicos	124
Anexo Y. Curva de calibración Método Colorimétrico Cloruro de Aluminio.	124
Anexo Z. Curva de calibración Método Colorimétrico de la 2,4-Dinitrofenilhidrazina.	124
Anexo A1. Curva de calibración Cuantificación de Sodio en EEP.	125
Anexo B1. Curva de calibración Cuantificación de Potasio en EEP.	125
Anexo C1. Curva de calibración Cuantificación de Calcio en EEP.	125
Anexo D1. Curva de calibración Cuantificación de Magnesio en EEP.	126
Anexo E1. Curva de calibración Cuantificación de Hierro en EEP.	126
Anexo F1. Curva de calibración Cuantificación de Manganeso en EEP.	126
Anexo G1. Curva de calibración Cuantificación de Zinc en EEP.	127
Anexo H1. Curva de calibración Cuantificación de Cobre en EEP.	127
Anexo I1. Curva de calibración Cuantificación de Níquel en EEP.	127

GLOSARIO

°C	grados centígrados
%	porcentaje
λ	longitud de onda
±	más o menos
>	mayor que
μ L	microlitro
μ m	micrómetro
μ g/mL	microgramo por mililitro
2,4-D	2,4-dinitrofenilhidrazina
AA	Espectrofometría de Absorción Atómica
A/A	Acetileno: Aire
A/ON	Acetileno: Oxido Nitroso
AND	Ácido desoxirribonucleico
API-ESI	interfase de ionización a presión atmosférica tipo electro-spray
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
Bco	Buesaco
B S	base seca
bh-PM	bosque húmedo pre-montano
bh-MB	bosque húmedo montano bajo
bmh-PM	bosque muy húmedo pre-montano
C	control
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
cm	centímetro
c/u	cada uno
CV	coeficiente de variación
Da	dálton
DAD	detector arreglo de diodos
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
EM	Espectrometría de Masas
eV	electronvoltio
g	gramo
G+	Gram positivas
G-	Gram negativas
G. unar	Granja Universidad de Nariño
g/mol	gramos-mol
HPLC /MS	Cromatografía Líquida de Alta Resolución/ Espectrometría de Masas

I	corriente eléctrica
IGAC	Instituto Geográfico Agustín Codazzi
id	diámetro interno
IMC	Concentración Mínima Inhibitoria
Kg	Kilogramo
LD	límite de detección
L/ h	litro por hora
Lb	libra
M	Molaridad
MM	masas mecánicas
MO	materia orgánica
MS	espectrometría de masas
Máx.	Máximo
Min.	Mínimo
min.	minutos
mA	miliamperio
mg	miligramo
mg/dL	miligramos por decilitro
mg/mL	miligramos por mililitro
mL	mililitro
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro
mg/Kg/peso	miligramo por kilogramo de peso
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
m/z	relación masa carga
N	Normalidad
ND	no detectable
nm	nanómetro
PAL	Liasa amoniacal de la Fenilalanina
pH	potencial de Hidrógeno
P/P	peso a peso
P/V	peso a volumen
P. F.	punto de fusión
PM	peso molecular
ppm	partes por millón
R	grupo sustituyente
RDA	Retro-Diels Alder
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	revoluciones por minuto
S	unidad ribosómica
SD	desviación estándar
Sf	Sólidos fijos
Sv	Sólidos volátiles
T	temperatura
TAL	Liasa amoniacal de la Tirosina

TR	tiempo de retención
UFC/mL	unidad formadora de colonia por mililitro
UV-Vis	Espectrofotometría Ultravioleta Visible
V	voltaje
V/V	Volumen / Volumen

RESUMEN

El propóleo es una resina de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran a partir de exudaciones de diferentes vegetales para ser empleado en la construcción, reparación y protección de la colmena.

En esta investigación se determinó las características físico-químicas y microbiológicas de los propóleos colectados en tres regiones climatológicamente diferentes del Departamento de Nariño, San Juan de Pasto (Granja Experimental Botana), Buesaco y La Unión. Las muestras, se presentaron en agregados irregulares con brillo, estructura homogénea y plástica pegajosa, color marrón verdoso, olor resinoso aromático y sabor astringente. Los porcentajes de impurezas mecánicas, cera, resinas y sólidos solubles les confieren un grado de calidad, propio para aplicaciones agroindustriales.

A partir del contenido de compuestos fenólicos, se analizó las moléculas tipo flavonoide e índice de oxidación, condicionando la concentración de flavonas, flavanonas y flavonoles responsables de la actividad antibacteriana. El contenido de flavonoides totales varió entre 20%, 30% y 73,69%; cuantificados con los métodos colorimétricos del cloruro de aluminio y 2,4-Dinitrofenilhidracina. El índice de oxidación registró un orden de 2,02 a 3,62 segundos según la prueba del permanganato de potasio, demostrándose así la actividad antioxidante y la calidad de los EEP. Dentro del análisis mineral, los promedios presentan una menor variabilidad para sodio y potasio, siendo calcio y potasio los más representativos, el contenido de zinc fue el de menor concentración en comparación con el reportado para muestras de otras zonas del país, y concluyen el manganeso y níquel.

En el análisis por HPLC/MS se identificó la estructura, secuencia carbohidrato, parte aglicona y enlaces glucosídicos de ocho compuestos de naturaleza fenólica, un flavonol (Ramnetina) y seis flavonas (Luteolin-8C-glucósido, 6,8-dimetoxigenkwanina, 6,8-dimetoxiluteolina, Crisina, Genkwuanina y Pinocembrin-8C-glucósido).

La actividad biológica fue evaluada cualitativamente, aplicando los antibiogramas de Kirby-Bauer y difusión en pozos, midiendo los halos de inhibición del crecimiento de los agentes bacterianos *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli*. La bacteria Gram negativa *E. coli* fue menos sensible en la mayoría de los tratamientos, sin embargo, la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram positivas como el *S. aureus* no depende de forma exclusiva de un tipo de flavonoide, sino del efecto sinérgico de todos los compuestos fenólicos con actividad antibiótica.

Palabras claves: propóleos, perfiles fisicoquímicos, compuestos fenólicos, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Propolis is a cereus resin of complex composition and viscous consistence made by honeybees from resinous exudations of different plants. It is used in construction, fixing and protection of honeycomb.

In this research work were determined the microbiological and physicochemical characteristics of propolis collected in three climatologically different zones from Nariño Department, like San Juan de Pasto (Botana experimental farm), Buesaco and La Unión. Samples were presented as irregular brilliant aggregates with homogeneous structure and plastic and sticky consistence. Its color was green maroon, aromatic resinous odor and astringent flavor. The percentage values of mechanical impurities, wax, resins and soluble solids confer to them a quality degree, appropriated for agro industrial applications.

From the content of phenolic compounds it was pointed out in analysis of flavonoid-type molecules and oxidation index, because it conditions in a great extent the concentration of flavones, flavanones and flavonols responsible of antibacterial activity. The total flavonoid content measured with aluminum chloride and 2,4- dinitrophenyl hidrazin colorimetric methods ranged from 20% - 73.69%. The oxidation index according to potassium permanganate test ranged from 2 to 3.6 seconds as a proof of antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis from the selected zones. The analysis of mineral contents showed a low variability in sodium and potassium, presenting the higher values for calcium and potassium. The zinc contents exhibited the lower concentration in contrast with samples from other zones of the country. The samples evidenced the presence of some fractions of manganese and nickel too.

HPLC/MS analysis identified the structure, carbohydrate sequence, aglicon moiety and glucosidic bonds from eight compounds of phenolic nature, a flavonol (ramnetin) and six flavones (luteolin-8C-glucoside, 6,8-dimethoxigenkwanin, 6,8-dimethoxiluteolin, crisin, genkwuanin and pinocembrin-8C-glucoside).

Biological activity of ethanolic extracts of propolis was evaluated using the antibiogram methods of Kirby-Bauer and well diffusion. It was measured the inhibition growing halos of the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative organism *Escherichia coli*. *E. Coli* was the less sensitive to the tested treatments, and the higher susceptibility of Gram-positive bacteria do not depended exclusively from the flavonoid kind, but the synergistic effect of all the phenolic compounds exhibiting antibiotic activity.

Key Words: Propolis, physicochemical profiles, phenolic compounds, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto complejo derivado de la actividad de las abejas, elaborado a partir de la colecta en el campo de las exudaciones de las plantas y bajo condiciones climáticas establecidas. Conforme a su origen los propóleos pueden ser elaborados a partir de resinas, bálsamos y gomas, mientras que sus modificaciones residen en la adición de cera, polen y enzimas, entre otros materiales. (ASIS, M., 1991)

Los estudios de la composición química y de las propiedades de los propóleos provienen principalmente del tipo de vegetación en donde se colectaron los materiales, la cual es diversa en cada zona biogeográfica, hecho que determina una composición y propiedades diferentes para distintos propóleos.

Este producto apícola tiene un alto valor debido a las numerosas propiedades que presenta como bactericida, antioxidante y antiinflamatorio, entre otras. Estas propiedades, comprobadas en ensayos de laboratorio clínico, han transformado este noble producto en el “Oro púrpura de las abejas”, según definición del cubano ASIS, M., 1991, y es por lo tanto, muy requerido por diferentes países del mundo, especialmente Alemania, Francia y Japón. Sin embargo, a pesar de ser muchos y variados los campos en el que pueden ser aplicadas sus propiedades, en el Departamento de Nariño, este producto no se ha tenido en cuenta; es por esto que se plantea el desarrollo de un estudio analítico de las propiedades fisicoquímicas y bioactivas del propóleo como producto colmenar, agente de alta complejidad que presenta una gran utilidad en el ámbito químico y farmacéutico, pero cuya exploración e información es limitada respecto a la producción de la zona apícola de nuestro departamento.

En la ejecución y desarrollo de este estudio se resaltarán las propiedades químicas y funcionales del propóleo, así como la importancia que cada una de ellas cobra. Para la caracterización y cuantificación de los componentes químicos presentes en los extractos de propóleo se emplearán técnicas analíticas de alta sensibilidad. Por su parte, la actividad antibacteriana se analizará mediante pruebas *in vivo* frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante técnicas analíticas las propiedades fisicoquímicas de los propóleos provenientes de la zona apícola del Departamento de Nariño, y evaluar su acción antibacteriana.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar mediante las técnicas de HPLC/MS, AA y espectrofotometría UV los principales grupos de componentes químicos presentes en los extractos de propóleo.

Adelantar un estudio analítico comparativo de la composición química del propóleo en función de la zona biogeográfica de origen.

Evaluar la actividad antibacterial de los extractos propólicos mediante ensayos *in vitro* frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos considerando el perfil de la composición química.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 GENERALIDADES

El nombre de propóleo proviene del término latín “pro” antes y del griego “polis” ciudad. Es un material resinoso colectado por las abejas obreras de la especie *Apis Mellífera*, a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de las plantas. Los materiales colectados, son triturados, humedecidos con saliva y secreciones enzimáticas, mezclados con la cera producida por las glándulas céricas y finalmente transportados por las abejas hacia la colmena, donde cumplen diversas funciones; tales como, mantener la colmena libre de bacterias y hongos patógenos, actuar como soporte estructural para cubrir rendijas y agujeros, regular la temperatura en el interior de la colmena y evitar la entrada de otros organismos. Debido a que con el mismo las abejas formaban las barreras para reducir la piquera y así lograr una mejor defensa de la colmena (BURDOCK, 1998; CASTALDO y CAPASSO, 2002; PIETTA, P.; GARDANA, C.; PIETTA A., 2002).

El color del propóleo depende de su origen, varía de marrón oscuro pasando por una tonalidad verdosa a marrón rojizo. Tiene olor característico que puede variar de una muestra a otra (MARCUCCI, 1995). Este producto hasta los 15°C es duro y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C llegando en algunos casos hasta 100°C (GREENWAY., W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F., 1990).

2.2 COMPOSICIÓN

La composición química del propóleo es altamente variable, ya que ésta depende del sitio de recolección y por lo tanto de los diferentes ecosistemas donde las abejas recolectan los exudados y las secreciones de las plantas. Definir la composición química de éste material es un trabajo arduo, especialmente en muestras de origen tropical (BANKOVA, 2000). Sin embargo, se puede decir que en general los propóleos están compuestos por 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias que incluyen escombros orgánicos (BURDOCK, 1998). Además, se ha determinado que los componentes del propóleo se originan de tres fuentes: los exudados que colectan las abejas de las plantas, las sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y los materiales que se introducen durante la elaboración del propóleo (MARCUCCI, 1995).

Los análisis de la composición química de este producto apícola han permitido la identificación de por lo menos 300 compuestos (CASTRO, 2001), entre los que se incluyen flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos y cetonas, ácidos grasos y sus ésteres, terpenos, esteroides, aminoácidos, polisacáridos, hidrocarburos, alcoholes, y otros compuestos presentes en trazas (MATSUDA, J.; HAVSTEEN, B., 2002; ROCHA, P., et al., 2006; OZKUL, G.; BASTOS, E., 2003; HU, et al., 2005; HAYACIBARA, et al., 2006).

Los propóleos contienen agliconas flavónicas (galangina y pinocembrina) y fenoles (pinobanksina, acetato de 3-Opinobanksina, bencil-p-cumarato, ésteres del ácido caféico y ácidos ferúlico y cinámico). En los propóleos alemanes se observa feniletil trans-cafeato, bencil ferulato y galangina, en los de origen francés, el bencil cafeato y pinocembrina y los del mediterráneo (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia), ésteres de ácido caféico y ácidos ferúlicos, diterpénicos e hidroxiditerpénicos (AMADO, E. et al., 1997).

El análisis de muestras propólicas suizas e italianas muestran contenidos de bencil p-cumarato y bencil ferulato bastante altos (>5%) y ausencia de pinobanksina y prenil cafeatos. De otra parte, los propóleos turcos, egipcios, brasileños, chilenos y cubanos de procedencias botánicas distintas muestran composiciones variadas, debido a la diversidad de flora de donde provienen los exudados para su fabricación. (AMADO, E. et al., 1997).

Según GHISALBERTI, E. (1978), los constituyentes mayoritarios de los propóleos son el pterostilbeno, xanthorhoeol, sakuranetina y pinostrobin. Los flavonoides, constituyentes principales de resinas y bálsamos representan el 35% de los compuestos presentes en propóleos procedentes del sur de Bulgaria, un 21,4% de pinocembrina; galangina 5%; crisina 4,8%; quercetina 2,2% y tectocrisina 1,1 % (BANKOVA et al., 1982).

Los análisis realizados por BELESTRIERI y MARINI (1987) sobre muestras de propóleos rumanos, dan en porcentaje los siguientes valores: aceites esenciales 6,5%; resinas y bálsamos 51,3%; ceras 34,7%; polen 3,5% y otros constituyentes en un 4%. Para estos autores, al igual que otras investigaciones indican que los constituyentes mayoritarios del propóleo son de naturaleza fenólica (principalmente flavonoides), y no contienen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hormonas ni vitaminas, a excepción de las vitaminas pertenecientes al complejo B.

2.2.1 Contenido de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos o polifenoles han sido reconocidos por su amplio espectro de actividad biológica, tales como anticancerígenos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, analgésicos y antioxidantes (GÓMEZ, et al., 2006). Se ha establecido que la mayoría de los compuestos bioactivos encontrados en los propóleos son compuestos fenólicos, sin embargo, la concentración de éstos puede variar sustancialmente de acuerdo al origen de las muestras y así mismo pueden variar las propiedades biológicas

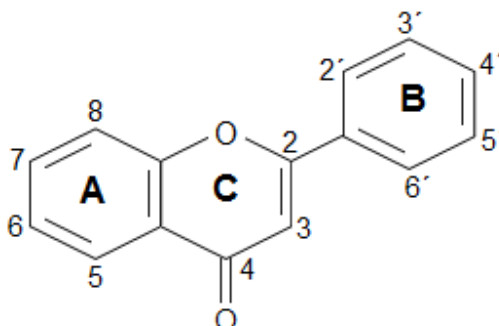
que se les atribuyen. Por esta razón, es de gran importancia realizar ensayos que permitan su detección y cuantificación, con el objeto de definir parámetros de calidad para este producto apícola.

Actualmente, el contenido de compuestos fenólicos en propóleos se determina con el método de Folin-Ciocalteu, en el cual la oxidación de los compuestos fenólicos por molibdotungstato fosfórico, da como resultado un producto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 760 nm (SINGLETON y ROSSI, 1965). En Argentina, el Código Alimentario de éste país establece que la cantidad de compuestos fenólicos que debe tener una muestra de propóleos bruto para su consumo y distribución no debe ser menor al 5%, y en un extracto blando no debe ser inferior al 0.25% (M.I. NIEVA MORENO, et al., 1999). Diversos estudios han demostrado una correlación directa entre el contenido de fenoles totales y actividad biológica presentes en los propóleos, como actividades antioxidante y antibacterial (KUMAZAWA, et al., 2004; CHOI. et al., 2006; MOREIRA, et al., 2008).

Por su parte los ácidos fenólicos se caracterizan por poseer en su estructura química el anillo aromático y el grupo hidroxílico, comunes a los compuestos fenólicos y una función carboxílica. Los ácidos fenólicos que tienen interés terapéutico son derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico (caféico, ferúlico, *p*-cumárico). Los primeros son muy abundantes en la naturaleza tanto libres, como ácidos o aldehídos (vainillal, anisaldehído), así como combinados en formas heterosídicas, correspondiendo a este grupo la unidad básica estructural (ácido gálico) de los taninos gálicos en formas hidrolizables. Los segundos también son abundantes en la naturaleza pero en este caso se encuentran casi siempre esterificados con azúcares, alcoholes alifáticos, ácido quínico (ácido clorogénico), otros metabolitos secundarios (flavonoides) o bien amidificados (BORRELLI, F., et al., 2002).

2.2.2. Flavonoides. Son compuestos de naturaleza fenólica que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono con estructura general $C_6-C_3-C_6$ como aparece en la figura 1.

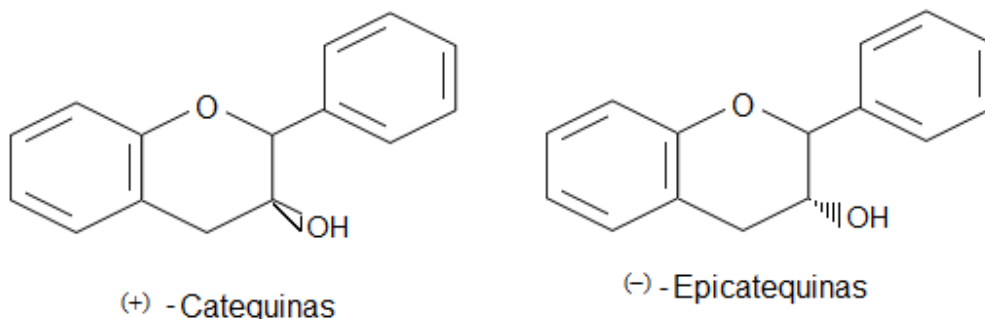
Figura 1. Estructura básica del sistema anular para flavonoides

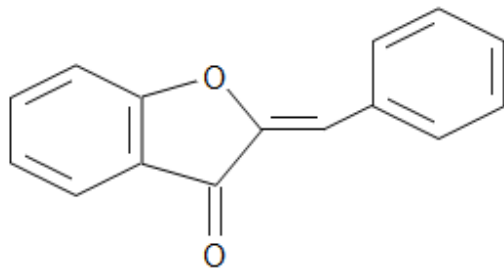


Los anillos son denominados A, B y C, los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números prima para el anillo B. Los flavonoides naturales suelen presentar tres hidroxilos fenólicos. Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con las sustituciones del anillo C.

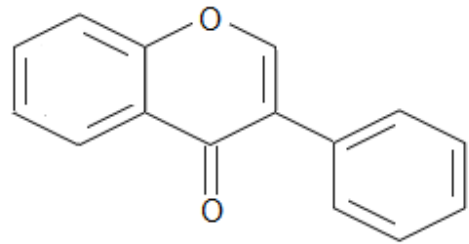
Los flavonoides, compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, se originan a través de la combinación de la ruta del acetato y del sikimato, vías mediante las cuales se biosintetiza la estructura diaril-propánica (condensación de un triacetato que origina el anillo A y de un ácido cinámico que da lugar al anillo B). En la naturaleza pueden encontrarse tanto en forma libre (geninas) como combinados con azúcares mediante uniones O- y C-heterosídicas. La mayoría de ellos están constituidos por un núcleo bencénico unido a una γ -pirona, incluyendo además en distintas posiciones, C-1, C-2 o C-3, un segundo anillo bencénico que da lugar a los neoflavonoides, flavonoides propiamente dichos o a los isoflavonoides respectivamente. Con esta estructura existen un número elevado de compuestos distintos que pueden clasificarse en función del grado de oxidación del anillo piránico central como se indica en la figura 2. (STOBIECKI, M., 2000)

Figura 2. Estructura de algunos flavonoides y compuestos relacionados.

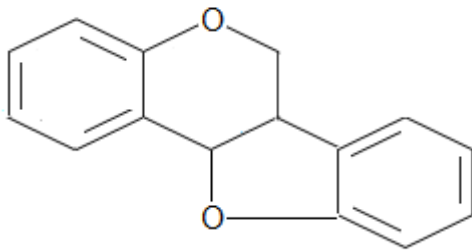




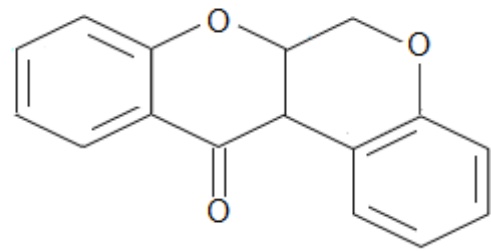
Auronas



Isoflavonas



Pierocarpanos



Rotenoides

Para los vegetales, estos compuestos son importantes, además de ser responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas, y por ello intervenir en la polinización atrayendo a los insectos, participan en la vida del vegetal ejerciendo importantes funciones como por ejemplo proteger de los efectos nocivos de la radiación UV y ejercer una eficaz actividad antioxidante (HARBORNE, J., 1994).

Investigaciones relacionadas con la determinación del origen de los flavonoides han revelado que las principales fuentes son las resinas de los árboles del género *Populus* (*P. nigra*, álamo) y sus híbridos, *Betula* (*B. verrucosa*, abedul), *Pinus* (*P. silvestris* L. pino), *Acacia* (*A. spp.*), *Aesculus* (*A. hippocastanum* L, castaño), entre otros. Estas especies vegetales son típicas de regiones templadas y frecuentemente no es posible localizarlas en las regiones tropicales. (BERHOW, M., 1999). Otras investigaciones en las regiones tropicales mostraron que las principales fuentes vegetales son especies de *Clusia* (*C. major*, *C. minor*), *Araucaria* (*A. spp.*), y *Baccharis* (*B. spp.*). En Rusia septentrional la fuente vegetal es el abedul (*Betula verrucosa*) y la *P. tremula*; en el mediterráneo las choperas y hojas de *Cistus spp*; en Brasil la *Baccharis dracunculifolia*; en Venezuela y Cuba la resina floral del género *Clusia* (MIKSICEK, P., 1993).

Biosíntesis de flavonoides

Los flavonoides se biosintetizan en las plantas y participan en la fase luminosa de la fotosíntesis, en donde catalizan el transporte de electrones (DAS, 1994). Los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina provienen de la ruta del ácido

Shiquímico (figura 3). Mediante la acción de las liasas amoniacales de fenilalanina (PAL) y tirosina (TAL), estos aminoácidos pueden interconvertirse en los ácidos cinámico y *p*-hidroxicinámico respectivamente, los cuales, mediante una reducción, pueden convertirse en cinamaldehído y *p*-hidroxicinamaldehído (figura 4) (KEEN Cl., 2005) (HELLNER W., FORKMANN G., 1993). Así, el ácido cinámico (o el ácido *p*-hidroxicinámico, o bien, derivados de ácidos fenólicos tales como los ácidos caféico, ferúlico y clorogénico, los cuales son considerados derivados del ácido cinámico) se condensa con las unidades de acetato y mediante un re-arreglo de Fries, forma la porción cinamoil de los flavonoides, los cuales generan el núcleo estructural básico de los flavonoides. Para generar el núcleo de las chalconas y flavanonas, tiene lugar una condensación catalizada por álcali entre una molécula de *o*-hidroxiacetofenona con un derivado del benzaldehído (figura 5).

Para la formación del núcleo de las 2-hidroxi flavanonas y flavonas ocurre la misma reacción de condensación, sólo que en esta ocasión, participan la *o*-hidroxiacetofenona y un derivado de ácido benzoico (cloruros de acilo o anhídridos) como se indica en la figura 5. (KEEN Cl., 2005).

Figura 3. Interconversión química del ácido Shiquímico en varios derivados aromáticos, incluyendo a los aminoácidos fenilalanina y tirosina. (KEEN Cl., 2005).

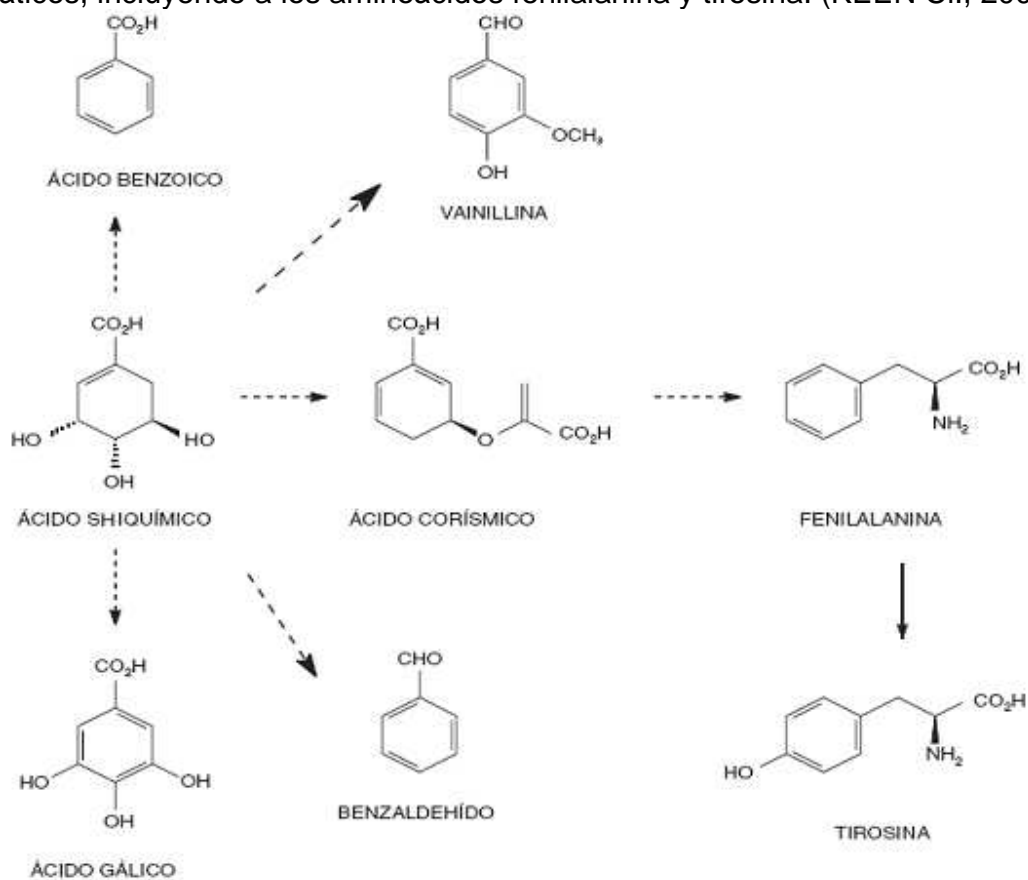


Figura 4. Conversión de la fenilalanina y tirosina en cinamaldehído y p-hidroxicinamaldehído mediante la acción de la fenilalanina liasa amoniacal (PAL) y tirosina liasa amoniacal (TAL), respectivamente (HELLNER W., FORKMANN G., 1993).

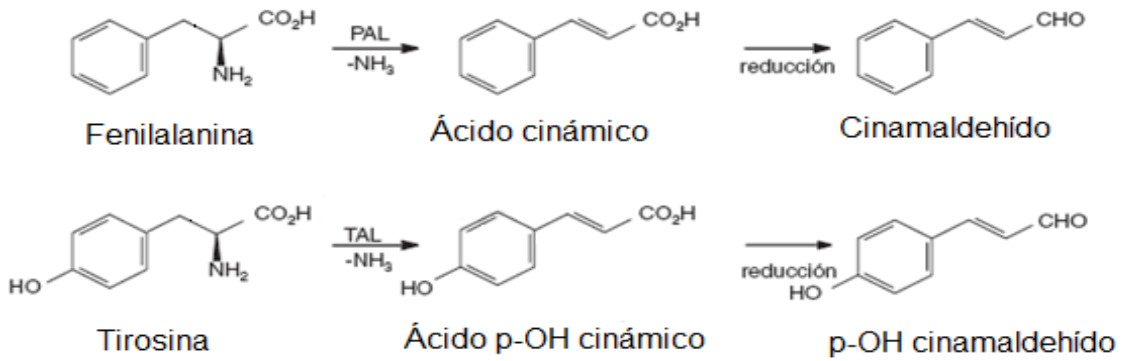
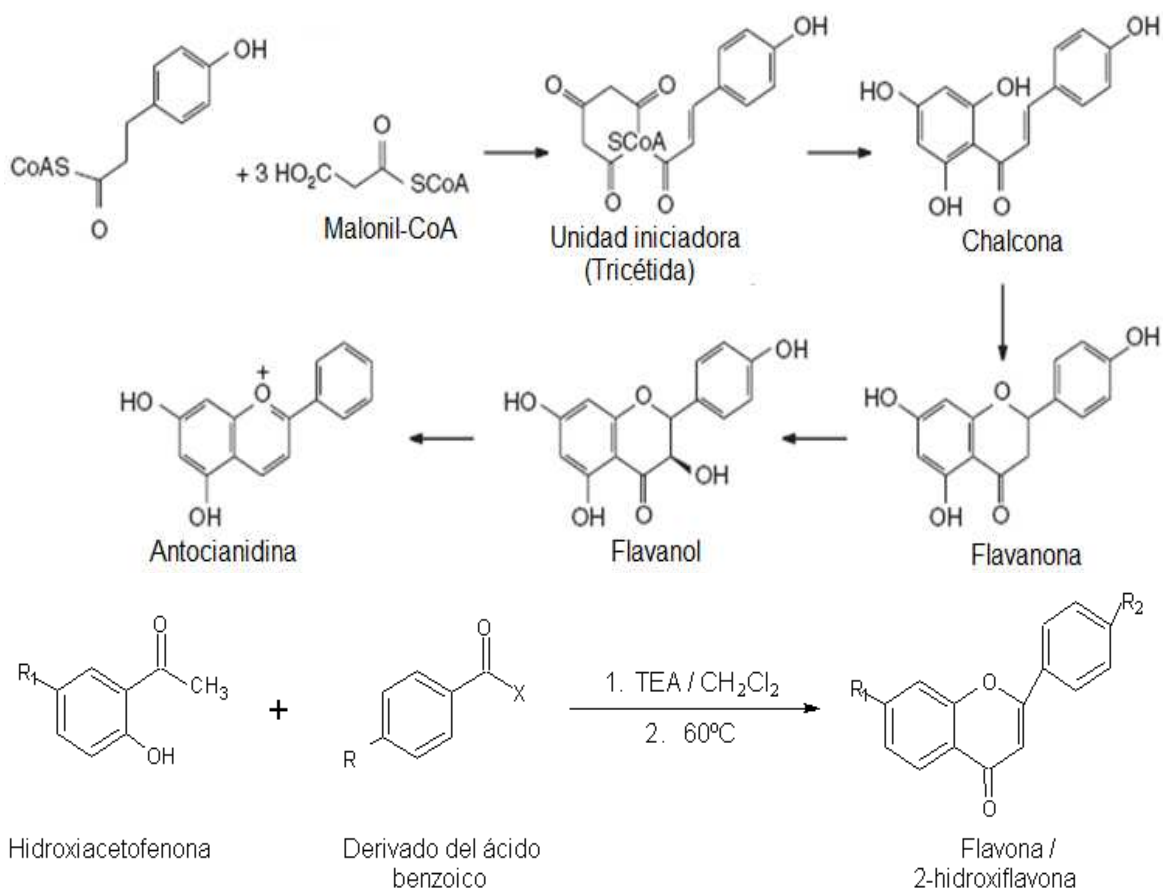


Figura 5. Biosíntesis de los núcleos chalcona, flavanona, flavanol y antocianidina (AMADO, E.; et al., 1997).



Los flavonoides son sustancias fenólicas de interés científico y terapéutico. Se les han atribuido diversas propiedades farmacéuticas desde tiempos antiguos y se ha establecido que son el principal componente funcional de formulaciones de plantas e insectos de uso médico (HAVSTEEN, 2002). Algunas de las actividades biológicas que se le atribuyen al propóleo se deben al alto contenido de flavonoides que generalmente se presenta en las muestras.

El método para evaluar el contenido de flavonoides se basa en el uso de reactivos de desplazamiento en el ultravioleta visible, generalmente se utiliza $AlCl_3$ para la identificación de flavonas y flavonoles, y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 425 nm (KUMAZAWA et al., 2004), consiste en formar complejos ácidos estables con los grupos cetonas C-4 e hidroxilo del C-3 y C-5 de las flavonas y flavonoles. Las Flavonas y flavanoles, que no contienen grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 3, no son reactivos frente al tricloruro de aluminio. Adicionalmente, el tricloruro de aluminio forma complejos ácidos lábiles con los grupos orto-hidroxilo del anillo A o B de los flavonoides. Las 5-hidroxi flavonas y 5-hidroxi flavonoles, forman un compuesto estable de color amarillo. La formación de este tipo de compuestos, causan un considerable efecto batocrómico de las bandas I y II típicas de flavonoides. El desplazamiento batocrómico en flavonas es del orden de 20 a 45 nm. Las 3-hidroxi flavonas forman un complejo estable aún en solución ácida, con iones de aluminio, condición que puede ser usada para distinguir entre 3-hidroxi y 3-glicosidoxiflavonas. Las flavonas como resultado de esta interacción generan estructuras resonantes que dan estabilidad al complejo.

La cuantificación de flavanonas y dihidroflavonoles se fundamenta en la interacción de éstos compuestos con 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4D) en medio ácido, y la formación de fenilhidrazonas coloreadas (POPOVA, et al., 2004). El reactivo (2,4D), es activo frente a los grupos carbonilo de las flavanonas y flavanoles. Sin embargo, se ha demostrado que en flavonas, flavonoles e isoflavonas, con doble enlace en los átomos C_2-C_3 , no necesariamente son reactivos a (2,4D), mientras que las flavanonas libres que no poseen doble enlace en la posición indicada, lo son. En este grupo se destaca la Naringenina, Naringina y Hesperidina, mostrando un máximo de absorbancia a 495 nm.

Estos métodos son reportados en evaluación de propóleos por WOISKY y SALATINO, (1998); KUMAZAWA, et al., (2004); AHN, et al., (2004); MARQUELE, et al., (2005); GOMEZ, et al., (2006); AHN, et al., (2007); CHOI, et al., (2006); SOLEO de FUNARI., et al., (2007); MOREIRA, et al., (2008), entre otros.

De acuerdo con SALAMANCA (2002), los compuestos activos del propóleo más analizados son los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanonoles, siendo el principal objeto de investigación en el campo de la apicultura pese a su gran diversidad, cuyas estructuras características, se encuentran representadas en las figuras 6 a 9 de acuerdo a los grupos sustituyentes R descritos en las tablas respectivas.

Figura 6. Estructura general de las flavonas. SALAMANCA (2002)

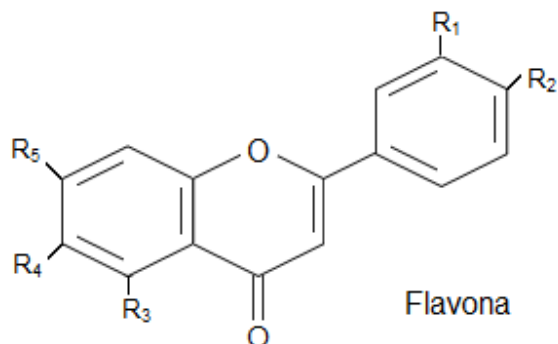


Tabla 1. Flavonas asociadas a la actividad apícola. SALAMANCA (2002)

Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Apigenina	H	OH	OH	H	OH
Crisina	H	H	OH	H	OH
Genkwanina	H	OH	OH	H	OMe
Luteolina	OH	OH	OH	H	OH
Pinocembrina	H	H	OH	H	OH
Tectochrisina	H	H	OH	H	OMe
Luteolina 7 Metil éter	OH	OH	OH	H	OMe

Figura 7. Estructura general de los flavonoles. SALAMANCA (2002)

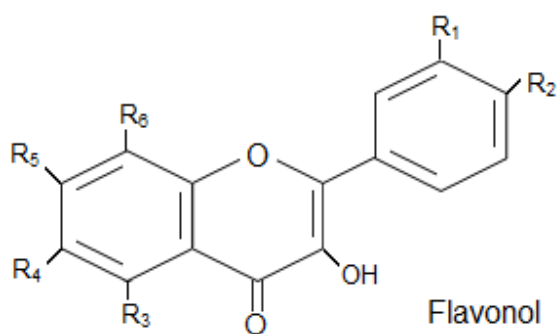


Tabla 2. Flavonoles asociados a la actividad apícola. SALAMANCA (2002)

Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Galangina	H	H	OH	H	OH	H
Fisetina	OH	OH	H	H	OH	H
Kaemferol	H	OH	OH	H	OH	H
Herbacetina	H	OH	OH	H	OH	OH
Quercetina	OH	OH	OH	H	OH	H
Ramnetina	OH	OH	OH	H	OMe	H
Quercetagetina	OH	OH	OH	OH	OH	H
Gossipetina	Ome	OH	OH	H	OH	OH
Isorramnetina	OH	OMe	OH	H	OH	H

Figura 8. Estructura general de los flavanoles. HAVSTEEN, B-H (1993)

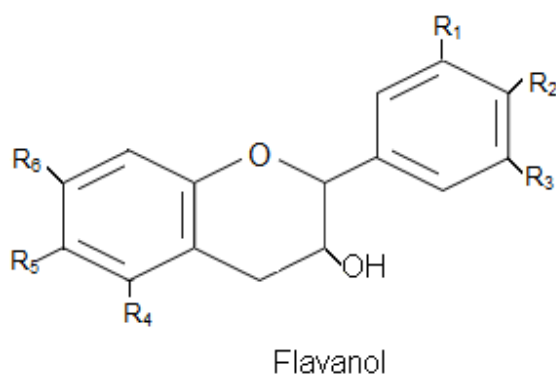


Tabla 3. Flavonoles asociadas a la actividad apícola. HAVSTEEN, B-H (1993)

Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(+)-Catequina	OH	OH	H	OH	H	OH
(+)-Gallocatequina	OH	OH	OH	OH	H	OH
(-)-Epicatequina	OH	OH	H	OH	H	OH
(-)-Epigallocatequina	OH	OH	OH	OH	H	OH
(-)-Epicatequina galleate	OH	OH	H	OH	H	OH
(-)-Epigallocatequina galleate	OH	OH	OH	OH	H	OH

(+) Isómero óptico dextrógiro, (-) Isómero óptico levógiro

Estructura galleate: C₇H₅O₄, 3,4,5-trihidroxibenzoato (ligado al Oxígeno, OH anillo C)

Figura 9. Estructura general de las flavanonas. SALAMANCA (2002)

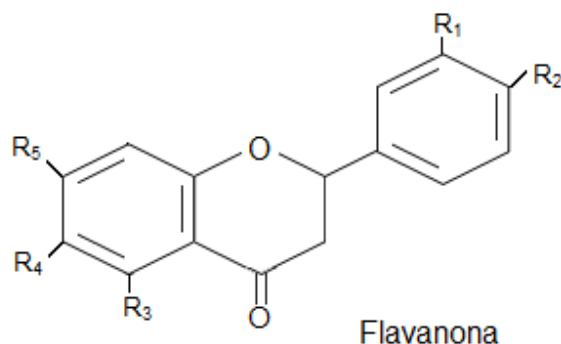


Tabla 4. Flavanonas asociadas a la actividad apícola. SALAMANCA (2002)

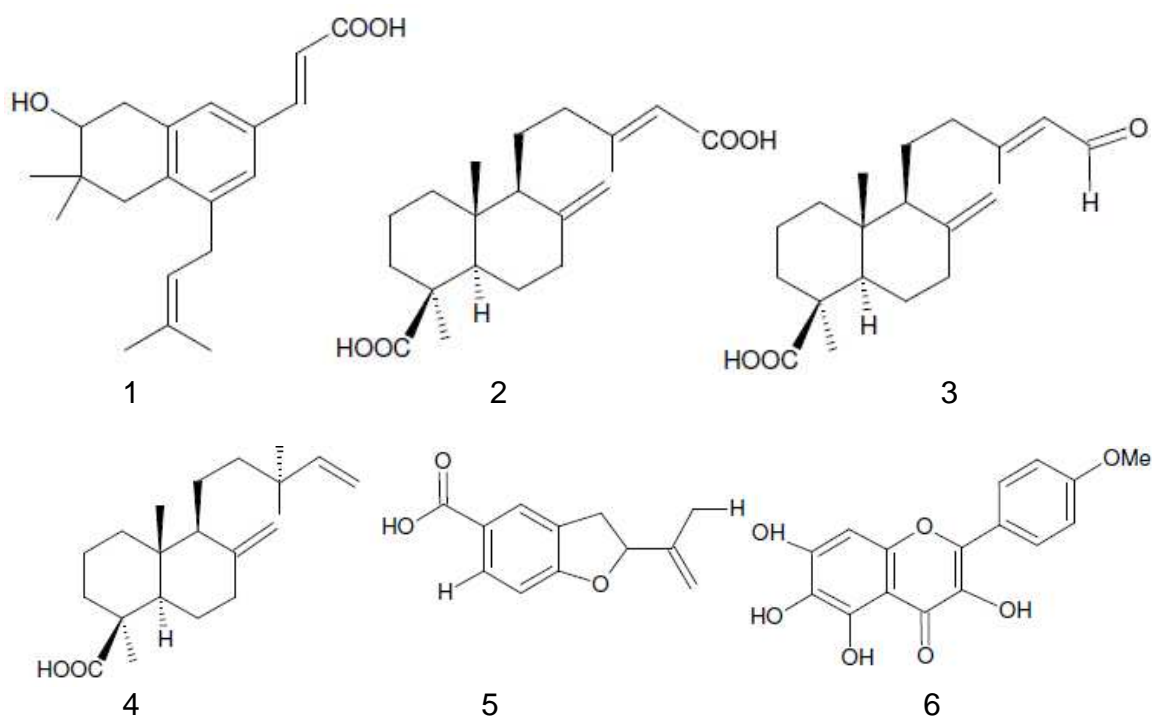
Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Pinocembrina	H	H	OH	H	OH
Liquiritigenina	H	OH	H	H	OH
Naringenina	H	OH	OH	H	OH
Sakuranetina	H	OH	OH	H	OMe
Eriodictiol	OH	OH	OH	H	OH
Herperetina	OH	OMe	OH	H	OH

2.3 COMPOSICIÓN DE LOS PROPÓLEOS DE ZONA TROPICAL

En las zonas tropicales donde no se encuentran álamos ni abedules, las abejas encuentran disponibles una gran variedad de plantas. Las especies reconocidas en éstas zonas como la mayor fuente de exudados son *Clusia spp.*, *Araucaria heterophylla*, y *Baccharis spp.* (CUESTA, et al., 2007). Los propóleos de zonas tropicales están compuestos principalmente por ácidos p-coumáricos prenilados, acetofenonas, lignanos, di y triterpenos (BANKOVA, 2000). Algunas evidencias han demostrado que los exudados de las flores de las especies *Clusia minor* y *Clusia major* son las fuentes de los propóleos Venezolanos, debido a la presencia de benzofenonas polipreniladas tanto en los exudados como en los propóleos. Así mismo, se ha comprobado que los diterpenos tipo labdano presentes en *Araucaria heterophylla*, se presentan en los propóleos de Brasil (BANSKOTA, et al., 1998). Por otro lado, se ha establecido que las plantas de las especies, *Araucaria heterophylla*, *Araucaria angustifolia*, *Clusia major* y *Clusia minor*, *Baccharis dracunculifolia* y *Eucalyptus citriodora*, son las posibles fuentes de exudados del propóleos verde, una de las clases de propóleos que se encuentran en Brasil (SALATINO, et al., 2005).

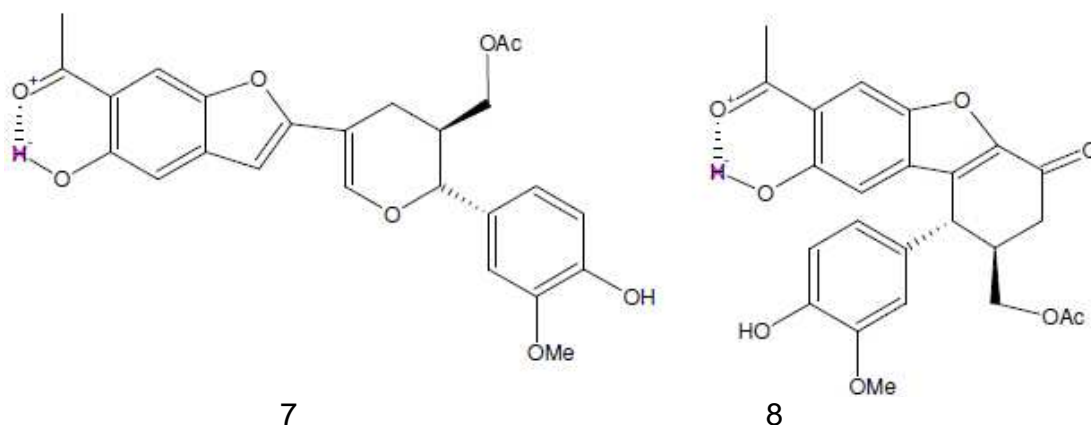
BANSKOTA, et al., (1998), aislaron de propóleos de Brasil compuestos prenilados y diterpenos tipo labdano (figura 10), entre los cuales se encuentra un nuevo compuesto prenilado derivado del cromano, denominado ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8- prenilcromano-6-propenoico (1) y algunos compuestos reportados por primera vez en propóleos, como el ácido agático (2), ácido agatálico (3), ácido cuprésico (4), tremetona (5) y betuletol (6), entre otros.

Figura 10. Benzofuranos aislados de propóleos de Brasil (BANSKOTA, et al., 2000).



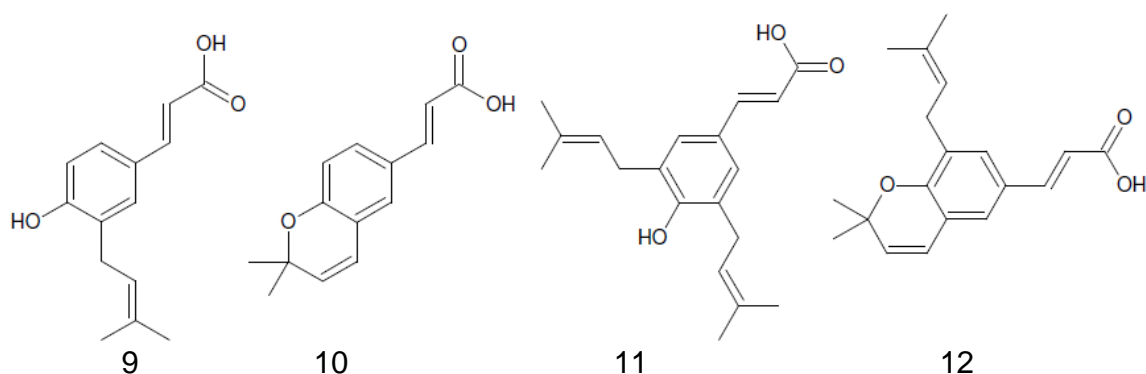
En un estudio posterior de propóleos de Brasil, BANSKOTA, et al., (2000), aislaron dos nuevos benzofuranos, llamados benzofuranos A (7) y B (8) (figura 11), los cuales presentaron moderada citotoxicidad contra células cancerígenas.

Figura 11. Benzofuranos aislados de propóleos de Brasil (BANSKOTA, et al., 2000).



MARCUCCI, et al., (2001) analizaron una muestra de propóleos de Mandirituba (Paraná, Brasil), de la cual aislaron y caracterizaron cuatro compuestos fenólicos identificados como: ácido 3-prenil-4-hidroxicinámico (9), 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (10), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinámico (11) y 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (12) (figura 12).

Figura 12. Compuestos fenólicos aislados de propóleos de Brasil (MARCUCCI, et al., 2001).

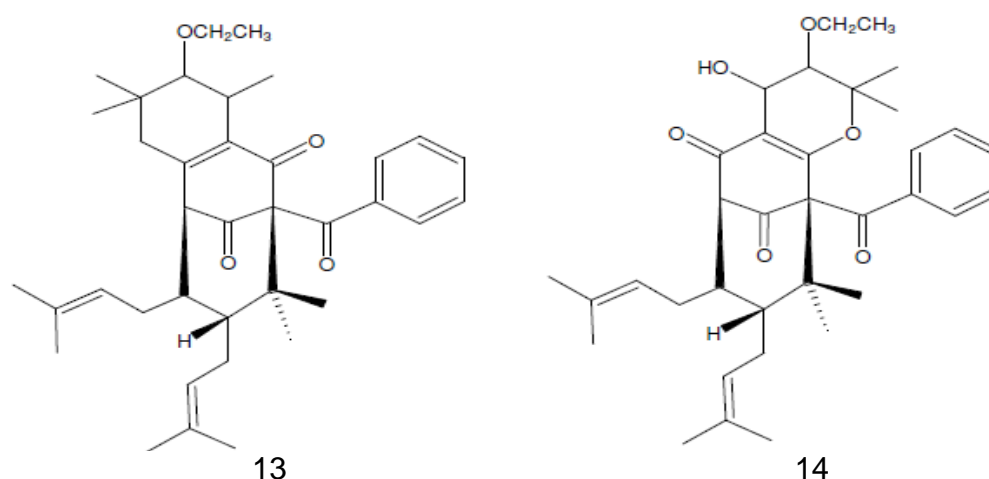


Aunque el propóleo más común y por tanto más estudiado en Brasil es el llamado propóleo verde, en el norte del país se colecta un propóleo rojo, el cual fue analizado por TRUSHEVA, et al., (2006) identificando 14 compuestos, seis de los cuales se reportaron por primera vez en este producto apícola. Se aislaron los derivados del fenilpropano: trans-anetol, metil eugenol, trans-metil isoeugenol, elemicina y trans-isoelemicina; los alcoholes triterpénicos: c-amirina, d-amirina, cicloartenol, lupeol y se reportó por primera vez en propóleos la cetona 20(29)-lupen-3-ona; los isoflavonoides: isoflavona isosativan y el terocarpano

medicarpina; la epóxido naftoquinona 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenediona, aislada por primera vez de una fuente natural y una mezcla inseparable de benzofenonas preniladas.

El propóleo de Venezuela ha sido poco estudiado, sin embargo, las investigaciones realizadas confirman la presencia de benzofenonas preniladas en los propóleos del trópico. TRUSHEVA, et al., (2004), aislaron dos nuevas benzofenonas polipreniladas (figura 13): 18-etiloxi-17-hidroxi-17,18-dihidroscribuculatona (13) y (14); además encontraron las scribuculatona (15) y (16) reportadas anteriormente por PORTO, et al., (2000) y aisladas de las resinas exudadas por las flores de varias especies de *Clusia*. Los compuestos en mención, mostraron actividad antibacteriana y moderada toxicidad contra *Artemia salina*. Otra benzofenona prenilada fue encontrada por CUESTA, et al., (1999) en propóleos cubanos. El compuesto (17) fue obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) y su fórmula molecular $C_{33}H_{42}O_4$ fue deducida, usando los análisis de EM, RMN de ^{13}C y DEPT. Este compuesto mostró actividad antimicrobiana y antifúngica contra una variedad de bacterias y levaduras. CUESTA, et al., (2007), en un estudio posterior analizaron diferentes tipos de propóleos que se encuentran en Cuba. El estudio tuvo como objetivo determinar los perfiles cromatográficos de los extractos mediante RMN de 1H y ^{13}C y caracterizar los principales compuestos mediante CLAE; así se lograron clasificar las muestras según los metabolitos secundarios presentes, como propóleos café, rico en benzofenonas poliisopreniladas; propóleos rojo cuyos principales componentes fueron los isoflavonoides, y propóleos amarillo con altos contenidos de compuestos alifáticos. Además, se aislaron los compuestos 15 y 16 reportados anteriormente en propóleos de Venezuela.

Figura 13. Benzofenonas preniladas aisladas de propóleos de Venezuela (TRUSHEVA, et al., 2004).



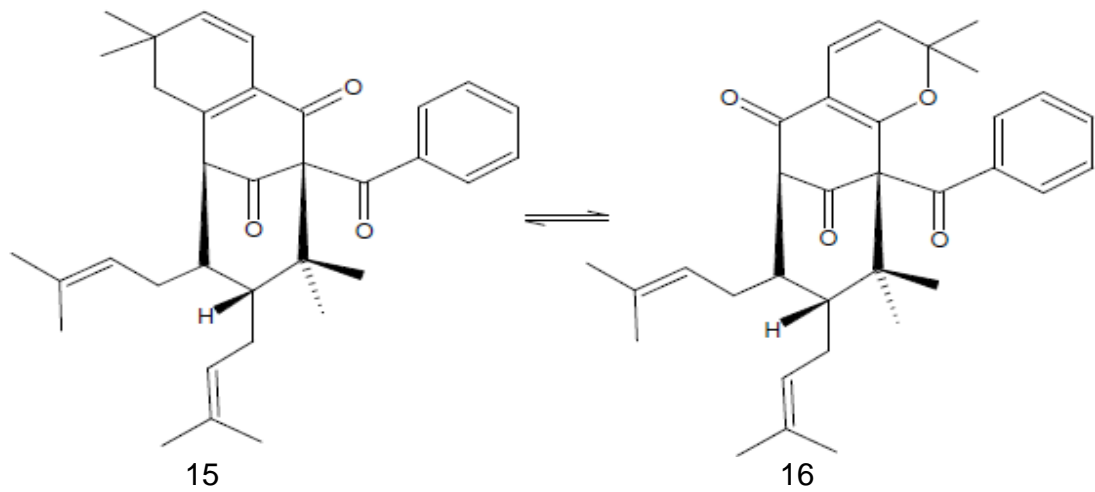
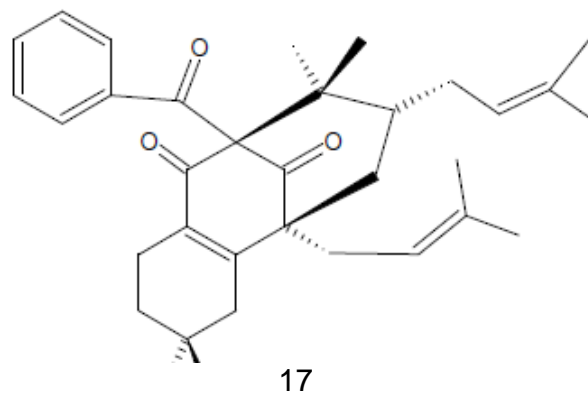
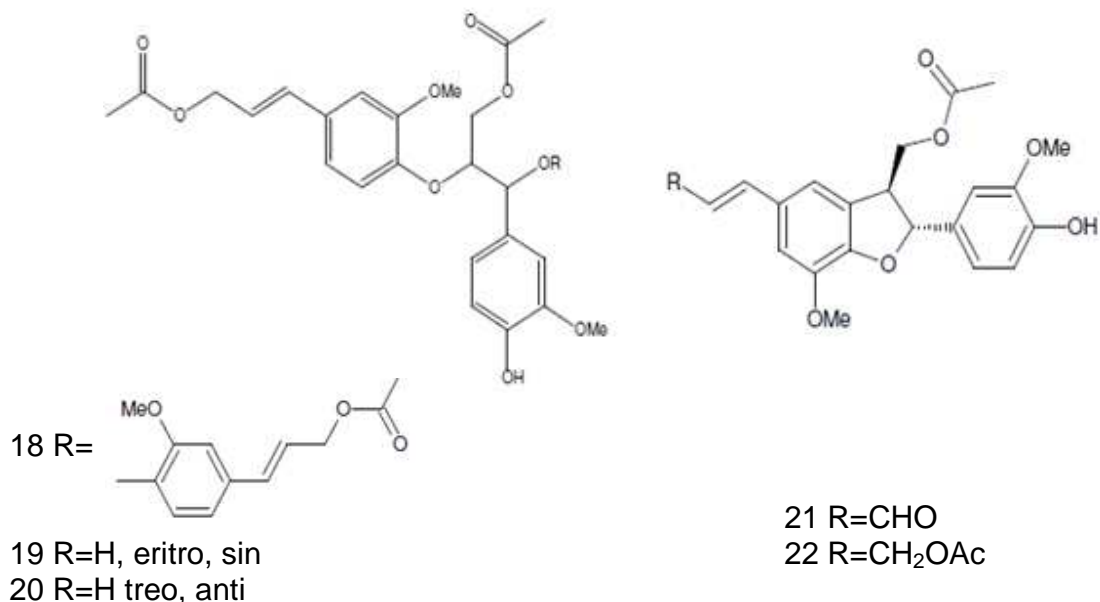


Figura 14. Compuestos aislado de propóleos de Cuba (CUESTA, et al., 1999).



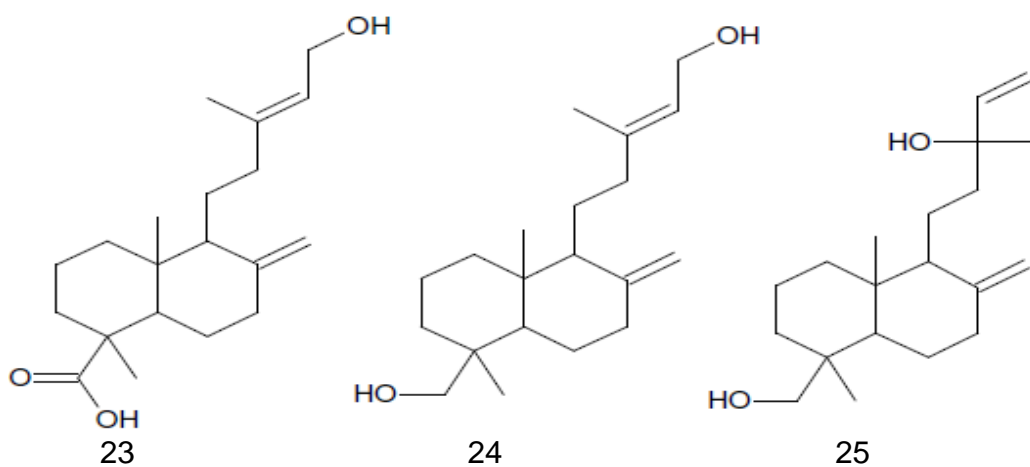
Los propóleos de Chile provienen de exudados de una vegetación particular y única, encontrándose plantas endémicas debido al aislamiento geográfico del país. La vegetación de la zona donde se colectó el propóleo consta básicamente de matorrales y arbustos; las familias de plantas dominantes en la zona, pertenecen a las familias *Asteraceae*, *Anacardiaceae*, *Rosaceae*, *Rhamnaceae*, *Monimiaceae* y *Lauraceae*. El estudio mostró que los principales compuestos en el propóleo son los lignanos y que de las cinco moléculas aisladas (18 - 22), tres se reportaron como nuevos productos naturales (VALCIC, et al., 1998) (figura 15)

Figura 15. Lignanos aislados de propóleos de Chile (VALCIC, et al., 1998).



En Colombia, MENESES, (2006), obtuvo extractos de diclorometano y éter de petróleo/metanol, a partir de una muestra de propóleos antioqueño. Los extractos sometidos a fraccionamientos cromatográficos, condujeron al aislamiento de los diterpenos de tipo labdano ácido isocuprésico (23), agatodienediol (24) y torulosol (25) (figura 16). Además, los extractos inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia theobromae* y algunas especies de *Colletotrichum*.

Figura 16. Diterpenos de tipo labdano aislados de propóleos colombianos (MENESES, 2006).



SALAMANCA, et al., (2005) analizaron el perfil de flavonoides y el índice de oxidación de algunos propóleos colombianos. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las muestras, variaciones que están en función del origen biogeográfico y que se expresaron a través del contenido de flavonoides totales con diferentes tiempos de oxidación.

2.4 PRINCIPIOS ACTIVOS Y EFECTOS FARMACOLÓGICOS

La medicina humana del mundo occidental no ha tenido en cuenta los valores terapéuticos de los propóleos, por el contrario en el mundo oriental adquiere importancia como medicina alternativa.

En las últimas décadas este material ha llamado la atención de los investigadores, desarrollándose numerosos estudios que le atribuyen una amplia gama de propiedades biológicas, entre las que están, actividad antimicrobiana (MARCUCCI, et al., 2001; UZEL, et al., 2005; LU L-C CHEN, et al., 2005), antiviral (AMOROS, et al., 1994; KUJUMGIEV, et al., 1999), anticancerígena (BANSKOTA, et al., 2000; ORSOLIC, et al., 2004; MISHIMA, et al., 2005), antiinflamatoria (CARDILE, et al., 2003; HU, et al., 2005) y antiparasitaria (DANTAS, et al., 2006; DE CARVALHO, et al., 2007). Adicionalmente, algunas investigaciones han sido dirigidas hacia el estudio de la actividad antioxidante (WANG, et al., 2004; AHN, et al., 2004; TRUSHEVA, et al., 2006) obteniéndose resultados altamente prometedores.

En general el propóleo presenta una amplia acción antimicrobiana, demostrada por ensayos *in vitro* frente a cocos Gram positivos y algunas bacterias Gram negativas, observándose especialmente la eficacia del propóleo en afecciones gastrointestinales producidas por *Streptococcus fecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* y *Shiguella sp*, quienes en algunas ocasiones manifiestan resistencia a los medicamentos convencionales. Entre los muchos propóleos analizados se destaca especialmente el de origen alemán que posee gran eficacia frente al *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, por su contenido de fenetil trans-cafeato, bencilferulato y galangina que poseen propiedades bacteriostáticas y bactericidas. (KUJUMGIEV, A. et al., 1999)

Los principales precursores de peptidoglucanos que conforman la pared celular de las bacterias son la acetilglucosamida y el ácido murámico, y las bacterias se encuentran bajo elevada presión osmótica con relación a los líquidos corporales. Los diferentes compuestos que conforman el propóleo actúan directamente como bactericida inhibiendo la biosíntesis del peptidoglucano haciendo que la pared celular de las bacterias se debilite y experimente lisis, lo que a su vez disminuye el porcentaje de crecimiento celular del patógeno. (CASTELLOTTI, G. y BENDAZZOLI, P., 1997; GONZALEZ, A. y BERNAL, 1997)

Análisis de laboratorio con cepas patógenas de microorganismos han demostrado la acción bactericida del propóleo para tratamientos de tuberculosis donde actúa frente al bacilo de Koch, en manifestaciones dérmicas e infecciones postquirúrgicas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. (MIRZOEVA, O., et al., 1997)

Dependiendo de la dosis, almacenamiento del producto, contenidos de flavonoides y capacidad inhibitoria, el uso de extractos de propóleos al igual que su aplicación varía de acuerdo al microorganismo a someter y al efecto requerido. Los extractos etanólicos al 60 - 80% inhiben el crecimiento bacteriano mediante el efecto bacteriostático y producen inactivación de la hialuronidasa en concentraciones del 80 y del 70 - 80% evidencian acción antioxidante. Los extractos acuosos poseen características particulares de gran importancia, pero se ha establecido mediante investigaciones que inducen una protección no específica frente a las Bacterias Gram negativas como la *Klebsiella Pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*. (CASTELLOTTI, G. y BENDAZZOLI, P., 1997; GOMEZ, L. y OJEDA, C., 2002)

El propóleo posee efectos fungicidas frente a especies como *Cándida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascosphaera apis* y *Plasmopara vitico sarla*. *Alternaria alternat*, *Penicillium digitatum*, *Trichophyton metagrophytes*, *Malassezia pachydermatis*, *Cándida albicans*, *Cándida tropicalis*, *Cándida krusei* y *Cándida guilliermondii*. El diluyente del propóleo, aceite, etanol, propilenglicol o glicerina influye en la acción antifúngica. Dependiendo de la concentración de un componente en el propóleo se observa mayor o menor efecto sobre el agente patógeno. Existen análisis que comprueban la igualdad de eficacia antifúngica del propóleo con respecto a la sustancia pura, incluso en lesiones producidas por hongos que han creado resistencia a medicamentos tradicionales como el fluconazol, clotrimazol y econazol. (GHISALBERTI, E. L., 1979; GOMEZ, L. y OJEDA, C., 2002)

Estudios *in vitro* han logrado establecer que el propóleo y sus diversos componentes disueltos en etanol poseen actividad anticancerosa, especialmente en el tratamiento de cáncer de mama disminuyendo la proliferación celular de células malignas y no funcionales. Diversos análisis *in vitro* han comprobado la eficacia de los propóleos como inhibidores de mutagenicidad e inhibición del ciclo celular de las células afectadas, induciendo apoptosis sin afectar las células sanas, eliminando las células no funcionales y fortaleciendo las células inmunoreparadoras (BRETZ, W., et al., 1998). Otras actividades biológicas muestran que soluciones acuosas de propóleo administradas por vía oral aumentan la cantidad de leucocitos y células asesinas naturales en sangre periférica de pacientes inmuno-comprometidos.

A nivel nutricional los efectos potencializadores del propóleo actúan como coadyuvantes en la absorción del hierro, calcio, fósforo y magnesio,

incrementando la síntesis de las subunidades de la hemoglobina y disminuyendo la posibilidad de anemia ferropénica; a esto se suma la evidente recuperación de masa y peso corporal de los pacientes con patologías nutricionales. (LEE, S. E., 2003)

2.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Una de las actividades biológicas más estudiada en los extractos etanólicos de propóleo (EEP) es la referida a su acción antimicrobiana análoga a la acción de un antibiótico sintético. Los agentes antimicrobianos presentes en los EEP actúan por una serie de mecanismos muy diferentes entre ellos, y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada. (CHAMBERS, HF., SANDE, MA., 1995) Las diversas regiones y procesos hacia los cuales se dirige el ataque antibacteriano en general pueden ser: pared bacteriana, membrana bacteriana, síntesis de ácidos nucleicos y síntesis de proteínas. En la tabla 5 se presenta una clasificación de los agentes antibióticos, en donde se explica algunos ejemplos de cada grupo, su modo de acción y un resumen de su espectro antimicrobiano.

Las drogas que atacan la pared bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis. Interfieren con la síntesis de peptidoglicanos, elementos esenciales de la constitución de la pared, ocasionando la lisis bacteriana. Los agentes activos en la membrana celular bacteriana son las polimixinas (polimixina B y colistina). Estas drogas son péptidos catiónicos con actividad de tipo detergente que disrumen la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas. (DOUGLAS, M. y BENNETTS, 2000)

Los agentes que actúan a nivel de los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción son diversos, dentro de sus acciones están: impedir la síntesis de las cadenas de ADN por inhibición de una topoisomerasa, la girasa de ADN, impidiendo su reparación o la lectura codónica ADN-ARN mensajero. (DOUGLAS, M. y BENNETTS, 2000)

Existen diversos blancos que son impactados por los diferentes agentes antiinfecciosos. Los aminoglucósidos y aminociclitoles actúan a nivel de la porción 30S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la información aportada por el ARN mensajero. De esta manera, la proteína que se sintetice contendrá errores y no será útil. También son capaces de inducir alteraciones de las membranas. (LUCENA, MI., et al., 1995).

Tabla 5. Clasificación química de los antibióticos y modo de acción

Grupo	Miembros	Modo de acción	Espectro
Beta lactámicos: Penicilinas	Penicilina G	inhiben síntesis de pared	Bacterias Gram positivas
Beta lactámicos: Cefalosporinas	Cefaloridina	Inhiben síntesis de pared	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
Beta lactámicos: Inhibidores de la Betalactamasa	Ácido clavulánico	Se une a la beta lactamasa inactivándola	Gérmes productores de beta lactamasa
Beta lactámicos: Carbapenems	Imipenem-cilastatina	Inhiben síntesis de pared	Gram positivas y Gram negativas, aerobios y anaerobios
Beta lactámicos:	Aztreonam	Ídem	Gram negativos aerobios
Monobactams Aminoglucósidos	Estreptomina	Inhiben síntesis proteica porción 30 S ribosomal	Bacterias Gram negativos
Aminociclitolos	Espectinomina	Ídem	Bacterias Gram negativos y micoplasmas
Azúcares complejos o Lincosamidas	Lincomicina	Inhiben síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias Gram positivos, anaerobios y micoplasmas
Rifamicinas	Rifampicina	Inhibe ARN polimerasa	Bacterias Gram positivas micobacterias
Péptidos	Polimixina B	Desorganizan membrana	Pseudomonas aeruginosa
Glucopéptidos	Vancomicina	Inhibe síntesis de pared	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
Estreptogramina	Virginamicina	Inhibe peptidil transferasa	Bacterias Gram positivas aerobias y anaerobias
Macrólidos	Eritromicina	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
Fenicoles	Cloranfenicol	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias Gram positivas y Gram negativas, rickettsias y chlamydias
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Inhibe síntesis proteica porción 30S ribosomal	Bacterias Gram positivas y Gram negativas, rickettsias, chlamydias y algunos protozoos
Sulfonamidas	Sulfanilamida	Interfieren síntesis de ácido fólico	Bacterias Gram positivas y Gram negativas y coccidios
Diaminopirimidina	Trimetoprima	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Bacterias Gram positivas y Gram negativas aerobias
Fluoroquinolonas	Enrofloxacin	Inhiben ADN girasa	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
Ionóforos	Monensina	Alteran flujo de membrana	Coccidiosis, promoción del crecimiento
Nitrofuranos	Nitrofurazona	Previenen traslación ARN mensajero	Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Fuente. SANDE, M. A., MANDEL, (1993).

2.5.1 Mecanismo de acción de la estreptomina. La estreptomina es un antibiótico que hace parte de los aminoglucósidos, sustancias químicas que contienen aminoazúcares ligados a un anillo de aminociclitol por intermedio de enlaces glucosídicos. Los aminoazúcares, son la base química que confiere las diferentes características farmacocinéticas y farmacodinámicas a cada uno de sus componentes (CORTOPASSI, G, HUTCHIN, T., 1994).

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas, su efecto es dependiente de su concentración. Luego de penetrar en el interior bacteriano por un mecanismo de transporte activo, actúan ligándose a las subunidades 30S y 50S del ribosoma bacteriano y de esta manera inhiben la síntesis proteica mediante tres mecanismos de acción, por bloqueo del inicio de la síntesis proteica, bloqueo prematuro de la traducción con la separación del complejo ribosómico 30S - 50S y la consecuente producción de polipéptidos incompletos, e incorporación de aminoácidos incorrectos con la consecuente producción de polipéptidos anormales. (DELGADO, A., 1990)

Con los aminoglucósidos, es con los que se ha descrito de mejor manera el efecto postantibiótico, que se define como la supresión del crecimiento bacteriano luego de la exposición de los microorganismos al agente antibacteriano, a pesar de que la concentración del antibiótico haya descendido por debajo de la Concentración Inhibitoria Mínima del mismo (IMC). (TTGER EC., 1994)

El mecanismo de acción de la estreptomicina contempla de manera inicial la entrada de las moléculas del antibiótico a la bacteria a través de pequeñas imperfecciones de la membrana en crecimiento para que así la estreptomicina se una al ARNr 16S de la subunidad 30S. Allí provoca errores en la lectura del ARNm, distorsionando la estructura del ribosoma. Así, los codones del ARNm se emparejan con ARNt cargados "erróneos", en los que sólo dos de las tres bases del anticodón corresponden correctamente con las del codón. Es entonces cuando la bacteria comienza a sintetizar proteínas defectuosas; algunas de ellas son proteínas de membrana, que al incorporarse a la bicapa lipídica, introducen imperfecciones en su funcionamiento y estructura. Se van formando cada vez más "canales", correspondientes a defectos en esa membrana; a través de los nuevos "canales" e imperfecciones de la membrana, entran cada vez más moléculas del antibiótico con lo cual todo el proceso se acelera y retroalimenta positivamente, de modo autocatalítico. El efecto final es bactericida, ya que finalmente se detiene la síntesis de la proteína, produciendo entre otros daños irreversibles a las membranas (BEGG, E., 1995).

2.6 SITUACIÓN DE LA APICULTURA EN NARIÑO

La apicultura en Nariño ha adquirido un relativo crecimiento durante los últimos años, no obstante el carácter artesanal y la dispersión de los apiarios. Aunque existen estudios entomológicos desarrollados por instituciones como la Universidad de Nariño y CORPOICA, no se conocen investigaciones sobre la actividad apícola y caracterización fisicoquímica de los productos que de ellas se obtienen desde una perspectiva económica y científica. Hasta hace algunos años se impulsaron programas de fomento por parte de la Federación Nacional de Cafeteros en las zonas productoras del grano, en el marco de políticas de diversificación y sustitución de cultivos. Intentos similares han tenido lugar en torno a los cultivos de fique (GOMEZ, L. y OJEDA, C., 2002). La apicultura es una

actividad que proporciona ingresos complementarios a más de mil familias en toda la geografía del departamento. Se trata, no obstante, de una actividad mucho más rentable que los cultivos de café y fique.

Se han podido obtener algunos datos fragmentarios sobre el número de familias vinculadas a este tipo de actividad en la zona norte del departamento: en San José de Albán, se encuentran vinculadas unas treinta familias, un número similar en San Bernardo, cincuenta aproximadamente en la Unión. En general, se produce miel de abejas en toda la zona cafetera y fiquera del departamento (treinta municipios). Se desconocen datos sobre la producción en la Costa Pacífica. Una familia vinculada a la actividad apícola posee entre diez y cincuenta colmenas. Algunos logran una significativa producción de miel al inicio de cada estación (floración), es decir, dos veces al año (GOMEZ, L. y OJEDA, C., 2002).

El rendimiento depende de factores como: cantidad de abejas del enjambre, recursos alimentarios existentes en la zona, medios técnicos utilizados, etc. Un enjambre está constituido, en promedio por 25 kilogramos de abejas, su reproducción es mayor en climas cálidos. Sin embargo, el nivel de producción no depende del clima sino del tipo de floración.

Por lo general, las abejas extraen el néctar de flores ornamentales y trébol como también de la floración de café y fique. Cabe resaltar que la bibliografía se limita a reportar información referente a la producción de miel como principal producto de la colmena, más no existen datos reales del manejo del propóleo y otros productos de la colmena por parte de los apicultores de Nariño.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

3.1.1 Áreas de estudio. Se analizó las muestras de propóleos provenientes de diferentes zonas apícolas del departamento de Nariño como Buesaco, La Unión y La Granja Experimental Botana de la Universidad de Nariño demarcadas por el recuadro en la figura 17.

Figura 17. Áreas de estudio



Según datos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) del departamento de Nariño cada uno de los lugares de recolección cuenta con los indicadores climatológicos descritos en la tabla siguiente.

Tabla 6. Indicadores Climatológicos de las zonas de muestreo.

Zona Geográfica	Altura (msnm)	T (°C)	Piso Térmico	Humedad (%)	Precipitación (mm)	Zona de vida
Buesaco	1959	18	Templado	60	1400	Bosque húmedo premontano (<i>bh-PM</i>)
Granja Botana	2534	13	Frio	40	Mayor a 500	Bosque húmedo montano bajo (<i>bh-MB</i>).
La Unión	1726	19	Caliente	80	2199	Bosque muy húmedo premontano (<i>bmh-PM</i>)

3.1.2 Obtención de muestras. En las diferentes zonas de muestreo se implementó un diseño puntual con tres niveles de tratamiento y tres repeticiones.

La recolección de las muestras se realizó entre los meses de febrero y junio del año 2007, por el método artesanal de raspado utilizando espátulas de acero inoxidable para remover el producto adherido en las caras laterales, tapa, entretapa y alzas de cada cajón. El muestreo de las diferentes colmenas de cada predio se efectuó en forma aleatoria, para formar una muestra compuesta de cada zona de muestreo.

Se colocaron las muestras en envases oscuros de polietileno con cierre hermético y se trasladaron al laboratorio, donde se almacenaron a -10°C, hasta efectuar los análisis.

Figura 18. Método artesanal de raspado. SALAMANCA, G., (2002).



3.1.3 Análisis físico-químico preliminar. Como parámetros iniciales se registró el peso, aspecto, textura, color, olor, sabor e impurezas visibles. El punto de fusión de la resina propólica se determinó por el método del Tubo de Thiele y el pH de cada una de las muestras del extracto etanólico por el método potenciométrico. Adicionalmente se evaluó los siguientes parámetros físico-químicos: sólidos fijos, sólidos volátiles, contenido de impurezas y masas mecánicas, índice de oxidación, cera, resinas, acidez y fenoles totales. (Ver anexo C)

3.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES

Un gramo de propóleo crudo se extrajo con 25 mL de etanol al 95% (V/V) por 24 horas a 37°C, el filtrado se ajustó a 25 mL con etanol al 80% (V/V) y se guardó en un recipiente ámbar.

3.2.1 Método Colorimétrico de Cloruro de Aluminio. El método colorimétrico de cloruro de aluminio se modificó de la procedencia reportada por WOISKY, R. y SALATINO, A. (1998). Dentro de ello, se incrementó la concentración del EEP, reduciendo la masa de resina propólica y el volumen de aforo al 50%.

Las flavonas y flavonoles presentes en los propóleos se expresaron como equivalentes de Quercetina. La Quercetina se empleó para construir la curva de calibración, se prepararon soluciones estándar de 12.5, 25, 50, 80 y 100 µg/ mL en etanol al 80% (V/V). Se tomó 0.5 mL de las soluciones estándar o EEP y se mezclaron con 1.5 mL de etanol al 95% (V/V), 0.1 mL de cloruro de aluminio (P/V), 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de etanol al 80%. El volumen de cloruro de aluminio al 10% (P/V) se sustituyó por el mismo volumen en agua destilada para el blanco. Luego de la incubación a temperatura ambiente por 30 minutos, se leyó la absorbancia de la reacción a 415nm con un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 11.

3.2.2 Método Colorimétrico de la 2,4-dinitrofenilhidracina. Del mismo modo que el proceso anterior, el método empleado se modificó de la procedencia descrita por NAGY, M. y GRANCAI, D. (1996)

Las flavanonas en los propóleos se expresarán como (±) equivalentes a Naringenina. La (±) Naringenina se empleó para realizar la curva de calibración. Se preparó soluciones estándar de 0.25, 0.30, 0.50, 1.00 y 2.00 mg/mL en metanol. Un mL de la solución estándar o EEP se mezcló con 2 mL de 2,4-dinitrofenilhidracina al 1% (P/V) y 2 mL de metanol a 50 °C por 50 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente, esta solución se mezcló con 5 mL de hidróxido de potasio al 1% (P/V) en metanol al 70% (V/V) y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente se tomó 1 mL de la solución, se mezcló con 5 mL de metanol y se filtró, llevando a 25 mL. La absorbancia del filtrado se midió a 495 nm.

3.3 ANÁLISIS DE MINERALES

Los minerales determinados por espectrofotometría de absorción atómica fueron Ca, K, Ni, Zn, Na, Mn, Fe, Mg, Cu.

Se realizó una pre-digestión de 0,5 g de la resina propólica en 6 mL de ácido nítrico concentrado durante 24 horas, con el fin de destruir la mayor cantidad de materia orgánica. Se llevó a calentamiento hasta la desaparición de los vapores nitrosos producto de la digestión, para luego adicionar en frío 5 mL de ácido perclórico. Se continuó con el calentamiento hasta el desprendimiento de vapores blancos y la transparencia del extracto ácido. Se filtró y se aforó a 50 mL con agua de-ionizada. La lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN- ELMER bajo las condiciones descritas en el anexo D.

3.4 ANÁLISIS POR HPLC/MS

Las muestras fueron diluidas volumétricamente con un factor 1/10, posteriormente fueron filtradas y un volumen de 10 µl fue inyectado en un sistema de cromatografía líquida (HPLC – Agilent 1200) acoplado a un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo simple (Agilent - G1956A) con una interfase de ionización a Presión Atmosférica tipo Electrospray (API-ESI).

Las condiciones cromatográficas fueron: Columna C18 de 250 mm x 4.6 mm ID x 5µm; fase móvil: metanol/agua 0.1% ácido fórmico; flujo 0.8 mL/min; detección DAD; temperatura 25°C Las condiciones de ionización fueron: Polaridad positiva; Voltaje del capilar: 4000V; voltaje CID: 120V; temperatura del gas de secado: 350°C; flujo del gas de secado: 13 L/h.

Los datos fueron analizados en el software ChemStation Rev 02.01-SR1. Los estándares (naringenina, quercetina, crisina y galangina) fueron inyectados a una concentración nominal de 100 µg/mL y corridos bajo las mismas condiciones de las muestras.

3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La actividad antibacteriana de los EEP se estimó mediante el método de difusión registrado por la FARMACOPEA AMERICANA (USP 24). Las pruebas se desarrollaron sobre bacterias Gram positivas del género *Streptococcus*, y bacterias Gram negativas del género *Escherichiae*, las cuales fueron cultivadas en agar tripticasa de soya bajo condiciones aeróbicas por 18 horas a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. La inoculación se preparó por lavado de una o dos colonias empleando 5 mL de solución fisiológica estéril para una concentración de células bacterianas de aproximadamente de 10^6 UFC/mL. La densidad de las células bacterianas se midió con la solución estándar McFarland's. (INSTITUTO NACIONAL DE SALUD).

Preparación del inóculo bacteriano: Se obtuvieron 2 cultivos puros de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se incubaron a 37°C durante 24 horas, cada cultivo se resembró diariamente en medio de cultivo agar tripticasa de soya.

Preparación del medio de cultivo: El medio de cultivo se mezcló e hirvió durante 15 minutos. Se esterilizó en autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15 minutos. Se agregó en placas estándar de 91mm (20mL c/u); y se obtuvo un grosor homogéneo de aproximadamente 4mm. Las placas se llevaron a 37°C en incubadora durante 30 a 60 minutos con la finalidad de eliminar la humedad de la superficie de la placa.

3.5.1 Método de Kirby-Bauer. Se utilizó discos de 4mm de diámetro de papel de filtro Whatman N° 2 que se esterilizaron en autoclave a 121°C con 15Lb de presión durante 15 minutos y luego se conservaron en frascos cerrados. Se empapó los discos en el EEP de manera aséptica, luego estos fueron usados en la Prueba de Antibiosis según el método de Kirby-Bauer.

Para la inoculación de las placas se realizó la suspensión del microorganismo de densidad óptica entre 0,13 y 0,15 leída a 580nm en suero fisiológico. Se tomó 1mL de suspensión y se vertió en placas estériles (91 mm de diámetro); se distribuyó en toda la placa y el exceso de la suspensión se retiró. Se incubó por 2 horas a 37°C. Se aplicaron en placas separadas los discos de antibióticos control y los discos de EEP, previamente marcados y equidistantes en la superficie de las placas incubadas. El crecimiento del organismo y la difusión del antibiótico se estimaron de acuerdo al tamaño de las zonas de inhibición alrededor de los discos.

En cada una de las metodologías propuestas como prueba de sensibilidad antibiótica, las cajas se incubaron en cámara húmeda a 37°C para luego registrar los halos de inhibición a las 12, 24, 26, 48 y 72 horas de incubadas. El mismo procedimiento fue aplicado a un control de etanol al 80%. El sulfato de estreptomina se empleó como sustancia antibacteriana de referencia. La solución de concentración 10 mg/mL fue preparada a partir de la solución estándar de sulfato de estreptomina (0.1% P/V) en agua destilada estéril con buffer de fosfatos pH 8.

3.5.2 Método de difusión por pozos. Un mililitro del inóculo se agregó a 20 mL de agar Muller-Hinton a una temperatura de 48- 50°C. Se preparó cultivos en cajas petri con agar en dos capas, la segunda de ellas con 30 mL de medio inoculado con 1mL de suspensión del microorganismo en solución salina de densidad óptica entre 0.13 y 0.15 leída a 580 nm. Para determinar el halo de inhibición se incluyó 3 cilindros de acero inoxidable de diámetro 6mm por cada placa de Agar, al solidificarse el medio los cilindros se retiraron, en los pozos creados se depositó 50µL de EEP.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO PRELIMINAR

El estudio se realizó en tres municipios del departamento de Nariño: Granja Experimental Botana de la Universidad de Nariño (zona rural de Pasto), Buesaco y La Unión, en razón a las diferencias geográficas y climatológicas de cada zona. Los factores mencionados en la tabla 6 son parámetros determinantes para la actividad productiva del propóleo por parte de las abejas pertenecientes al género *Apis mellifera*. De acuerdo con trabajos realizados en nuestro país, (SALAMANCA, G. et al., 2000) se registra una mayor actividad en días con alta precipitación, pocas horas de brillo solar, baja evaporación, relativamente fríos y con alta humedad relativa, es por ello que las muestras se seleccionaron en dichas zonas y en las fechas determinadas.

4.1.1 Características Organolépticas. Las características organolépticas de los propóleos de las tres zonas de muestreo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Características organolépticas de los propóleos recolectados

Muestra	Color	Olor	Sabor	Textura	Aspecto
Bco. 1	Marrón-Verde	Resinoso aromático	Astringente	Maleable	Plástico, pegajoso, opaco
Bco. 2	Marrón-Verde	Resinoso aromático	Dulce	Maleable	Plástico, pegajoso, opaco
Bco.3	Marrón	Resinoso aromático	Astringente	Maleable	Plástico, pegajoso, brillante
G.Unar 1	Marrón	Resinoso	Astringente	Terroso	Plástico, pegajoso, opaco
G.Unar 2	Marrón	Resinoso	Astringente	Terroso	Plástico, pegajoso, opaco
G.Unar 3	Marrón	Resinoso	Astringente	Terroso	Plástico, pegajoso
Unión 1	Marrón-Verde	Resinoso aromático	Astringente	Maleable	Pegajoso
Unión 2	Marrón-Verde	Resinoso aromático	Astringente	Maleable	Pegajoso
Unión 3	Marrón-Verde	Resinoso aromático	Astringente	Maleable	Pegajoso

Bco.: Buesaco, G.Unar: Granja Universidad de Nariño

Las características de las muestras colectadas en las tres zonas biogeográficas permiten diferenciarlos, ya que son propias para cada zona y dependen principalmente de su origen floral y biogeográfico, viéndose influenciadas por las condiciones de manejo. Por tal motivo, el muestreo se llevó a cabo en los apiarios de los municipios en mención, ubicados estratégicamente en las zonas rurales con alta floración y zonas de cultivos de frutales.

En una fase inicial se determinaron las características sensoriales propias para el propóleo según su origen biogeográfico, encontrando que la variación del color se establece en relación con el tiempo de maduración o conservación dentro de la colmena, así como también a la naturaleza química de los exudados florales, no obstante no se manifiesta una variación apreciable respecto a la zona de recolección. La coloración predominante es generalmente marrón o con una leve tonalidad verdosa para los tres tratamientos analizados. Es así como las coloraciones amarillas, marfiles o marrón pueden ser debidas a la presencia de flavonoles, flavonas, chalconas, flavononas e isoflavononas. Sin embargo, se ha observado que muchos de estos compuestos carecen de color en estado natural pero pueden convertirse en compuestos coloreados bajo determinadas condiciones en la manipulación y procesado durante el estudio de los distintos vegetales.

Los flavonoles (kaempferol, quercitina y mirecitina) contribuyen al color verde mientras que las flavonas y los flavonoles no intervienen claramente en las coloraciones de las plantas, al menos que estén presentes en altas concentraciones. Además, de forma general, los polifenoles pueden quelar metales modificando la coloración natural de los alimentos de manera que los quelatos de hierro son los responsables de coloraciones que van desde azules a negras, mientras que los quelatos de aluminio proporcionan coloraciones amarillo brillante o marrones.

Se encontró que los propóleos analizados presentaron un sabor astringente a dulce para el propóleo húmedo y seco como se indica en la tabla 7. En consonancia con los resultados obtenidos por MARTINEZ I., (2009), éste índice organoléptico se puede atribuir a los compuestos fenólicos quienes determinan la calidad de los alimentos de origen vegetal, y en concreto a los taninos condensados o proantocianidinas que se asocian con la astringencia de las resinas antes de la maduración, aunque la intensidad de estas sensaciones depende del peso molecular del compuesto presente en la planta, observándose que sólo los taninos con un peso molecular entre 500 y 3000, pueden desarrollar una sensación de astringencia.

De acuerdo con SALAMANCA, G., et al, (2000) actualmente se tiene una clasificación que utiliza nueve factores olorantes: fragante (salicilato de metilo), quemado (guayacol), caprílico (etil, disulfuro), etéreo (1-propanol), dulzaino (vainilla), rancio (ácido butírico), oleoso (heptanol), metálico (hexanol), resinoso

aromático o a especias (benzaldehído). Comparando lo anterior con el aroma encontrando en las muestras recolectadas de las tres zonas, resulta ser característico respecto a la flora presente en cada área, presentando aroma resinoso-aromático característico de las resinas vegetales posiblemente asociado a los compuestos orgánicos responsables de los olores como los ésteres, ácidos y aldehídos volátiles transmitidos por acción del aire.

En la siguiente tabla se enuncian algunos ejemplos de las especies florales, típicas para cada zona de vida.

Tabla 8. Floración característica de acuerdo a la zona de vida

Zona de muestreo	Zona de vida	Flora abundante	
		Nombre Científico	Nombre Común
Buesaco	Bosque húmedo premontano (<i>bh-PM</i>)	Alsophila elongata Clidemia capitellata Dioclea serícea Epidendrum xanthinum Heliocarpus popayanensis Nectandra sp. Eryobotrya japónica	Helecho Mortiño Frijolito Orquídea Balso blanco Laurel Níspero
Granja Botana	Bosque húmedo montano bajo (<i>bh-MB</i>).	Alnus jorullensis Myrcianthes Leucoxila Cupressus Lusitánica Juglans neotrópica Podocarpus Rospigliosii Salix Humboldtiana Eucalyptus Globulos Sapium Lamalcense Cupania sp.	Aliso Arrayán Ciprés Nogal Pino colombiano Sauce Eucalipto Chilco Laurel
La Unión	Bosque muy húmedo premontano (<i>bmh-PM</i>)	Cordia alliadora Persea caerulea Ricinus communis Tabebuia chrysantha Tabebuia rosea Ochoroma lagopus Erithrina edulis	Nogal Aguacatillo Higuerrillo Guayacan amarillo Guayacan rosado Balso Chachafruto

Fuente: IDEAM, 2009

Estudios anteriores como los de IORISH, N. (1975) se demuestra que el propóleo al ser una resina posee una textura maleable blanda que logra ser modificada en función de la humedad presente en las muestras, así cuanto más baja sea la humedad, la textura de las mismas se torna ligeramente dura; este particular se observa en el comportamiento de los propóleos analizados, cuyo grado textural es de apariencia plástica pegajosa con variantes opacas y brillantes en virtud de su

composición parafínica u oleosa. Sin embargo, las muestras presentan una consistencia blanda a temperatura ambiente y dura a bajas temperaturas, ya que normalmente se endurecen por la acción del aire convirtiéndose en sólidos de aspecto amorfo y brillante. El carácter terroso de las muestras colectadas en la granja Botana de la Universidad de Nariño es ocasionado por el proceso de conglomeración de los sólidos a medida que la fracción húmeda de la muestra decrece.

4.1.2 Análisis Físico-químico. En las tablas 9 y 10 se especifica el valor medio de los parámetros fisicoquímicos evaluados para cada uno de los tratamientos de las zonas de muestreo.

Tabla 9. Puntos de fusión, porcentaje de sólidos, pH y acidez de los EEP

Origen	n	P. F. (°C)	S. F. (%)	S. V. (%)	pH	Acidez
Bco.	9	63	72,7 ± 6,6	99,19 ± 0,27	4,2 ± 0,13	6,6 ± 2,36
G. Unar	9	59	62,0 ± 3,1	98,34 ± 0,33	4,4 ± 0,11	9,1 ± 1,26
Unión	9	65	74,1 ± 6,9	99,26 ± 0,11	4,2 ± 0,07	16,4 ± 0,32
Total	27	62	69,6 ± 5,5	98,93 ± 0,49	4,3 ± 0,10	10,7 ± 1,31

Resultados presentados como contenido ± S.D (n=9)

P. F.: Punto de fusión

S. F.: Sólidos fijos

S. V.: Sólidos volátiles

Acidez expresada como g tartrato/100mL de EEP

Tabla 10. Parámetros de calidad de los propóleos

Origen	n	Cenizas (%)	Resinas (%)	Cera (%)	M.M.(%)
Bco.	9	0,81 ± 0,27	60,33 ± 7,36	10,05 ± 0,70	27,29 ± 6,62
G. Unar	9	1,70 ± 0,33	50,17 ± 2,56	11,68 ± 3,36	38,05 ± 3,10
Unión	9	0,74 ± 0,11	54,80 ± 7,54	19,04 ± 1,99	29,02 ± 6,20
Total	27	1,07 ± 0,50	55,10 ± 7,36	13,59 ± 2,02	31,45 ± 5,31

Resultados presentados como contenido ± S.D (n=9)

M.M. (%): Porcentaje de Masas Mecánicas

Punto de fusión

El propóleo no tiene un punto de fusión propio, por ser una mezcla de compuestos cuyos puntos de fusión difieren entre sí; es por ello, que no se busca determinar el verdadero punto de fusión, es decir, el grado de temperatura en la cual la resina pasa a un estado fluido, sino la temperatura a la cual el propóleo abandona el estado sólido.

De acuerdo con la tabla 9, el valor medio de la temperatura de fusión obtenido para el municipio de Buesaco fue de 63°C, para La Granja Botana 59°C y 65°C para La Unión. Las temperaturas de fusión se encuentran cercanos al intervalo 60 a 100°C, establecidos como el rango más frecuente en la bibliografía. (BIANCHI, 1996)

Los valores registrados para el punto de fusión muestran una variación en función de la temperatura y altura del lugar de muestreo, a medida que la altura de la zona aumenta la temperatura disminuye, lo que conlleva a un punto de fusión menor. Este comportamiento puede deberse al efecto covalente de los enlaces intramoleculares, a la naturaleza orgánica de los componentes de la resina propólica, al tipo de grupos funcionales o finalmente al punto de fusión de cada una de las moléculas presentes en la muestra.

Sólidos fijos y sólidos volátiles

Observando los promedios registrados en la tabla 9, no existe una diferencia significativa entre la media de sólidos volátiles totales entre un origen y otro. Referente al contenido de sólidos fijos se deduce una diferencia significativa entre las muestras procedentes de las zonas Buesaco - Granja Botana, y La Unión - Granja Botana; no sucede lo mismo entre las muestras de Buesaco y La Unión, para las que no existen diferencias apreciables entre sus contenidos promedio.

Resinas

Las resinas solubles en etanol permiten establecer la fracción útil del propóleo, siendo el material disuelto en el solvente luego de la extracción del propóleo en bruto. En estas resinas, están contenidos los principios activos responsables de su actividad biológica.

En la zona Buesaco se presenta el mayor porcentaje de resinas respecto a las otras dos zonas, Granja Botana y La Unión (ver tabla 10), esta diferencia se debe probablemente al bajo contenido de masas mecánicas existentes en los propóleos de Buesaco. Lo anterior, en razón a que un mayor contenido de masas mecánicas implica una menor fracción de resinas. La mayor concentración de resinas en los propóleos del municipio de Buesaco permite inferir un mayor porcentaje de compuestos fenólicos, y por ende de principios activos, tal como se expresa en los estudios realizados por HIKMET, G., *et al.*, (2005).

Cera

Comprende la fracción del propóleo que no posee ninguna utilidad práctica, por lo tanto, a mayor porcentaje menor calidad de la resina propólica ya que la presencia de cera resta pureza al propóleo. Se consideran propóleos de calidad aquellos en los cuales el porcentaje de ceras no supera el 30% (MAIDANA, F., 1997). En

general, los valores de contenido de ceras en los propóleos nariñenses, se encuentran dentro de un rango inferior al establecido.

De acuerdo con los análisis y el registro de la tabla 10 se establece que los propóleos evaluados presentan valores adecuados de ceras. Los valores promedio para los propóleos de Buesaco, Granja Botana y La Unión, presentaron un $10.05 \pm 0,70$, $11.68 \pm 3,36$ y $19.04 \pm 1,99\%$, respectivamente. El valor medio de $13.59 \pm 2,02\%$ es ligeramente superior al encontrado en las dos primeras zonas. Sin embargo, los provenientes de la Granja Botana y del municipio de Buesaco manifiestan un contenido similar, lo que lleva a pensar que manifiesten un mayor comportamiento activo en relación a los propóleos del municipio de La Unión.

Masas Mecánicas.

Es un parámetro que permite el reconocimiento de un buen propóleo, ya que permite conocer la cantidad de material no extractable del propóleo. El valor medio del contenido de masas mecánicas (31.45%) es menor al admitido por el reglamento brasileño, 40% (MAIDANA, F., 1997), lo que permite establecer que los propóleos de las tres zonas de estudio son de buena calidad.

Las muestras de la granja experimental de la Universidad de Nariño expresan un mayor contenido promedio del $38.05 \pm 3,10\%$, mientras que las muestras de la Unión presentan valores del $29,02 \pm 6,20\%$ (ver tabla 10). Uno de las causas principales para que el porcentaje de masas mecánicas sea alto puede encontrarse en el proceso de extracción y almacenamiento del propóleo, debido a que es frecuente encontrar que no se cumple favorablemente con los principios de extracción, puesto que el método obtención y recolección de las muestras por raspado genera un propóleo con mayor contenido de masas mecánicas en todas las muestras analizadas.

Adicionalmente, este parámetro es determinante para lograr una mayor proporción de EEP y con ello un extracto de mayor concentración de los principios activos presentes en el propóleo. (WOISKY, R. y SALATINO, A., 1998)

Cenizas. Minerales Totales

La ceniza o fracción mineral total se considera como el producto inorgánico obtenido por la incineración de una sustancia. Esta determinación únicamente sirve para conocer en forma aproximada el contenido mineral, mas no es un indicativo claro del valor o calidad mineral de ella. (WOISKY, R. y SALATINO, A., 1998)

La naturaleza y la calidad de las variadas combinaciones minerales que se encuentran en las resinas propólicas del departamento de Nariño son difíciles de determinar aun cuando el resultado de la incineración del material permite dar una orientación sobre su cantidad aproximada, puesto que en el proceso cambia la

naturaleza de las combinaciones originales debido a la destrucción de la materia orgánica. Este parámetro adicionalmente, por correlación matemática directa da una idea del contenido de sustancia o materia orgánica.

Es recomendable no sobrepasar los 500°C durante la calcinación porque podría desarrollarse un proceso de atomización de los minerales presentes, por el contrario, a bajas temperaturas se puede inducir a errores por la formación de carbonatos y carbono que no pertenecen a la fracción inorgánica que se pretende determinar.

En el análisis gravimétrico, el contenido de minerales totales de los propóleos del departamento de Nariño se expresan en la tabla 10, lo que hace suponer un contenido bajo de los mismos como consecuencia de su alta proporción de materia orgánica, susceptible de descomposición térmica, aunque las muestras propólicas que contienen mayor fracción mineral corresponden a las procedentes de la granja experimental Botana con un $1,70 \pm 0,33\%$ como valor promedio. Así mismo, las muestras de la Unión y Buesaco se encuentran por debajo de este valor, en un índice de $0.74\% \pm 0,11$ y $0.81\% \pm 0,27$ respectivamente.

La evaluación estadística indica que existe una diferencia significativa entre los valores medio de cenizas de un origen y otro. Además se encontró que los propóleos provenientes del municipio de Buesaco y Granja Botana manifiestan diferencias significativas, al igual que las muestras procedentes de la Granja Botana y el municipio de La Unión. Existe una homogeneidad entre los resultados de cenizas para las muestras de Buesaco y La Unión.

Acidez y pH

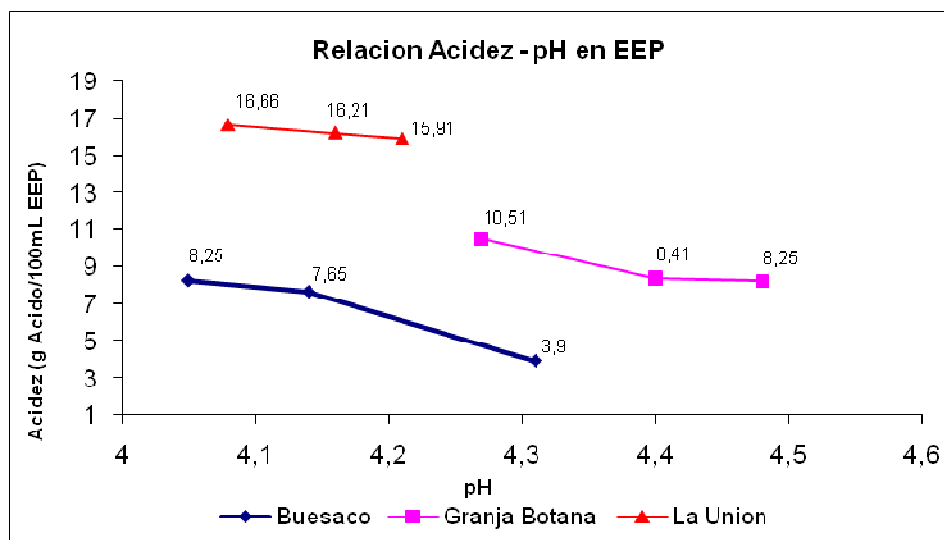
La acidez total está constituida por ácidos orgánicos fijos como el tartárico, málico, láctico y succínico, y por ácidos volátiles como el acético, fórmico, butírico y propiónico. Cabe resaltar que el ácido carbónico es eliminado previo a efectuar la valoración volumétrica con el fin de evitar interferencias que generan inconsistencias analíticas.

En la tabla 9 se representan para los extractos etanólicos de propóleo (EEP) los valores de acidez total expresados como *g Acido tartárico/100mL EEP* que oscilan entre 6,6 a 16,4 y pH entre 4.2 - 4.4. Los EEP de zona templada (Buesaco, *bh-PM*) registraron una acidez de $6,6 \pm 2,36$ con pH $4,2 \pm 0,13$, para la región cálida (La Unión, *bmh-PM*) $16,4 \pm 0,32$ y pH $4,2 \pm 0,07$, mientras que en la región fría (Granja Botana, *bh-MB*) se encontró una acidez de $9,1 \pm 1,26$ con pH $4,4 \pm 0,11$. Los anteriores resultados permiten diferenciar las muestras de propóleo de acuerdo a las condiciones de la colmena. Los altos índices de acidez se deben al proceso de fermentación desarrollado en el interior de la colmena, a los procesos de respiración, así como al factor inhibidor del crecimiento microbiano, ya que el propóleo se caracteriza por cumplir con un sin número de funciones protectoras

dentro de la colmena, conllevando a modificar parámetros como la acidez del medio circundante.

El comportamiento global de cada uno de los grupos de propóleo analizados se muestra en la siguiente figura:

Figura 19. Relación entre pH y acidez de los EEP



Esta figura indica la relación inversa entre la acidez titulable y el pH de la nueve muestras de EEP analizadas para las áreas de estudio. Las curvas muestran que ante un crecimiento de la acidez, el pH decrece en magnitud, en razón a que aumenta la concentración de especies orgánicas de carácter ácido.

Analizando los EEP de las tres zonas es posible deducir que los propóleos del municipio de La Unión manifiestan una mayor acidez en comparación con los provenientes de la Granja Botana y el municipio de Buesaco, aunque para este producto no existe un nivel o parámetro establecido en cuanto a pH y acidez titulable, pues se conoce que la composición química (ácidos fenóles) varía de acuerdo con los exudados florales que las abejas emplean durante su alimentación, las especies vegetales circundantes a la colmena, los ciclos evolutivos de la plantas proveedoras de resinas que condicionan cambios en las concentraciones de elementos de la mismas, factores climatológicos y microorganismos presentes en el entorno geográfico.

Índice de Oxidación

Conforme con el registro de la tabla 11, el rango de valores del índice de oxidación oscila entre los 3,39 y 3,93 segundos, con un promedio general de $3,64 \pm 0,83$

segundos, observando que son valores inferiores al valor máximo de 22 segundos admitidos en los reglamentos internacionales. (MAIDANA, F., 1997)

Al comparar el índice de oxidación de las diferentes zonas de muestreo con el contenido de fenoles, no se puede correlacionar de manera directa, puesto que no solo se ve afectado por la concentración de los compuestos fenólicos que decoloran con mayor rapidez el permanganato de potasio, sino además por el contenido de ácidos no fenólicos insaturados, como el cinámico, y por el conjunto de ácidos grasos insaturados de cadena abierta provenientes del metabolismo de la abeja.

Compuestos Fenólicos

Tabla 11. Contenido de Compuestos Fenólicos e índice de oxidación de los EEP

Muestra	n	Compuestos Fenólicos ^a	Índice de oxidación ^b
Bco.	9	34,0 ± 5,23	3,93 ± 0,80
G.Unar.	9	32,2 ± 6,89	3,60 ± 0,48
Unión	9	37,0 ± 5,11	3,39 ± 1,10
Total	27	34,4 ± 2,42	3,64 ± 0,83

Resultados presentados como contenido ± S.D (n=9)

a: mg de Acido Gálico/g Propóleo

b: Segundos

PALOMINO, L., (2009) afirma que el contenido de compuestos fenólicos (compuestos farmacológicamente activos) en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material, como su potencial de actividad biológica; normatividades de otros países como Argentina y Brasil establecen valores de estos compuestos con el fin de definir requisitos mínimos de calidad (5%, establecido en el reglamento brasileño de calidad de propóleo). Los compuestos fenólicos, entre los cuales se incluyen los flavonoides, representan un índice inequívoco de la calidad del producto final. Cuanto mayor sea el porcentaje de estas fracciones, mayor será también la pureza y calidad del propóleo.

En la tabla 11 se observa el contenido de compuestos fenólicos calculados a partir de la curva de calibración del Anexo X. Este parámetro no varía en gran medida, dentro de un intervalo de 32,2 a 37,0 mg de ácido/g de propóleo. El contenido promedio de compuestos fenólicos encontrado en los EEP del municipio de La Unión es de 37,0±5,11, superior a las otras dos zonas (Buesaco 34,0±5,23 y Granja Botana 32,2±6,89). Sin embargo, los extractos etanólicos de las tres zonas analizadas presentan valores apreciablemente altos en el contenido de compuestos fenólicos, en comparación con propóleos de otras regiones o nacionalidades como Argentina y Brasil (MAIDANA, F., 1997). Estos valores

cumplen con la normatividad vigente en Brasil y Argentina que establecen valores mínimos para fenoles de 50 mg/g.

El pequeño margen de diferencia que se presenta se justifica en virtud a las condiciones climáticas de cada zona de vida, al tipo de vegetación y a la composición de las especies botánicas que las abejas utilizan como fuente de resinas correspondientes a compuestos del tipo flavonoide y compuestos fenólicos residentes en los EEP.

4.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES

4.2.1 Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio. La cuantificación del contenido de flavonas y flavonoles en los EEP se basó en la intensidad del color amarillo presente en el medio reactivo, indicando la posible existencia de los flavonoides tipo 3-hidroxiflavonas y 3-glicosidoxiflavonas, 5-hidroxiflavonas y 5-hidroxiflavonoles, quienes forman un complejo estable con el ión aluminio conforme se muestra en la secuencia de reacciones de las figuras 20 y 21. (NAGY, M., GRANCAI, D., 1996)

Figura 20. Formación y estabilización por resonancia de complejos de flavonas con iones de aluminio. (NAGY, M., GRANCAI, D., 1996)

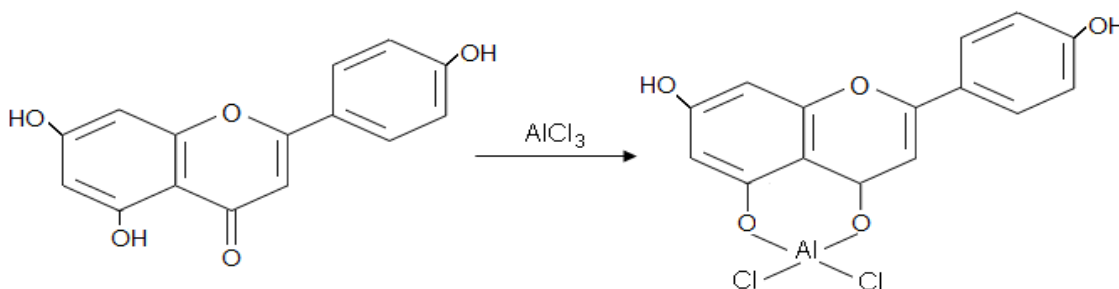
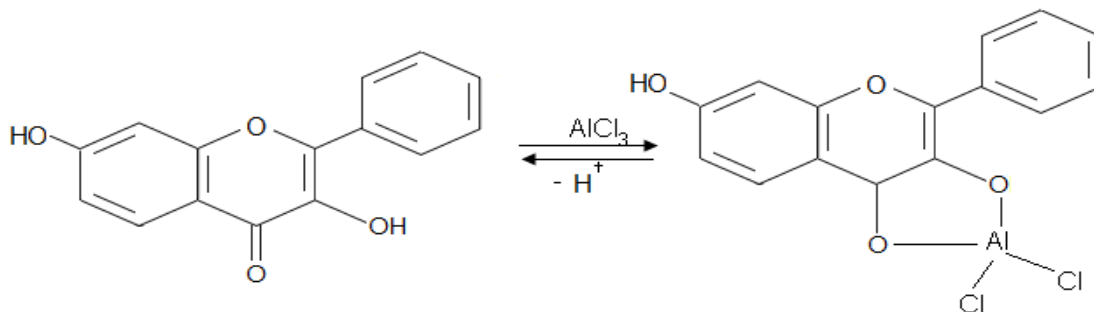


Figura 21. Formación y estabilización por resonancia de complejos de flavonoles 3-hidroxilados con iones de aluminio. (NAGY, M., GRANCAI, D., 1996)



4.2.2 Método colorimétrico de la 2,4 Dinitrofenilhidrazina. El reactivo 2,4-Dinitrofenilhidracina (2,4D) es específico para grupos carbonilo presentes en flavanonas conjugándose al doble enlace del grupo carbonilo para formar un complejo como se muestra en la reacción de la figura 22.

Para los EEP analizados se observó la formación de dicho complejo por medio de una reacción de precipitación, cuyo producto solubilizado en el medio reactivo desarrolló una intensidad de color proporcional a la concentración de flavonoides (NAGY, M., GRANCAI, D., 1996).

Figura 22. Secuencia de la reacción entre 2,4D y las flavanonas presentes en propóleos. (NAGY, M., GRANCAI, D., 1996)

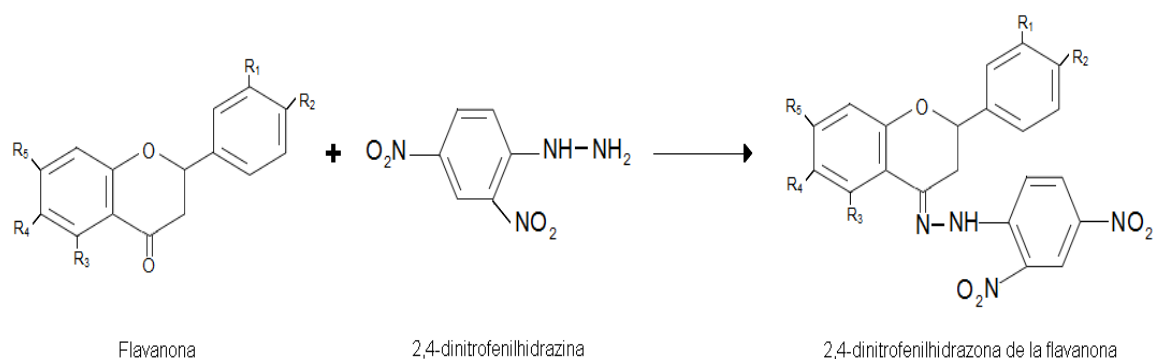


Tabla 12. Contenido de flavonoides en EEP determinados por los dos métodos colorimétricos

Muestra	Contenido de flavonoides (%) ^a		
	AlCl ₃ ^b	2,4-D ^c	Total
Bco. 1	15,36 ± 0,41	46,04 ± 0,59	61,40
Bco. 2	21,64 ± 0,48	29,41 ± 0,59	51,05
Bco. 3	16,66 ± 0,33	35,83 ± 0,50	52,48
G.Unar.1	7,27 ± 0,16	30,97 ± 0,20	38,24
G.Unar. 2	7,29 ± 0,06	34,15 ± 0,28	41,44
G.Unar. 3	8,10 ± 0,23	22,10 ± 0,38	30,20
Unión 1	16,01 ± 0,42	48,06 ± 0,68	64,11
Unión 2	17,44 ± 0,09	51,97 ± 0,76	69,41
Unión 3	19,25 ± 0,09	54,45 ± 0,20	73,69

a: Resultados presentados como contenido ± S.D (n=9)

b: Contenido de flavonoides (%) = equivalente de Quercetina (µg/mL)* Volumen total EEP (mL)/peso muestra (g)*factor dilución*10⁻⁶ (g/µg)*100

c: Contenido de flavonoides (%) = equivalente de Naringenina (µg/mL)* Volumen total EEP (mL)/peso muestra (g)*factor dilución*10⁻⁶ (g/µg)*100

Como se puede observar en la tabla 12, los flavonoides fueron determinados por dos métodos colorimétricos independientes, uno para la determinación de flavonas y flavonoles, y el otro para la determinación de flavanonas (CHANG, C., et al., 2002; SALAMANCA, et al., 2000). En las tres muestras de propóleo provenientes de Buesaco, el nivel de flavonas y flavonoles varió del 15,36 al 21,64%, mientras que las flavanonas están entre un 29,41 y 46,04%, para un contenido total de flavonoides de 51,05 al 61,40%

Los propóleos extraídos de las colmenas de la Granja Botana de la Universidad de Nariño contienen entre 7,27 y 8,10% de flavonas y flavonoles, y un 22,10 a 34,15% de flavanonas, reflejando un total de flavonoides entre 30,20 y 41,44%.

La concentración de flavonoides estimada en las muestras provenientes de la Unión está en un intervalo de 64,11 y 73,69%, de los cuales un 16,05 al 19,25% corresponden a flavonas y flavonoles, mientras que del 48,06 al 54,45% se relacionan al contenido de flavanonas.

El contenido de flavonoides en las muestras analizadas siguiendo el método espectrofotométrico del cloruro de aluminio, en general fue más bajo para flavonas y flavonoles, respecto de los observados en la determinación de flavanonas con la técnica de la 2,4 -Dinitrofenilhidrazina, tal como se muestra en la tabla 12.

Los valores observados en las muestras de propóleo del departamento de Nariño, revelan que la fracción constituida por flavonas y flavonoles expresados como equivalentes de Quercetina son significativamente menores en relación a los equivalentes de Naringenina que cuantifican las flavanonas de los propóleos de las regiones analizadas.

La determinación de flavonas, flavonoles, y flavanonas en las muestras de EEP evidenciaron que seis de las nueve muestras (70%) contienen más del 15% de flavonas y flavonoles (desde el 15,36 al 21,64%). Sin embargo, tres de las muestras analizadas contienen menos del 10% de flavonas y flavonoles (del 7,27 al 8,10%), lo anterior se atribuye a la presencia en el extracto etanólico de metabolitos secundarios diferentes a los de naturaleza fenólica. El contenido de flavanonas en las muestras de propóleo varía considerablemente (del 22,10 al 54,45%). El total de las muestras propólicas (100%) contienen más del 20% de flavanonas, la mayoría de las muestras se encuentran dentro de un espectro comprendido entre el 20 y el 40% y de forma particular dos muestras procedentes del municipio de La Unión tienen una alta concentración de flavanonas (51,97% y 54,45%). Un hecho contrario se encuentra consignado en los reportes analíticos de los estudios realizados CHANG, C. et al., (2002), en propóleos procedentes de Brasil, Inglaterra, Austria, Taiwan, China y Nueva Zelanda, para los cuales el contenido de flavonoides totales no superan el 24,91%±0,35. De forma similar, se han encontrado índices por debajo de 22,3%±5,45 para la muestra de propóleo colombiano analizados por SALAMANCA, G., (2002).

4.3 ANÁLISIS DE MINERALES POR AA

Los minerales en conjunto son responsables del valor nutricional o agentes que contribuyen al comportamiento bioactivo de los propóleos y podrían ser empleados como guía para establecer el origen geográfico.

Tabla 13. Contenido mineral de los propóleos de las áreas de estudio

CONCENTRACIÓN (ppm)	Mineral	Origen*			Promedio
		Bco.	G. Unar.	Unión	
	K	1529,84 ± 294,35	1988,87 ± 631,86	1831,90 ± 345,51	1786,64 ± 423,91
	Na	436,14 ± 154,63	340,46 ± 25,83	431,10 ± 77,69	399,80 ± 86,05
	Ca	66,32 ± 21,18	1298,70 ± 909,32	2049,05 ± 950,65	1138,02 ± 627,05
	Mg	47,25 ± 12,91	359,64 ± 43,29	763,59 ± 169,17	390,16 ± 75,12
	Fe	312,24 ± 59,75	356,52 ± 57,87	101,92 ± 10,40	256,89 ± 42,67
	Cu	ND	ND	ND	ND
	Mn	11,57 ± 4,35	91,16 ± 18,55	5,64 ± 0,26	32,12 ± 7,72
	Zn	72,85 ± 8,01	109,07 ± 32,52	34,94 ± 10,96	72,29 ± 20,27
	Ni	ND	1,61 ± 1,27	ND	1,61 ± 1,27

*Resultados presentados como contenido ± S.D (n=9)

ND = No Detectable

La información aportada en la tabla 13 revela que las muestras de la zona de *bmh-PM* (La Unión) registran un alto contenido mineral en comparación con las muestras de las otras zonas, siendo en su orden el calcio, potasio y sodio los elementos más representativos respecto al valor promedio del total de las muestras analizadas (Ca: 1159,90, K: 1786,64, Na: 399,80 ppm) con concentraciones de 2049,05±950,65, 1831,90±345,51 y 431,10±77,69 ppm, respectivamente. Adicionalmente, contienen niveles altos de magnesio (763,59±169,17 ppm), y en un menor índice manganeso, hierro y zinc.

Los propóleos originarios de la Granja Botana (*bh-MB*) son los segundos en concentración mineral, siendo característica la fracción de potasio, calcio y magnesio (1988,87±631,86, 1298,70±909,32 y 359,64±43,29 ppm). Los cuatro minerales restantes objeto de estudio se expresaron en una concentración por debajo del valor promedio como se observa en la tabla 13.

Las resinas propólicas procedentes de Buesaco (*bh-PM*), presentan un contenido significativo de potasio, hierro y sodio, sin embargo, la mayoría de los minerales presentan una concentración por debajo del promedio general.

Cabe anotar, que en el total de muestras estudiadas no fue posible la cuantificación (detección) de cobre aún cuando se concentró la muestra extracto,

base para la determinación. Un comportamiento similar se presentó para níquel en las muestras provenientes de Buesaco y La Unión. Esta diferencia probablemente es consecuencia de las diferentes especies botánicas que las abejas de cada región utilizan como fuente de resinas, así como el tipo de suelo a partir del cual se genera la flora y en efecto los exudados tomados como alimento.

En un proceso valorativo general de las tres zonas de muestreo se registra un significativo contenido mineral para aquellas zonas de suelos andinos; muestras propólicas que de alguna manera responden a las características geológicas propias de los suelos del departamento de Nariño.

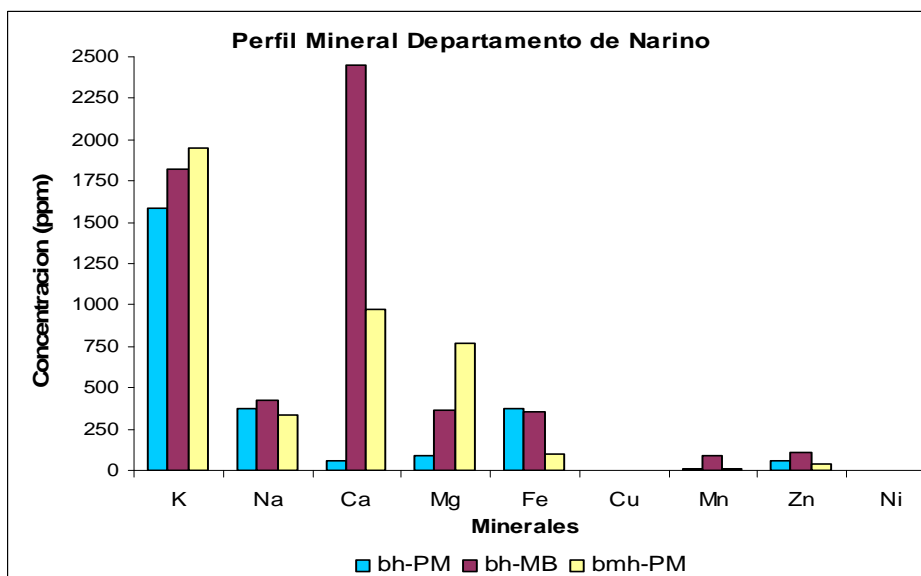
Así, los propóleos procedentes del municipio de La Unión presentan el mayor contenido de sodio, calcio, manganeso, zinc y níquel; los propóleos de la Granja Experimental Botana en minerales como potasio y magnesio, y finalmente los propóleos procedentes del municipio de Buesaco en hierro.

La existencia de níquel en los propóleos de la Granja Botana pueden ser consecuencia de la actividad industrial y automotriz que la rodea, ya que en su entorno se encuentran ubicadas la zona industrial de la ciudad capital, San Juan de Pasto, así como la arteria vial Panamericana.

Dentro del conjunto de los minerales menores, el manganeso y níquel finalizan la fracción mineral, con promedios de $5,64 \pm 0,26$ a $91,16 \pm 18,55$ ppm y de no detectable a $1,61 \pm 1,27$ ppm respectivamente. Así mismo, el contenido de zinc fue menor en comparación con el reportado para muestras de otras zonas del país, encontrándose en el orden de $34,94 \pm 10,96$ a $109,07 \pm 32,52$ ppm con relación a los 161.3 a 443.2 ppm de otras regiones de Colombia.

De forma general en la figura 23 se establece un análisis gráfico comparativo en función de la concentración mineral promedio para cada uno de los propóleos de las zonas estudiadas.

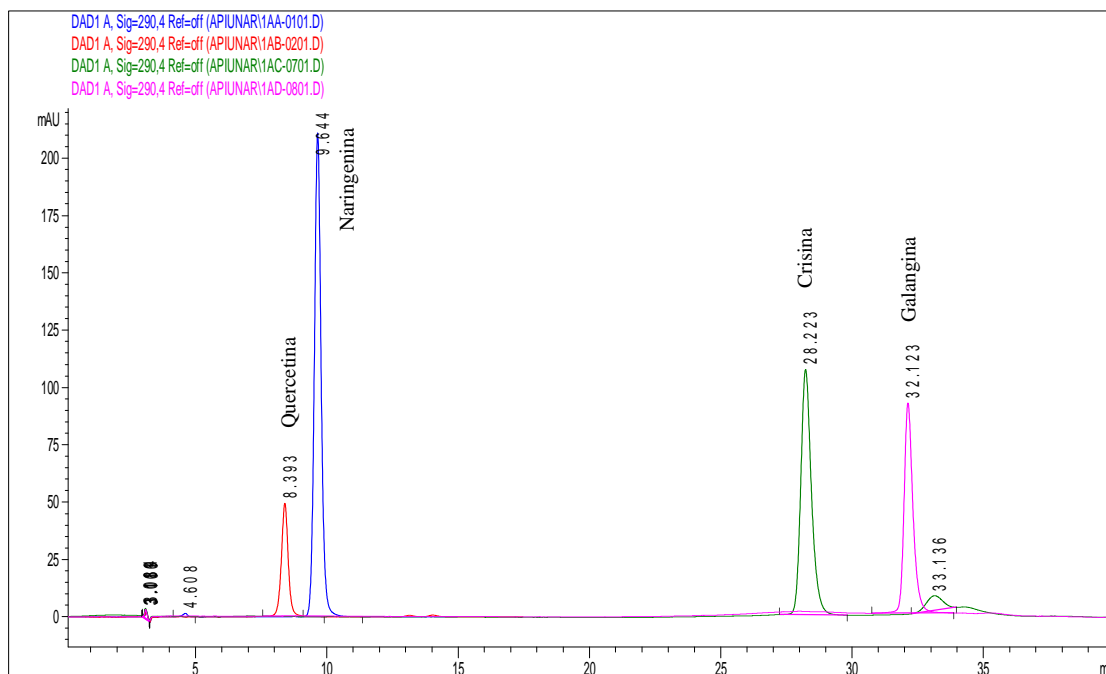
Figura 23. Perfil para el contenido mineral en las zonas de muestreo



4.4 ANÁLISIS DE LOS EEP POR HPLC/MS

4.4.1 Análisis de los estándares. En la figura 24 se indica el perfil cromatográfico de los estándares mediante HPLC, permitiendo determinar los tiempos de retención, y de este modo la identidad de uno. Se empleó la flavanona naringenina, la flavona crisina, y los flavonoles galangina y quercetina, cuatro flavonoides ampliamente difundidos en propóleos de diferentes regiones, incluyendo los de zonas templadas y tropicales (USIA, et al., 2002; POPOVA, et al., 2005; ADELMANN, et al., 2007).

Figura 24. Perfil de HPLC/DAD de los estándares.



En la siguiente tabla se describe los valores m/z de los fragmentos correspondientes a los estándares.

Tabla 14. Valores m/z de fragmentos obtenidos a partir de las rupturas de las moléculas de los estándares.

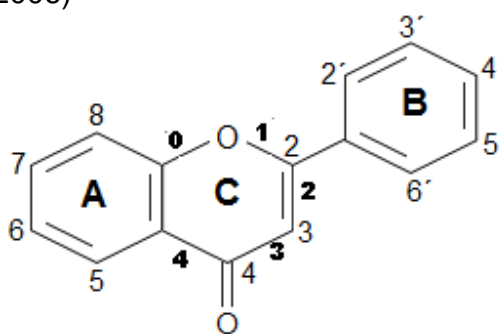
Naringenina		Quercetina		Crisina		Galangina	
Fragmento	m/z	Fragmento	m/z	Fragmento	m/z	Fragmento	m/z
^{1,3} A ⁺	153	^{1,3} A ⁺	152	^{1,3} B ⁺	102	^{1,3} A ⁺	152
^{1,4} B ⁺	148	^{0,2} B ⁺	137	^{0,4} B ⁺	146	^{0,2} B ⁺	105
^{1,4} B ⁺ - 2H	146	^{1,3} B ⁺	150	^{1,3} A ⁺	152	^{1,3} B ⁺	119
^{1,4} B ⁺ - 2H - CO	118	^{0,2} A ⁺	165	^{1,3} A ⁺ - H ₂ CO	122	^{0,2} A ⁺	165
^{1,4} B ⁺ - 2H - H ₂ O	131	^{1,3} B ⁺ - 2H	148	^{0,4} B ⁺ - H ₂ O	128	^{1,4} A ⁺	108
M - B	179	^{0,2} A ⁺ - CO	137			^{1,3} B ⁺ - 2H	116
^{0,2} B ⁺	106	^{1,3} A ⁺ - C ₂ H ₂ O	110			^{0,2} A ⁺ - CO	137
						^{1,3} A ⁺ - C ₂ H ₂ O	111
						M - C ₄ H ₄ O ₂	187
						M - H ₂ O	253

La determinación de la secuencia o ruta de fragmentación de los flavonoides empleados como estándares en el análisis de los EEP se realizó por medio de la espectrometría de masas basada en la combinación de la ionización electro-spray

en modo positivo y la disociación por colisión-inducción. (CUYCKENS, F. et al., 2000)

Para elucidar la posible ruta de fragmentación de cada uno de los compuestos presentes en los EEP se propone los mecanismos fundamentados en la abundancia de los iones de las moléculas protonadas $[M+H]^+$, la aglicona protonada, los iones $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$, así como los iones producto de la caracterización parcial del flavonoide que se muestra en el espectro de masas. (NOUR-EDDINE ES-SAFI, et al., 2005; RAYMOND, E. et al., 2006). Para ello, se adecua el siguiente sistema de nomenclatura, adoptado de RAYMOND, E. et al., 2006)

Figura 25. Numeración rutas de fragmentación del sistema anular flavonoide. (RAYMOND, E. et al., 2006)



En esta figura, los números en negrilla (0, 1, 2, 3 y 4) para el anillo C indican la ruptura de los enlaces C – C, diferentes a la numeración de los carbonos que conforman los anillos A y C (2 a 8). La numeración de los enlaces se emplea en la conformación de los iones tipo A y B, producto de la fragmentación de la molécula.

Figura 26. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar naringenina.

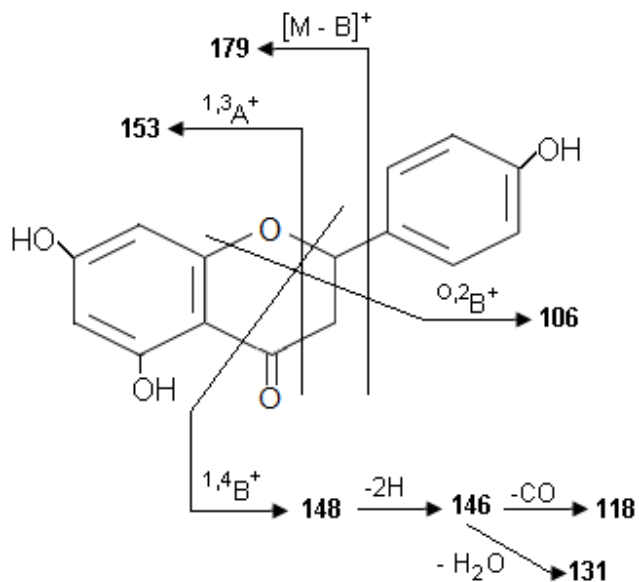


Figura 27. Espectro MS para el estándar Naringenina

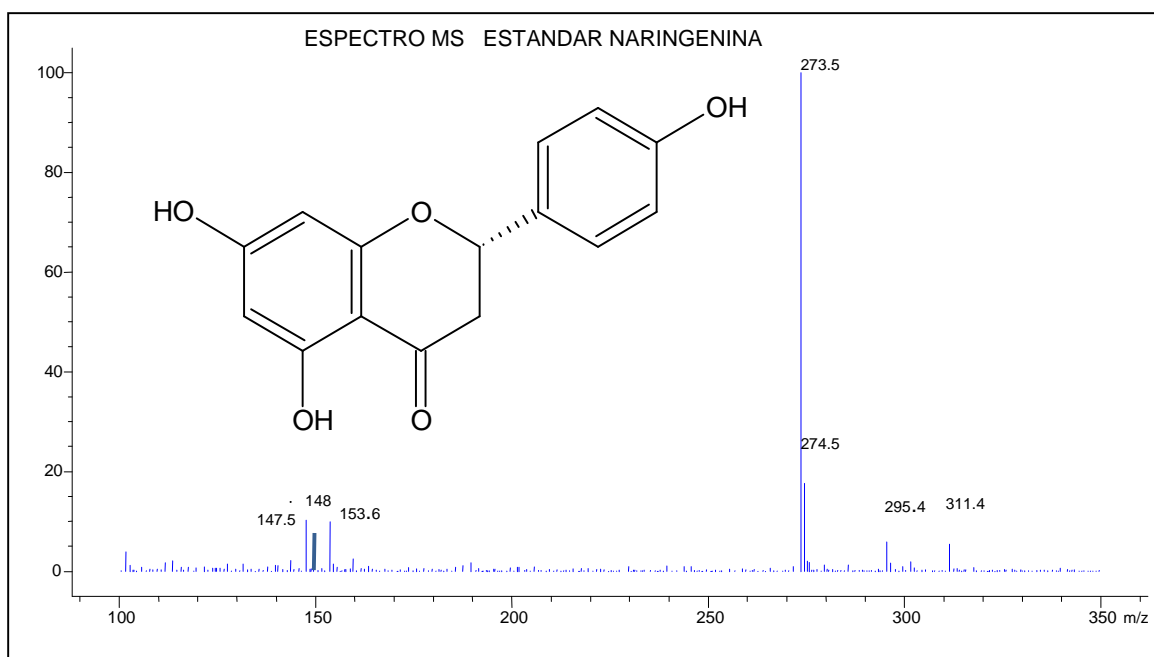


Figura 28. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar Quercetina.

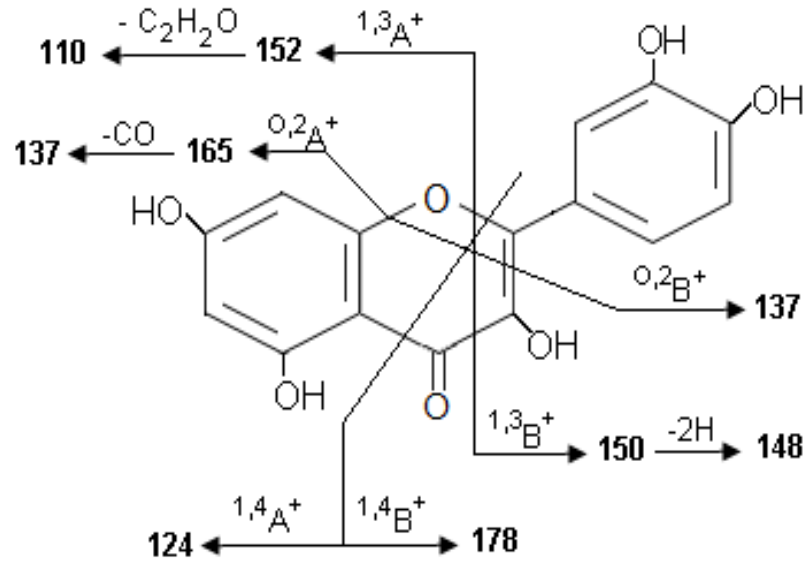
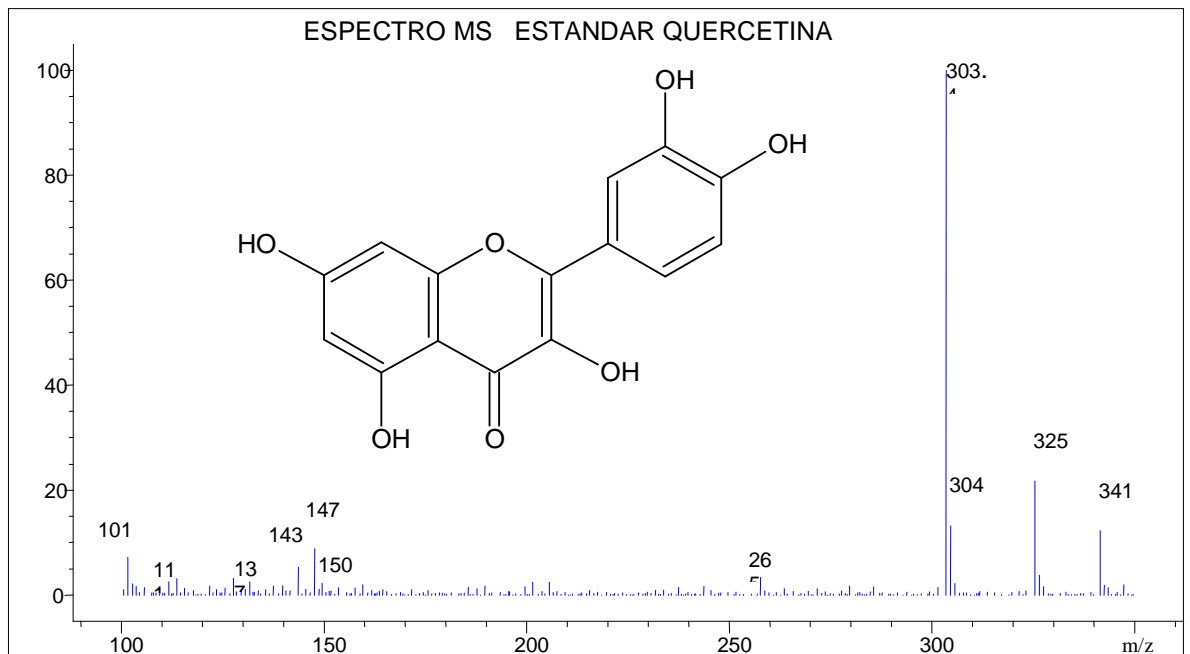


Figura 29. Espectro MS para el estándar Quercetina



La siguiente figura muestra los fragmentos producto de la destrucción de la molécula del estándar de Crisina.

Figura 30. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar Crisina

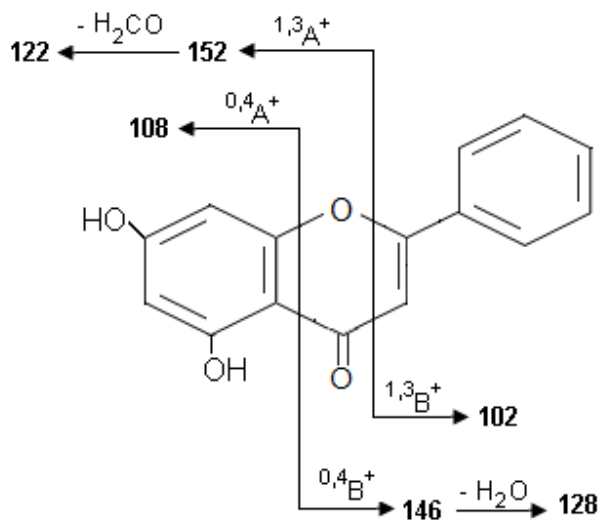
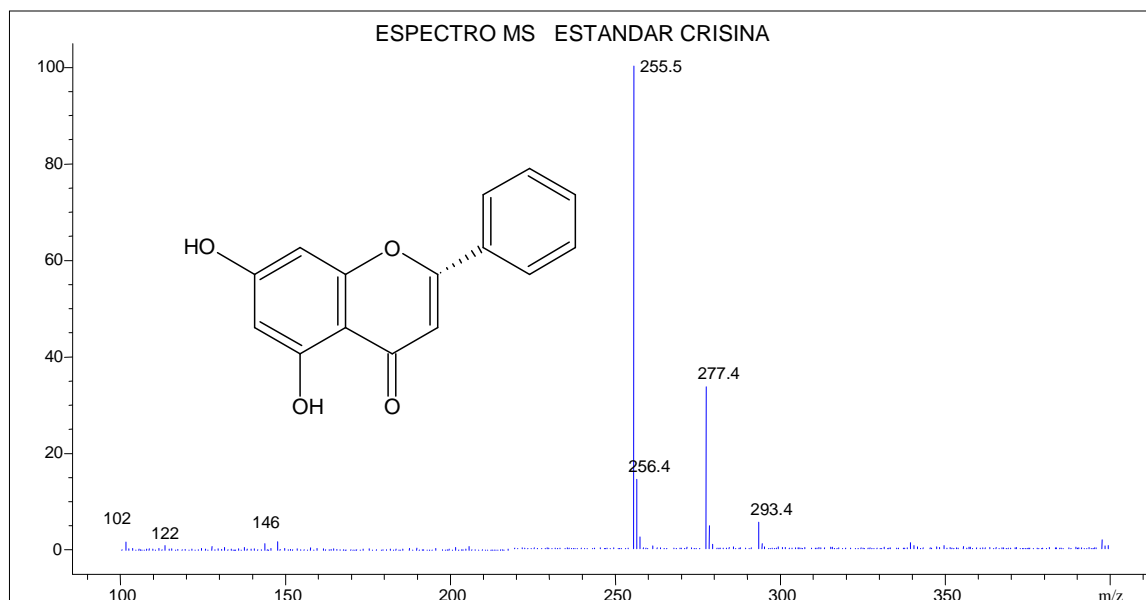


Figura 31. Espectro MS para el estándar Crisina



A continuación se describe algunos de los fragmentos producto de la ionización protónica del estándar Galangina.

Figura 32. Nomenclatura y diagnóstico de los iones producto de la protonación del estándar Galangina.

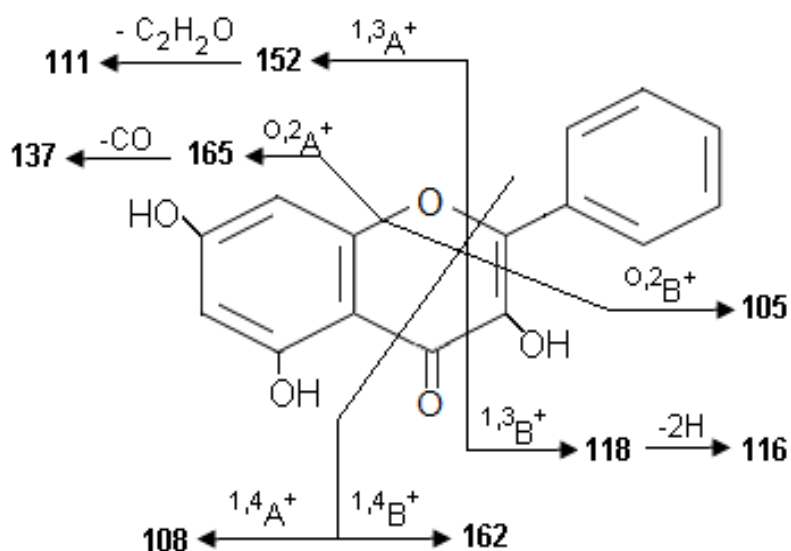
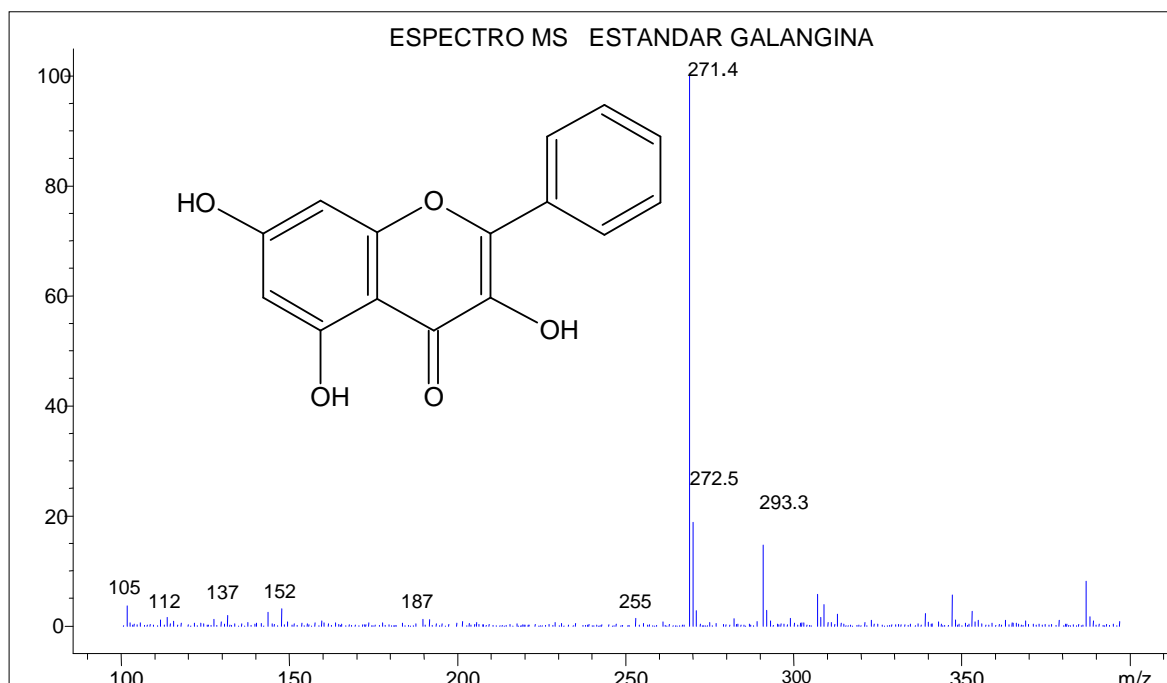


Figura 33. Espectro MS para el estándar Galangina



Las figuras anteriores señalan los espectros de masas obtenidos para los iones Y_0^+ de naringenina, quercetina, crisina y galangina. De acuerdo a CUYCKENS F., et al., (2000) la mayoría de las fragmentaciones de la aglicona en cada uno de los casos se deriva de la división o ruptura del enlace C-C en las posiciones 1,3; 0,2 y 0,4 del anillo C, resultando en estructuras informativas del tipo ion $^{ij}A^+$ y $^{ij}B^+$. Estos iones suministran de forma clara el tipo de sustitución parental que se encuentran presentes en los anillos A y B de cada compuesto, de manera que pueden ser analizados a partir de las reacciones retro Diels-Alder (RDA). Los iones $^{1,3}A^+$ y $^{1,3}B^+$ se encuentra presente en la flavona Crisina y en los flavonoles Quercetina y Galangina, siendo el ión $^{1,3}B^+ - 2H$ característico para los flavonoles. Por su parte, los flavonoides tipo flavanona como la Naringenina presenta señales propias $^{1,4}B^+ - 2H - CO$ y $^{1,4}B^+ - 2H - H_2O$.

Es común que los iones $^{0,2}A^+$, $^{0,2}A^+ - CO$, $^{1,4}A^+ + 2H$ y $^{1,3}A^+ - C_2H_2O$ se encuentren presentes para los flavonoles como la Quercetina y la Galangina (NOUR-EDDINE ES-SAFI, N., et al., 2005). Cabe resaltar que el grupo hidroxilo adicional ubicado en la posición 3 del flavonol conlleva a un mayor número de posibilidades para la fragmentación, haciendo que presenten espectros más complejos que la flavona crisina quien experimenta las fragmentaciones $^{1,3}B^+$, $^{0,4}B^+$ y $^{0,4}B^+ - H_2O$ como se evidencia en las anteriores rutas de fragmentación.

Adicionalmente a las fragmentaciones de los iones $^{ij}A^+$ y $^{ij}B^+$ existen pérdidas de pequeñas moléculas y/o radicales a partir del ion Y_0^+ (que para las agliconas se representa como $[M+H]^+$). Las pérdidas comunes para todos los compuestos son del tipo 18 u (H_2O), 28 u (CO), 42 u (C_2H_2O), mientras que para la flavona se presenta pérdidas adicionales de 30 u (H_2CO) y en el caso de los flavonoles son más propensos a la pérdida de 56 u ($2 \times CO$) y 18 u (H_2O) o 84 u ($C_4H_4O_2$) sucesivamente. Algunas de las pérdidas de estas pequeñas moléculas son útiles en la identificación de la presencia específica de un grupo funcional, por ejemplo, la presencia de un grupo metoxi es fácilmente detectado por la pérdida de 15 u (CH_3) y 32 u (CH_3OH) del ión precursor $[M+H]^+$ (JUSTESEN, U., 2000)

4.4.2 Análisis de las muestras de los EEP. Los perfiles cromatográficos de los extractos de propóleos se evaluaron mediante HPLC/MS. Los cromatogramas se presentan en las figuras 34 y 35. En general, se aprecia que no es muy clara la composición química de las muestras puesto que los extractos presentan perfiles muy similares como se observa en la figura 35, con tiempos de retención (TR) menores a 10.0 min, por lo que se deduce la presencia de compuestos de naturaleza polar, este hecho es consistente con la naturaleza de las moléculas de estudio, agliconas flavonoides altamente hidroxiladas. En la figura 37 el EEP del municipio de La Unión muestra la presencia de un pico a TR entre 15.0 y 20.0 min; correspondiendo al más abundante de los picos detectados en relación a las otras zonas.

Figura 34. Perfil de HPLC/MS de las muestras sobrepuestas. Azul: Granja Botana UdeNar, Rojo: Buesaco, Verde: La Unión.

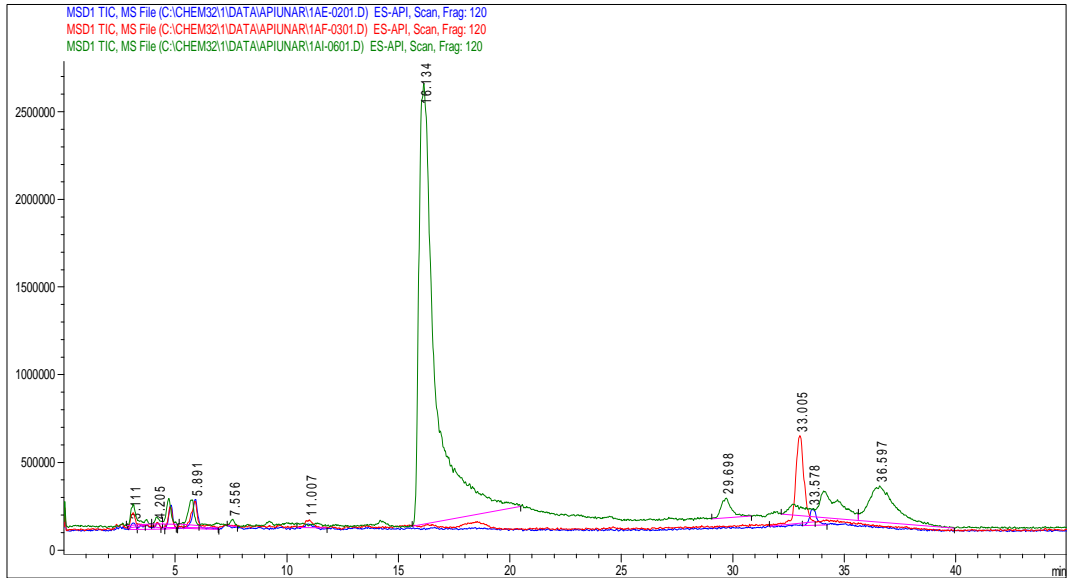


Figura 35. Perfil de HPLC/MS de las muestras sobrepuestas (ampliación de los primeros 10 minutos). Azul: Granja Botana UdeNar, Rojo: Buesaco, Verde: La Unión.

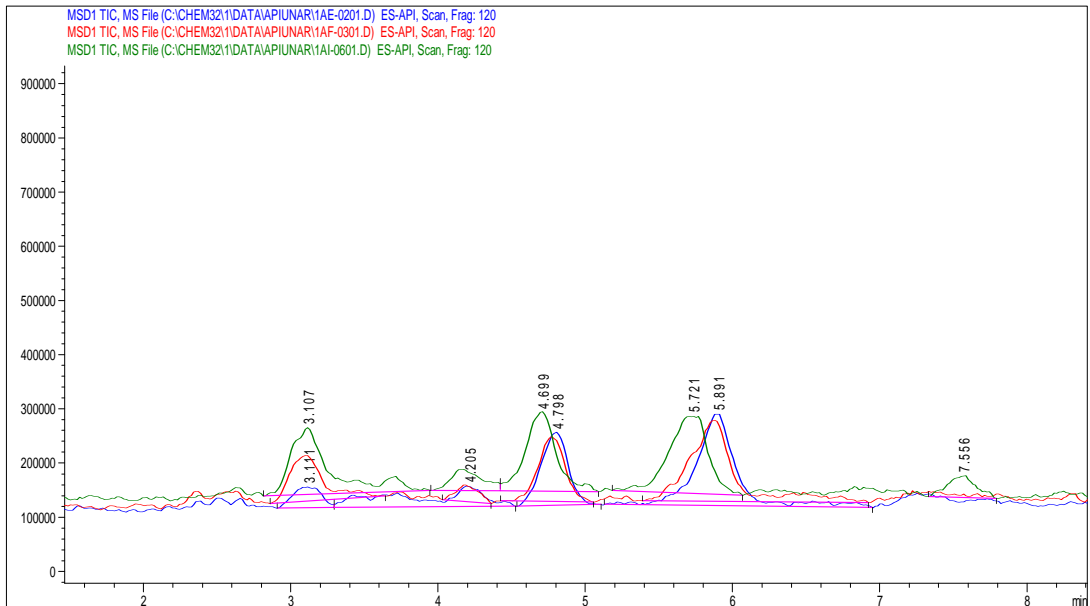
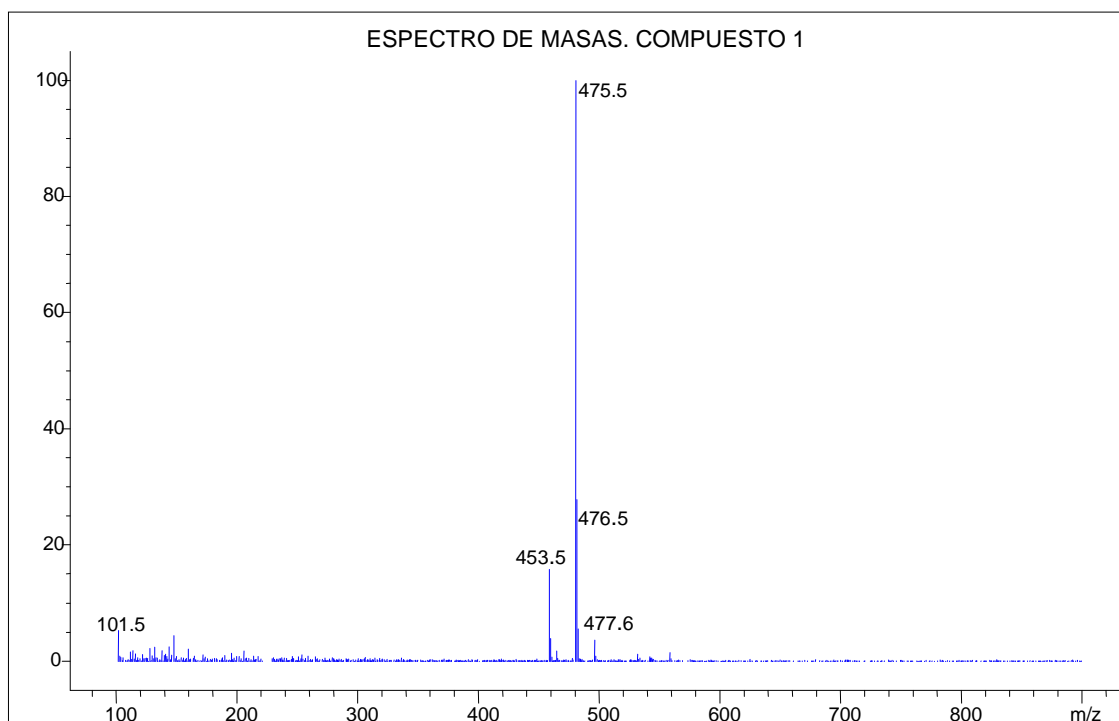


Tabla 15. Resultados de los posibles compuestos encontrados en los EEP por MS

Compuesto	PM (g/mol)	TR (min)	Posible Nombre	Muestra		
				Udenar	Buesaco	Unión
1	452	4.8.	No identificado	X	X	X
3	440	33.5	Pinocebrin-8C-glucósido	X	X	
4	396	11.0	6,8,5'-trimetoxi luteolin 7-metil éter		X	
5	398	18.5	6-secbutenil-6,8-dial luteolina		X	
6	244	16.1	2,2-dimetil-2-ol-6-carboxietenil benzopirano			X
7	284	29.7	Genkwuana			X
8	314	34.0	Ramnetina			X
9	422	36.6	Crisina-8C-desoxiglucosido			X

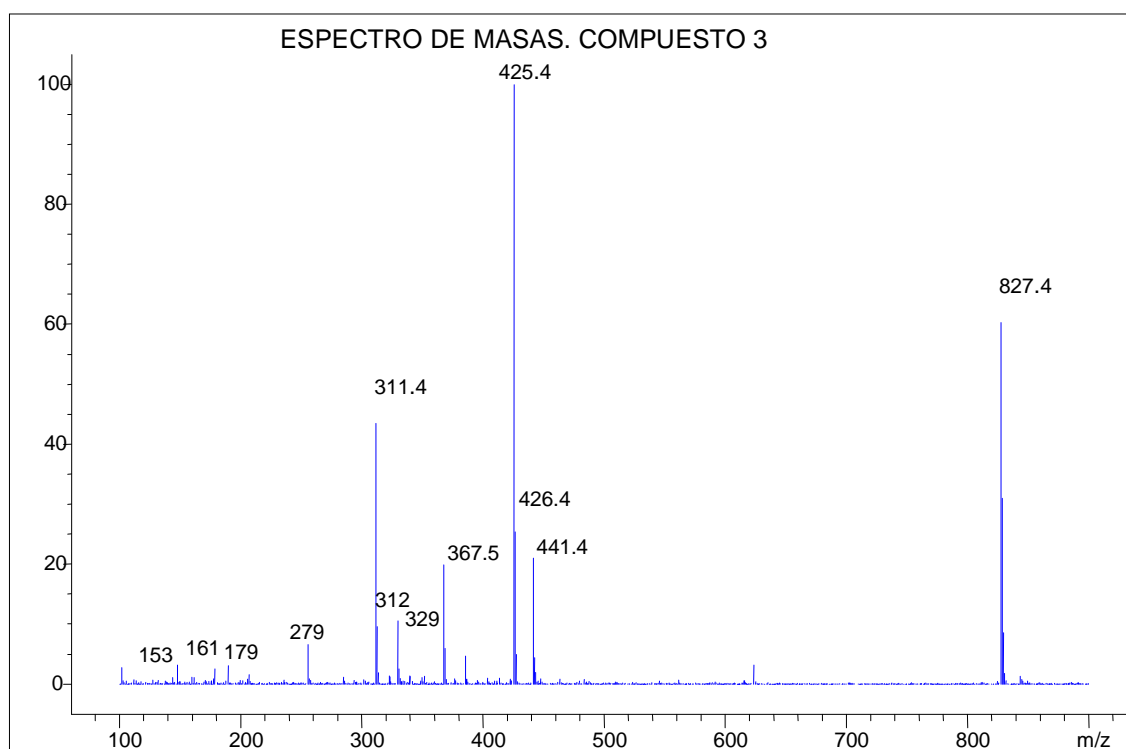
En esta tabla se describe de forma general los posibles compuestos presentes en las muestras de EEP de las tres zonas de muestreo, con su respectivo peso molecular y tiempo de retención (TR), lo anterior sin llegar a descartar la posibilidad de encontrar un grupo adicional de compuestos que registren igual peso molecular.

Figura 36. Espectro de masas compuesto 1



De acuerdo con la información suministrada por el anterior espectro, se registran dos señales de intensidad considerable, el ion molecular $[M+H]^+$ m/z 453 y $[M+Na]^+$ m/z 475. Una pérdida de 352 Da registra un fragmento de masa 101 Da, pérdida considerablemente grande y carente de una ionización anterior a él, sin que llegue a precisar la identidad de este fragmento o de la molécula enlazada con el posible flavonoide. En consecuencia, no es posible determinar de forma precisa la naturaleza y estructura del posible compuesto, ya que se carece de un número significativo de picos que representen las fragmentaciones que puede experimentar la molécula.

Figura 37. Espectro de masas compuesto 3



La fragmentación observada para el ion molecular protonado $[M+H]^+$ generado por el compuesto 3 presenta las características de fragmentación de un flavonoide O-glucosídico, de las cuales se observan dos iones de señal base para su identificación, m/z 441 y 279 respectivamente. Estas señales corresponden a los iones Y_1^+ y Y_0^+ formados por las reacciones de reajuste del enlace glucosídico (ver figura 37).

Las pautas empleadas para determinar la estructura del flavonoide O-glucosídico desconocido resumen al factor de relación de las abundancias de estos dos iones,

así en consideración al espectro obtenido $Y_0^+ < Y_1^+$ indicando un O-glucósido de unión 1→6. (NOUR-EDDINE ES-SAFI, N., et al., 2005).

Un análisis más detallado para la caracterización de la glicona requiere la selección adecuada del ión Y_0^+ con la que es posible correlacionar el fragmento aglicona protonada y sugerir el patrón de fragmentación de acuerdo al espectro.

La caracterización de los sustituyentes en los anillos A y B requiere de la nomenclatura sistemática propuesta para la fragmentación de la aglicona, indicando la ruptura del enlace C-C. La observación de la pérdida de 162 Da en el espectro de masas para el compuesto 3 confirma la presencia de una unidad azúcar tipo glucosa (RAYMOND, E., et al., 2006).

Los resultados de la caracterización de la glicona, $[M+H]^+$ (Y_0^+) indican eliminaciones previas de pequeñas moléculas como CH_3 y H_2O de m/z 426 y 425. Esta última eliminación es representativa a las estructura tipo flavanona. (NOUR-EDDINE ES-SAFI, N., et al., 2005). Del mismo modo, un proceso de descarboxilación tipo $2CO$ de 56 u, se registra a 367Da.

De acuerdo con la figura 38 la unidad aglicona m/z 279, desarrolla fragmentaciones características de las flavanonas indicadas por las señales iónicas de masas 329 ($^{1,3}A^+$), 312 ($^{1,3}A^+ - H_2O$), y 153 Da ($^{0,2}A^+ + 2H$), mientras que la unidad de glucosa genera las señales $^{0,2}X_0^+$, Z_1^+ y X_0^+ de m/z 311, 179 y 161 Da respectivamente, como producto de la ruptura de los enlaces interglucosídicos e intraglucosídicos.

Figura 38. Posible ruta de fragmentación del compuesto 3

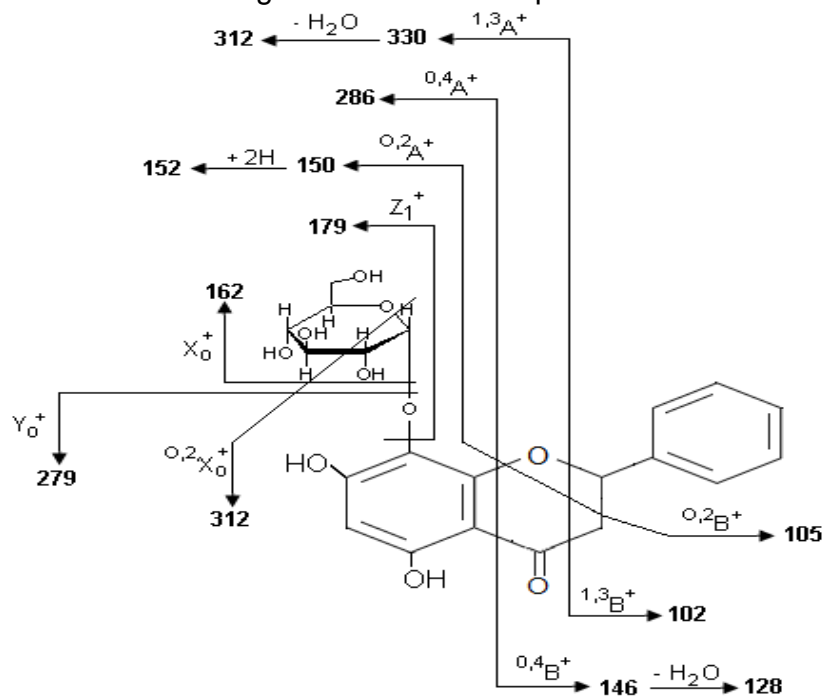
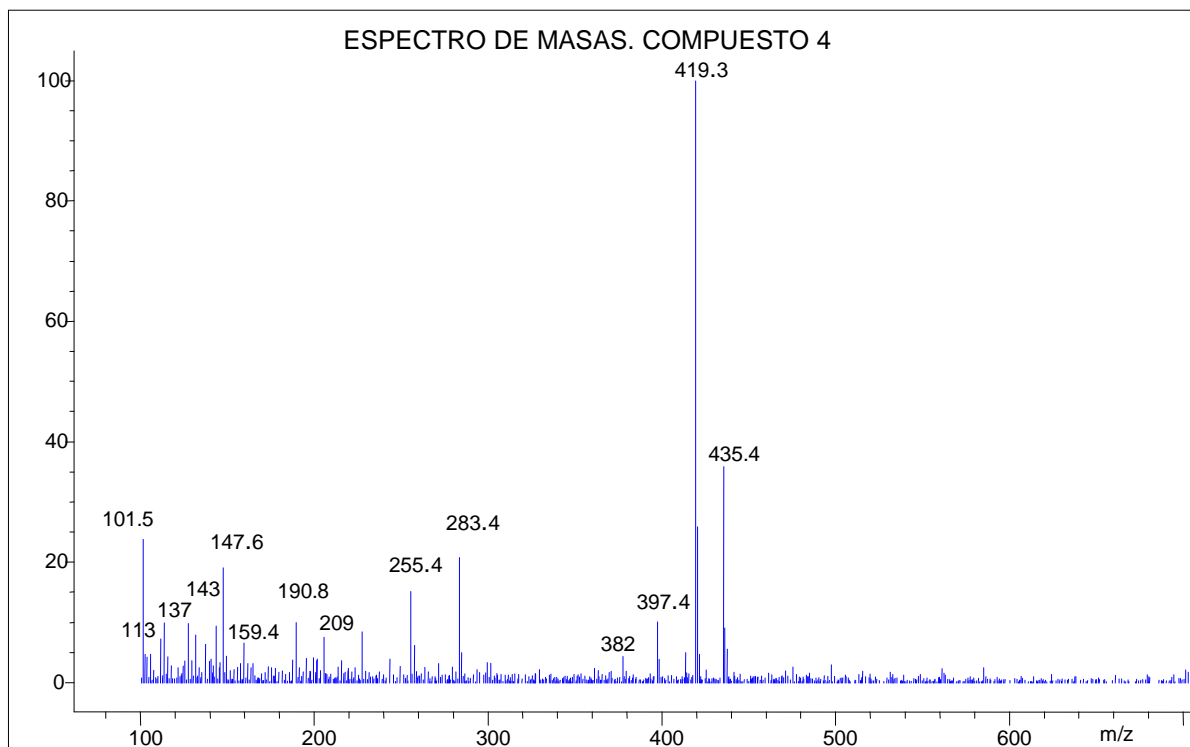


Figura 39. Espectro de masas compuesto 4



La caracterización del compuesto 4 parte de la identificación del ión molecular $[M+H]^+$ de m/z 397 quien experimenta una pérdida inicial de 15 unidades, correspondientes a un grupo metilo ($M - CH_3$, m/z 382), como se muestra en el espectro anterior. De acuerdo con GOUDARD, et al., 2007, es posible considerar la existencia de una trimetoxiflavona con base en las intensidades relativas de estos dos iones, siendo una 6,7,8 trimetoxiflavona. El ión m/z 283 corresponde a la pérdida de tres grupos CH_3OH del sistema anular flavonoide, dando a lugar el ión Yo^+ correspondiente a la flavona metoxidada en la posición 7, Luteolin 7- metil – eter. Esta metoxiflavona junto con la pérdida de los grupos metoxi protonados confirman que el compuesto 4 presente en los EEP es una trimetoxiflavona.

La fragmentación de la aglicona revela en la señal m/z 382 la eliminación de un sustituyente metilo. Luego el producto iónico de masas para el fragmento Yo^+ sugiere el patrón de fraccionamiento de la figura 40. Pérdidas de 28 u y 46 u se registran los picos de baja intensidad m/z 255 ($Yo^+ - CO$) y 209 ($Yo^+ - CO - H_2O$) respectivamente. La ruptura de los enlaces C – C 1,3 y 0,2 del anillo C conforma los iones $^{0,4}B^+ - H_2O$, $^{1,4}B^+ - 2H - H_2O$, $^{1,3}B^+ - H_2O$ y $^{0,2}B^+ - CO$ de m/z 190, 159, 147 y 137.

Figura 40. Posible ruta de fragmentación del compuesto 4

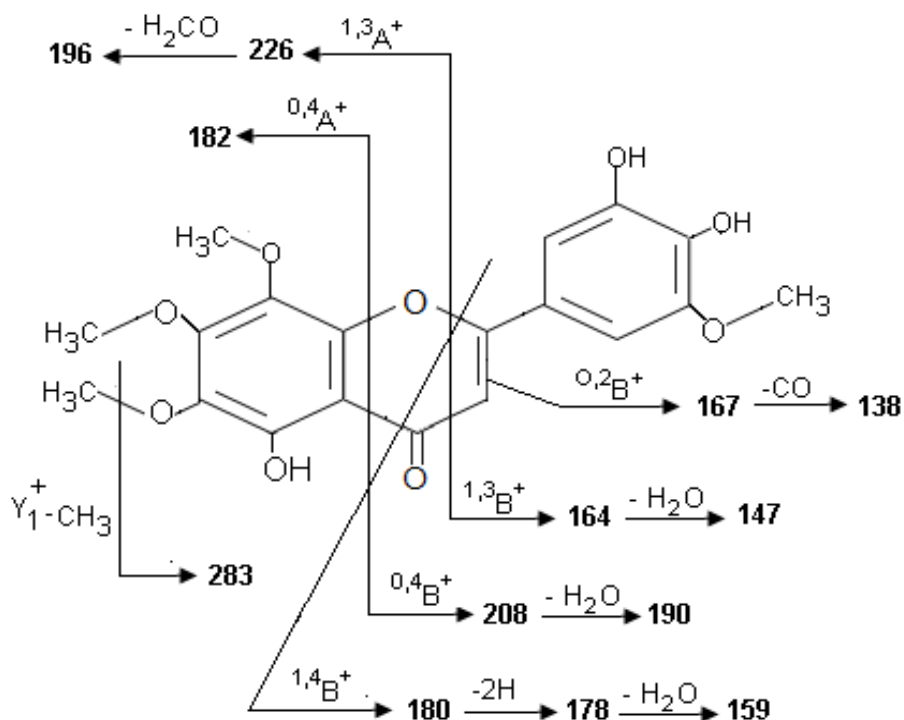
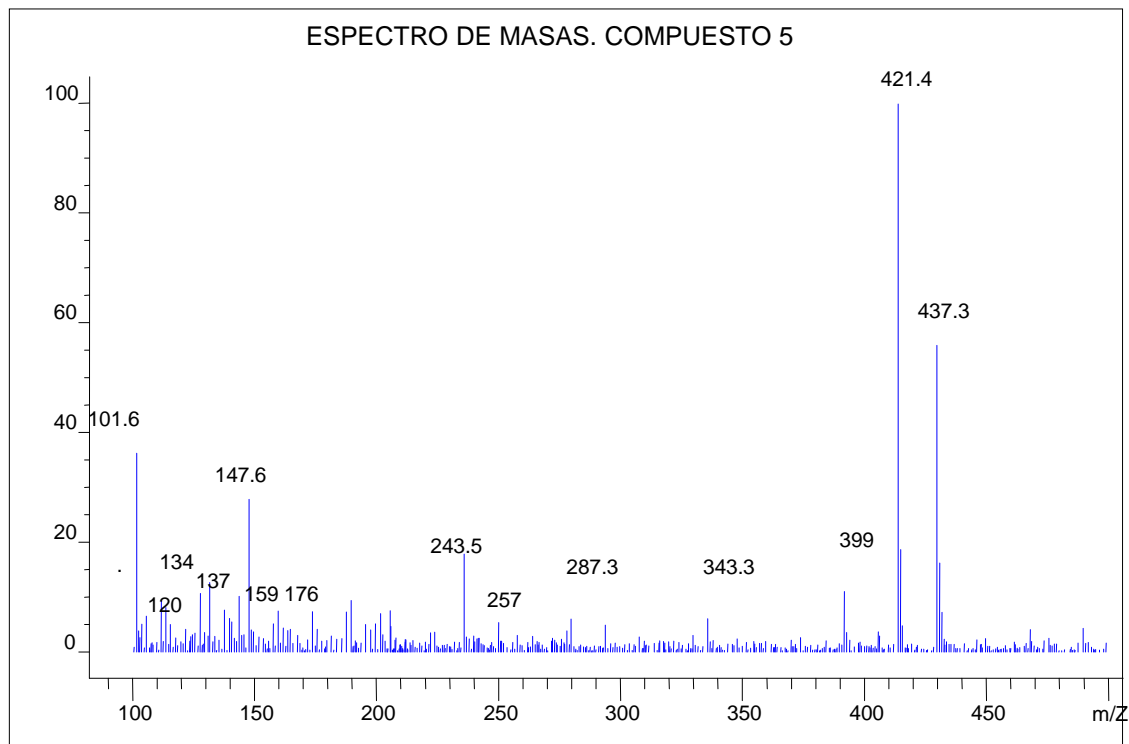


Figura 41. Espectro de masas compuesto 5



En el espectro se ilustra las fragmentaciones producto de la destrucción de la aglicona a partir de la ruptura de los enlaces C-C en las diferentes posiciones del sistema policíclico del flavonoide. El pico molecular $[M+H]^+$ de m/z 399 registra pérdidas sucesivas de 56 Da equivalentes a la eliminación de dos grupos CO derivados de los grupos aldehídos de las posiciones 6 y 8 del anillo A. Estas pérdidas complementarias generan los iones $Y_1^+ - 2CO$ y Y_0^+ de masa 343 y 287 Da. Este último fragmento, m/z 287, corresponde a la flavona Luteolina sin sustituyentes. Al igual que todas las flavonas, la luteolina es susceptible a las fragmentaciones $Y_0^+ - CH_3O$ y $Y_0^+ - CO - H_2O$, iones de masa 257 y 234 Da.

Las fragmentaciones de los anillos A y B de la flavona se representan por los iones $^{1,3}A^+ - H_2CO$ (m/z 176), $^{0,2}B^+ - CH_3O$ (m/z 159), $B^+ - H_2O$ (m/z 147) y $^{0,4}A^+ - CO$, producto de la descarbolixación o deshidratación de cada fragmento, de acuerdo a los parámetros establecidos por NOUR-EDDINE ES-SAFI, N., et al., (2005). (Ver figura 42)

Figura 42. Posible ruta de fragmentación del compuesto 5

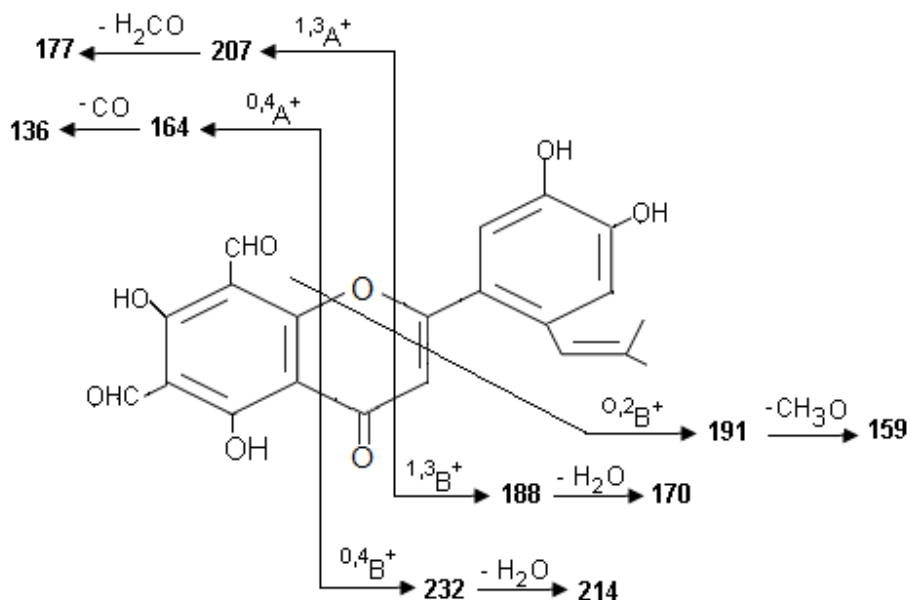
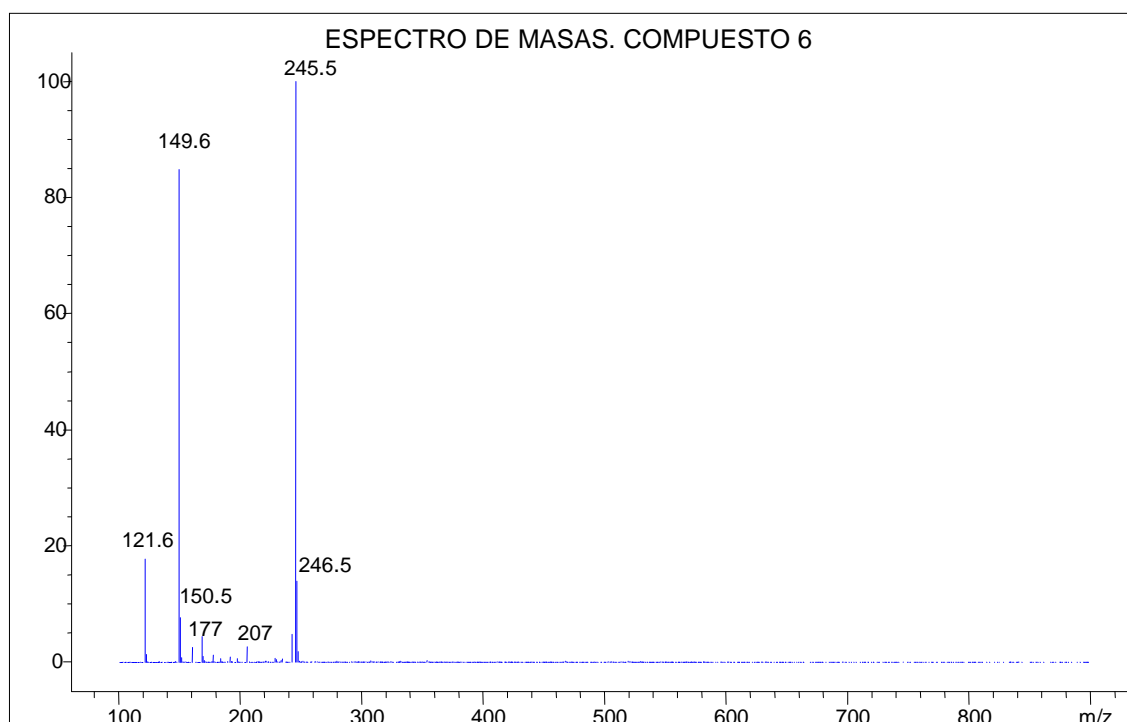


Figura 43. Espectro de masas compuesto 6



De acuerdo con SALAMANCA, G., (2002) los tipos de flavonas, flavonoles y flavanonas asociados a la actividad apícola presentan pesos moleculares cercanos a los 260 g/mol, siendo la flavona Crisina la de menor peso molecular (254 g/mol), por lo que cabe afirmar que de acuerdo al espectro de masas (figura 43), se trata de otro tipo de compuesto fenólico.

MARCUCCI, et al., (2001) al analizar los propóleos de Mandirituba (Brasil) aisló y caracterizó compuestos fenólicos cuya masa molar es inferior a 250 g/mol. Esta referencia se tomó como base para elucidar la posible ruta de fragmentación del compuesto 6.

El espectro de masa del muestra cinco señales, tres de las cuales son de considerable intensidad. Los datos reportados por la posible ruta de fragmentación (figura 44) representan las pérdidas internas tipo $-\text{COOH}$, $-\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_5$ y $-\text{CH}_3\text{O}$ respecto al ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 245, desarrollando los iones de masa 202, 150, 120 y 171 Da respectivamente. (CUYCKENS, F., 2000)

Figura 44. Posible ruta de fragmentación del compuesto 6

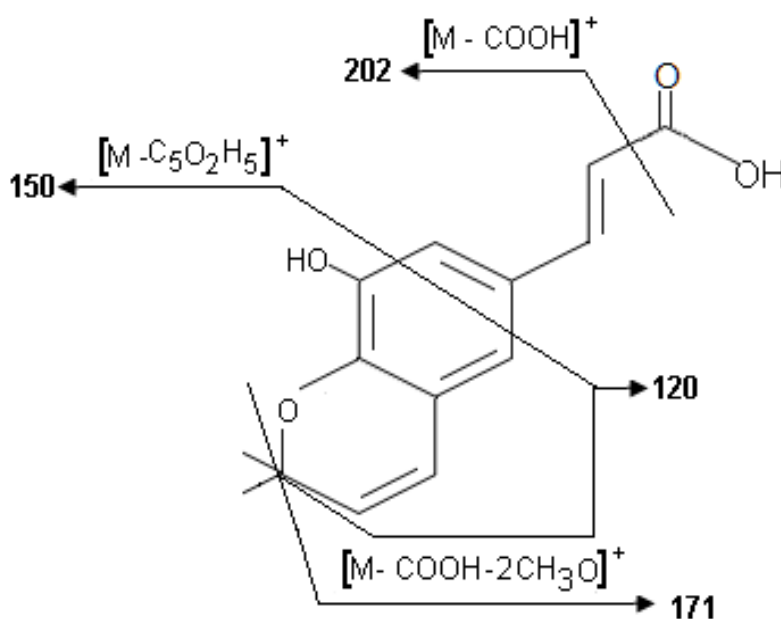
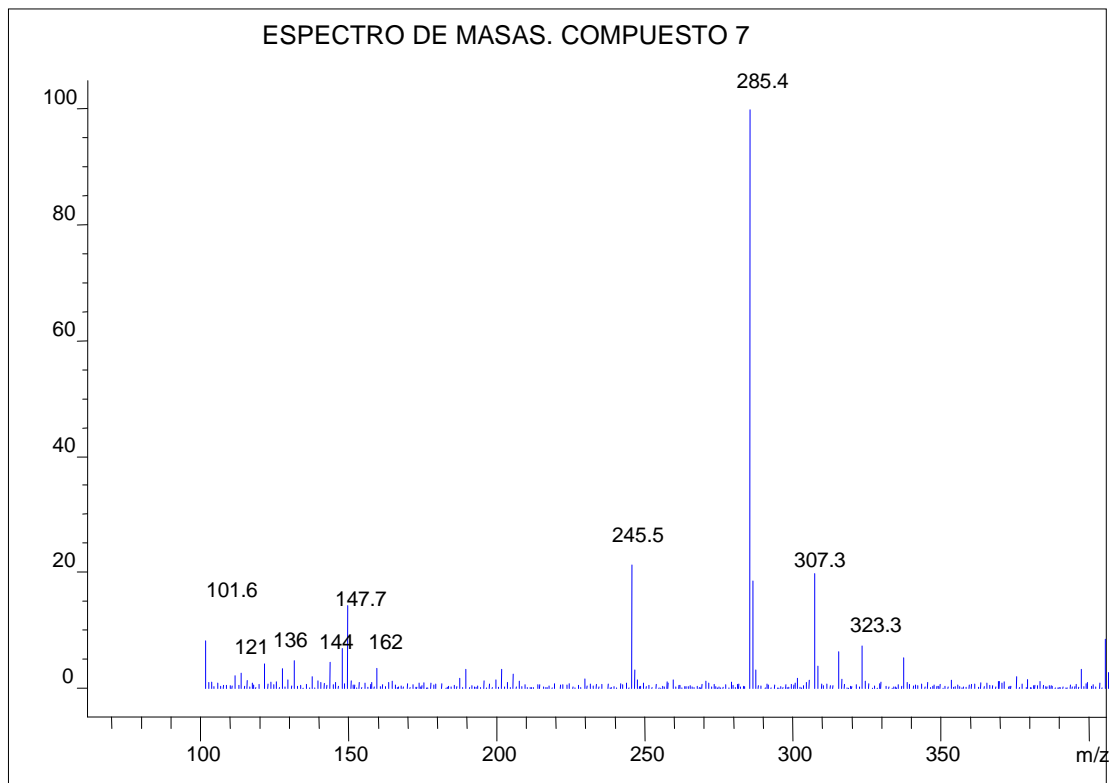


Figura 45. Espectro de masas compuesto 7



En el análisis estructural del flavonoide correspondiente al compuesto 7, la técnica de fragmentación indicada por el espectro de masas, muestra que la molécula protonada $[M+H]^+$ de m/z 285 corresponde a la flavona genkwantina. El producto iónico principal m/z 285 es susceptible a llevar a cabo pérdidas menores de 42 y 142 Da como se muestra en la posible ruta de fragmentación propuesta en la figura 46. Sin embargo, la fragmentación de la aglicona es limitada por el patrón general de las flavonas con pérdidas neutrales mayores o iguales a 96 Da (RAYMOND, E., 2006). Los m/z 307 y 323 correspondientes a los iones pseudomoleculares $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$ fueron seleccionados como iones parentales.

El ion protonado de la aglicona experimenta rupturas de los enlaces C-C 0,2; 0,4; 1,3 y 1,4 al interior del anillo C del sistema anular (ver figura 46). El análisis de las fragmentaciones de la genkwantina muestra señales de baja intensidad m/z 245, 162, 144, 136, 121 y 101 corresponden a los iones $[M-C_2H_2O]^+$, $^{0,4}B^+$, $^{0,4}B^+ - H_2O$, $^{1,3}A^+ - H_2CO$, $^{0,2}B^+$ ó $^{0,4}A^+$ y $^{1,3}B^+ - H_2O$ respectivamente.

Figura 46. Posible ruta de fragmentación del compuesto 7

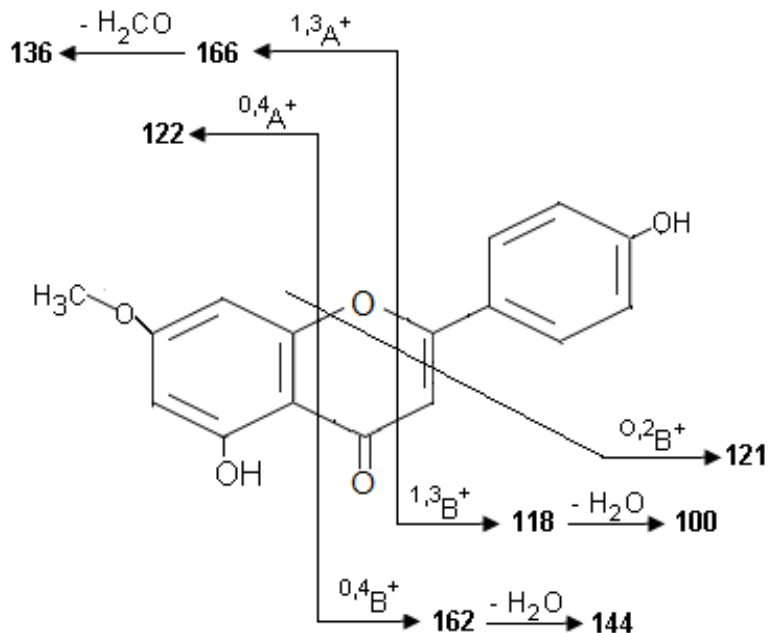
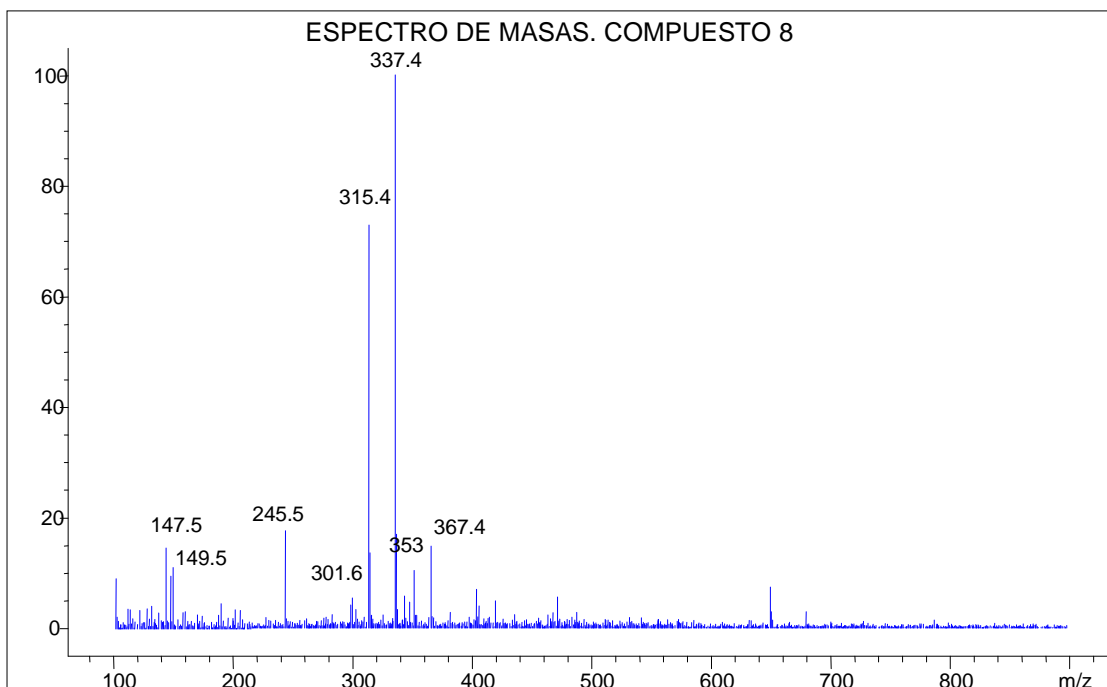


Figura 47. Espectro de masas compuesto 8



El espectro de masas muestra que el ion $[M+H]^+$ de m/z 315 corresponde a dos posibles flavonoides isómeros, ramnetina e isoramnetina, flavonoles que difieren entre sí por la ubicación del grupo metoxi, C7 anillo A y C5' anillo B respectivamente.

Con relación a la estructura desconocida del flavonoide se precisa la posibilidad de fragmentación para la molécula considerando los iones característicos que se encuentran presentes en los flavonoles. De acuerdo con los fragmentos dados por el espectro y los observados en la posible ruta de fragmentación (figura 48), es posible diferir la ubicación 7C o 5'C de dicho grupo en base a las magnitudes m/z , así, se estima que el isómero isoramnetina no manifiesta ningún pico en común o coherente con los valores m/z de los iones fragmento, caso contrario sucede para la ramnetina donde hay mayor número de coincidencias (WARIDEL. P., et al., 2001)

Como se había descrito anteriormente, la ubicación del grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 3 del anillo C, incrementa el número de posibilidades para la fragmentación del flavonol, de este modo el ion molecular $[M+H]^+$, m/z 315, experimenta la eliminación de un grupo metilo (15 u) y dos fragmentos CO (56 u) expresados por los iones $[M - CH_3]^+$ y $[M - CH_3 - CO]^+$ de masa 301 y 245 Da. La destrucción de los enlaces 0,2 y 1,4 del anillo C se registran por los picos de baja intensidad 149 ($^{0,2}A^+ - CH_3O$) y 147 ($^{1,4}B^+ - CH_3O$). Sin embargo, el fragmento ($^{1,3}B^+ - 2H$), m/z 118, aunque se encuentra presente no se registra dentro del espectro.

Figura 48. Posible ruta de fragmentación del compuesto 8

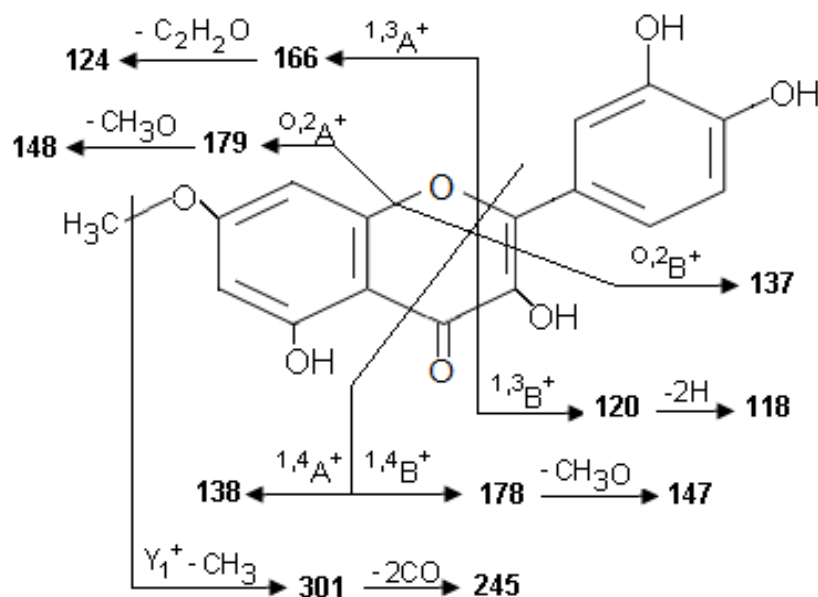
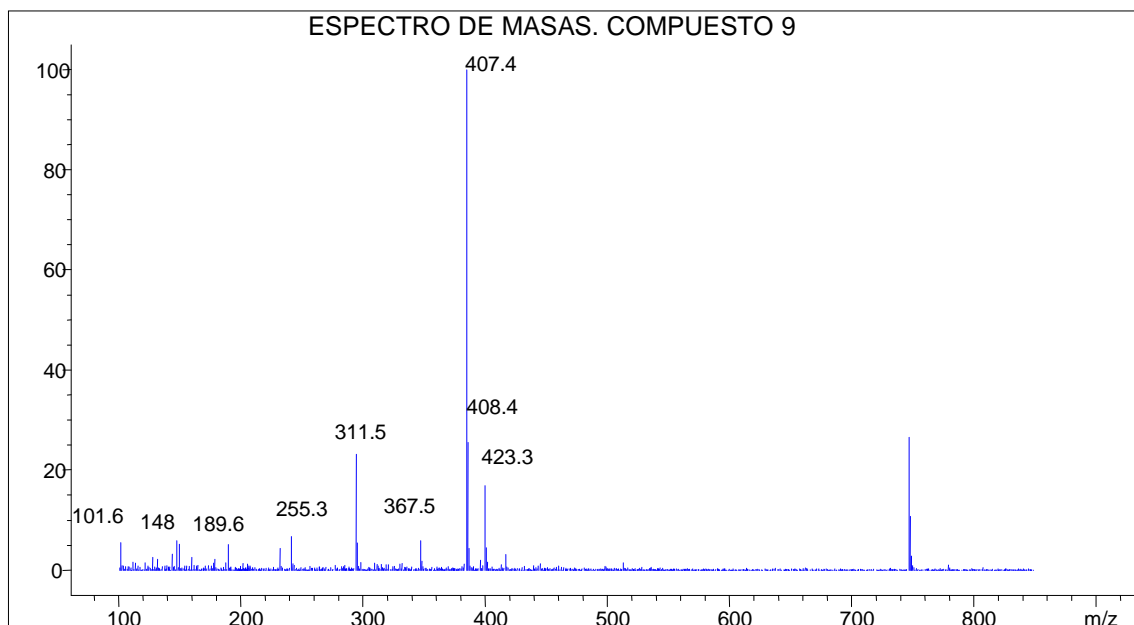


Figura 49. Espectro de masas compuesto 9



El análisis estructural del flavonoide correspondiente al compuesto 9 propone una flavona O-glucosidada de masa 417 Da. No obstante, análisis realizados por NOUR-EDDINE ES SAFI, et al., 2005, expresan que la protonación de la molécula se desarrolla de manera preferente en la parte aglicona de la molécula, en particular en los átomos de oxígeno carbonílico. Conforme a lo enunciado, las 6 unidades de masa restantes se adquieren con la protonación de los oxígenos nucleófilos presentes en la molécula, conformando el ion positivo $[M+H]^+$ de m/z 423. Adicionalmente RAYMOND, E. et al., 2006, determina que la composición elemental de una molécula puede ser determinada de forma confiable con un error de masa de hasta -4Da.

El m/z 423 resulta ser un ion cuya masa es demasiado grande para una aglicona, por ende, se sugiere que el fragmento $[M+H-168]^+$ corresponde a la eliminación de una glucosa terminal tipo desoxiazúcar y la posterior conformación del ion Y_o^+ de la aglicona crisina. La glicona $[M+H]^+$ es propensa a deshidratarse así como a eliminar un grupo metilo, ubicados en los m/z 408 $[M - CH_3]^+$ y 407 $[M - H_2O]^+$.

El patrón de fragmentación propuesto para los anillos A y B, al igual que para la unidad desoxiglucosa se indica en la figura 50 por medio de los iones m/z 367 $[M - 2CO]^+$, 311 ($^{1,3}A - 2H$), 255 (Y_o^+), 148 ($^{0,2}A^+$) ó 148 (X_1^+) y 101 ($^{1,3}B^+$).

concentración inhibitoria de los EEP ha sido empleada para evaluar su acción en factores de virulencia importantes como las enzimas lipasas y coagulasa en *Staphylococcus aureus* (SCHELLER, S. et al., 1993) y el *streptococci* (KILIC, A. et al., 2005) considerándose la actividad antibacteriana como una de las más importantes.

Dentro de las nueve muestras colectadas en los tres municipios del departamento de Nariño, se encontró un significativo potencial inhibitorio para el crecimiento de los microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos, *S. aureus* y *E. coli* respectivamente. Estos resultados, son coincidentes con los reportados en la literatura, en donde se menciona que las resinas propólicas contienen productos que han sido empleados como medicamentos para el tratamiento de muchas patologías como la keratitis o infecciones oculares, inflamación de tejidos, reumatismo y artritis (OKSUZ, H., et al., 2005) .

La composición orgánica e inorgánica del propóleo que ha sido reportada en diversas investigaciones manifiesta grandes diferencias dependiendo de la región en la que se hayan colectado las muestras. (AGA, H. et al., 1994) Adicionalmente, la composición del propóleo puede variar drásticamente en la misma región aunque exista poca diferencia en la diversidad de plantas, la distancia de recolección del propóleo o simplemente por el lugar de depósito del mismo. Sin embargo, dentro del propóleo algunos compuestos tienen efecto sinérgico junto a otros que expresan dicha actividad. Por esta razón, no es posible reportar en forma independiente la actividad antibacteriana exacta de muchos de los compuestos que han sido definidos teóricamente dentro de las resinas propólicas.

Cabe anotar, que después del análisis químico, una mayor información puede ser obtenida con relación a la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos del propóleo, en el que se ha establecido que la composición de las nueve muestras colectadas de diferentes áreas del departamento de Nariño posee contenidos similares en cuanto a la naturaleza de los flavonoides.

No obstante, las diferencias en el contenido total de flavonoides para cada una de las muestras pueden ser resultado de la composición o conformación total de las resinas propólicas. Luego, si el contenido de compuestos hidrofílicos en las muestras es alto, la solubilidad dentro de los EEP puede ser baja. En otras palabras, los flavonoides que expresan actividad antibacteriana en el propóleo pueden o no ser altamente solubles, con lo cual se verá afectado el potencial antibacteriano del mismo, y por ende en la formación de un halo de inhibición significativo.

De acuerdo con GRANGE, M., et al., (1990) los propóleos poseen una mayor actividad frente a microorganismos Gram positivos en comparación a los Gram negativos. Los anexos Q y R muestran el tamaño promedio, máximo y mínimo de

los halos de inhibición para cada una de las muestras de EEP del departamento de Nariño analizadas por dos técnicas diferentes.

Sin embargo, como primera medida, se observa que todos los EEP muestran una diferencia significativa en la actividad antibacteriana en comparación con el blanco (etanol al 80%), que no registra halos de inhibición (figura 51). Con relación al control (estreptomicina 10 µg/mL) los EEP presentan halos de menor diámetro, siendo la zona inhibitoria de la estreptomicina más definida y de mayor tamaño, halos entre 20 y 44 mm para el método de Kirby-Bauer, y entre 31 a 36 mm para el método de difusión por pozos. Este comportamiento se encuentra dentro de los lineamientos reportados bibliográficamente, en los que se indican que los antibióticos tienen de manera significativa una mayor actividad comparado con la actividad de las muestras de propóleo. Este es un factor importante donde se muestra que la actividad del propóleo frente al del antibiótico es significativamente diferente, especialmente en lo concerniente a los componentes activos.

Figura 51. a) Blanco (Etanol). Método Kirby-Bauer, b) Control Sulfato de Estreptomicina. Método de difusión en pozos.

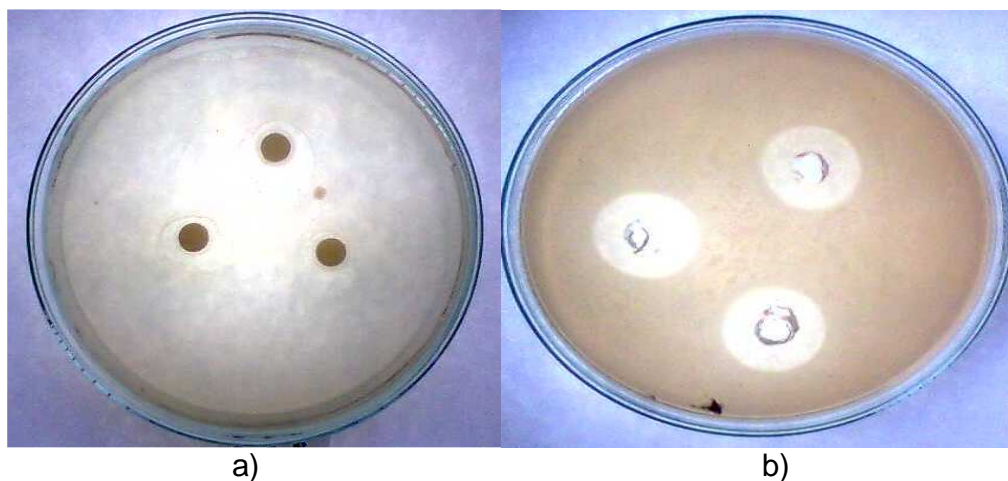


Tabla 16. Actividad antibacteriana de los EEP contra *Escherichia coli* ATCC 9.341 por el método de Kirby- Bauer

Zona	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)	Mínimo	Máximo	Rango
Bco 1	3	19.43	3.44	17.72	16.7	23.3	6.6
Bco 2	3	16.9	3.17	18.79	13.3	19.3	6.0
Bco 3	3	18.67	5.03	26.96	14.0	24.0	10.0
G.Unar 1	3	13.47	5.02	37.25	8.7	18.7	10.0
G.Unar 2	3	14.6	4.37	29.94	10.0	18.7	8.7
G.Unar 3	3	16.87	3.01	17.84	14.0	20.0	6.0
Unión 1	3	13.97	1.30	9.32	12.7	15.3	2.6
Unión 2	3	13.63	1.65	12.10	12.0	15.3	3.3
Unión 3	3	12.43	2.35	18.94	10.0	14.7	4.7
TOTAL	27	15.55	3.77	24.24	8.7	24.0	15.3

Bco: Buesaco; G.Unar: Granja Universidad de Nariño

La anterior tabla muestra diferentes estadísticos de *E. coli* para cada uno de los nueve niveles de zona analizados por el método de Kirby-Bauer. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles, enlistados bajo la columna de promedio. Cabe anotar que hay una diferencia de más de 3 a 1 entre la desviación estándar más pequeña y la más grande. Esto puede causar problemas puesto que el análisis de varianza asume que las desviaciones estándar de todos los niveles son iguales.

Con mayor precisión los resultados de la actividad antibacteriana de los EEP analizados por el método de Kirby-Bauer se presentan en la (Anexo Q). Este método registra el crecimiento del organismo de prueba sobre toda la superficie del agar, y la difusión del agente antibacteriano se registra como una zona circular de inhibición en la cual la cantidad de los agentes antibióticos presentes en EEP es superior a las concentraciones inhibitorias. El diámetro de la zona de inhibición es una función de la cantidad de fármaco en el disco y de la susceptibilidad del microorganismo, además de tenerse en cuenta el tamaño del inóculo, la composición del medio, la temperatura de incubación, el exceso de humedad y el espesor del agar, así como la difusión del principio activo sobre el agar. Si estas condiciones son uniformes y reproducibles se puede obtener el diámetro de la zona de inhibición como función de la susceptibilidad del microorganismo, designándolo como sensible, intermedio o resistente a las concentraciones de los agentes antibióticos del EEP.

Del número total de replicas evaluadas por el método de Kirby-Bauer para las tres zonas de muestreo frente a los dos microorganismos de prueba, uno de los ensayos en *E. coli* es resistente para muestras de la Granja Botana de la

Universidad de Nariño. Igual número de replicas registran un comportamiento sensible, lo que lleva a observar un efecto intermedio de susceptibilidad por parte de la *E. coli* a la acción de los agentes antimicrobianos de los EEP, siempre que se considere el diámetro del halo mínimo de inhibición. Sin embargo, los valores promedio de la zona de inhibición para este microorganismo revelan un índice de susceptibilidad antibiótica de intermedia a sensible en la totalidad de las replicas, con halos que se encuentran dentro del rango $12,43 \text{ mm} \pm 18,94\%$ a $19,43 \text{ mm} \pm 17,72\%$ (figura 52).

Figura 52. Halos de Inhibición en *E. coli*. EEP Granja Botana. Método Kirby-Bauer



En la figura 53 se exhibe un comportamiento diferente para *S. aureus*, donde los EEP logran un efecto sensible en el 70% de los ensayos, presentándose resistencia únicamente en la prueba de la Granja Botana. En ellos, se muestran halos más definidos y de mayor área.

Figura 53. Halos de Inhibición en *S. Aureus*. EEP Granja Botana. Método Kirby-Bauer.

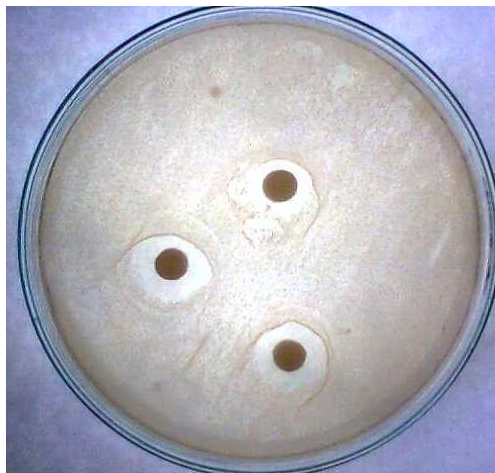


Tabla 17. Actividad antibacteriana de los EEP contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 por el método de Kirby- Bauer

Zona	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)	Mínimo	Máximo	Rango
Bco 1	3	24.17	3.19	13.19	22.67	26.00	3.33
Bco 2	3	30.90	1.57	5.09	26.00	39.33	13.33
Bco 3	3	22.00	0.20	0.91	18.67	26.00	7.33
G.Unar 1	3	10.47	1.33	12.72	8.00	12.67	4.67
G.Unar 2	3	10.27	1.00	9.76	4.67	13.33	8.66
G.Unar 3	3	11.50	1.22	10.58	7.33	16.00	8.67
Unión 1	3	18.90	4.25	22.49	16.00	22.67	6.67
Unión 2	3	15.27	0.47	3.10	12.67	19.33	6.66
Unión 3	3	17.23	2.02	11.73	13.33	23.33	10.00
TOTAL	27	17.86	6.94	38.82	4.67	39.33	34.66

Bco: Buesaco; G.Unar: Granja Universidad de Nariño

La tabla 17 permite evaluar algunos estadísticos para el *S. aureus* en cada uno de los tres niveles de zona analizados por el método de Kirby-Bauer. De igual manera como se estudió en el caso de la *E. coli*, el propósito principal de este análisis de varianza de un factor es el de comparar las medias de los diferentes niveles, enlistados bajo la columna de Promedio. No obstante, la columna referente a la desviación estándar revela una diferencia entre la desviación más pequeña y la más grande (0,20 y 4,25 respectivamente) de más de 3 a 1, con lo

cual se presentan divergencias puesto que el análisis de varianza considera que las desviaciones estándar de todos los niveles de zona analizados es igual.

La información contenida en las anteriores tablas señala la existencia de diferencias significativas respecto a la influencia de los EEP en la inhibición del crecimiento del *S. aureus* y la *E. coli* observando que las muestras de EEP del municipio de Buesaco presentan mayor inhibición para los dos microorganismos (figura 54 y 55) al registrar halos superiores a los correspondientes de La Unión (figura 56 y 57) y de la Granja Botana. Cabe anotar que los tamaños del diámetro del halo de inhibición para *S. aureus* en el total de ensayos fueron mayores respecto a los expuestos sobre *E. coli*. Además, *S. aureus* fue inhibido más fuertemente por los EEP con halos máximos de inhibición entre 12,7 y 39,3 mm, superiores a los reportados por MARTÍNEZ, et al., (2002), que oscilan entre 18,0 a 20,0 mm.

Figura 54. Halos de Inhibición en *E. coli*. EEP Municipio Buesaco. Método Kirby-Bauer.

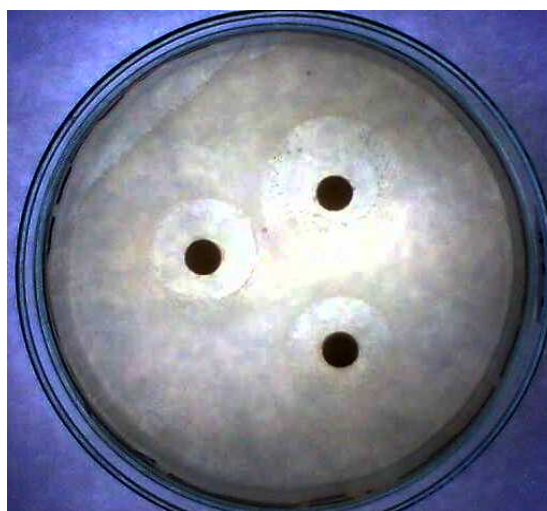


Figura 55. Halos de Inhibición en *S. Aureus*. EEP Municipio Buesaco. Método Kirby-Bauer.



Figura 56. Halos de Inhibición en *E. coli*. EEP Municipio La Unión. Método Kirby-Bauer



Figura 57. Halos de Inhibición en *S. Aureus*. EEP Municipio La Unión. Método Kirby-Bauer.



Como segunda prueba de sensibilidad antibiótica se aplicó el método de difusión en pozos, caracterizado por incluir el microorganismo de prueba en la segunda capa del medio de cultivo. El registro de los halos de inhibición se realizó de forma análoga al método de Kirby-Bauer, con la diferencia que el extracto etanólico es depositado en una superficie libre del medio de cultivo (pozo), para que la zona de inhibición se refleje en una superficie periférica sobre el pozo.

Observando el anexo R, los EEP de Buesaco y de la Granja Botana presentan halos de inhibición máximos y mínimos para la *E. coli* en un mismo valor (10 mm), este bajo índice se debe a la dificultad que se tuvo en la medición exacta de la zona de inhibición, por tal razón no se desarrollo un análisis estadístico como en el caso de la prueba de Kirby-Bauer. Este comportamiento se evidencia en las figuras 59 y 59, donde no se observa la formación de un halo bien definido o de tamaño considerable. Una de las posibles razones de este hecho es el tamaño molecular de los agentes antimicrobianos presentes en los extractos, que retarda su difusión a través del medio de cultivo y la acción frente al microorganismo, catalogándolo de manera errónea como resistente. Respecto a los ensayos realizados con EEP de La Unión se observa una capacidad inhibitoria máxima comprendida entre 14,7 y 16,0 mm, presentando mayor divergencia respecto a los resultados de la actividad inhibitoria de las otras dos zonas.

Figura 58. Halos de Inhibición en *E. coli*. Método de difusión en pozos.



Figura 59. Halos de Inhibición en *S. Aureus*. Método de difusión en pozos.



De acuerdo con la figura 59, la bacteria Gram positiva *S. aureus* mostró la mayor sensibilidad en el 100% de los ensayos, con valores de inhibición máximos de 17,3 mm para la Granja Botana, 21,3 mm para los EEP de Buesaco y 27,3 mm para el caso de La Unión, siendo estos resultados consecuentes con los reportados en la prueba de sensibilidad por el método de Kirby-Bauer.

Al comparar la actividad antibacteriana de los EEP por los dos métodos, se establece una diferencia significativa en cuanto al tamaño de las zonas de

inhibición, siendo mayor la eficiencia del método de Kirby-Bauer para los propóleos de Buesaco, mientras que, según el método de Difusión en Pozos los propóleos de la Unión presentan mayor actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano; no obstante este método es menos confiable debido a las razones ya expuestas.

Inicialmente los resultados de los anexos Q y R enuncian que la bacteria Gram positiva (*S. aureus*) es más sensible frente a una menor concentración de propóleo, mientras que la Gram negativa (*E. coli*) demuestra una sensibilidad menor en la mayoría de las muestras evaluadas. La baja sensibilidad de *E. coli* está en conformidad con lo encontrado en numerosos análisis practicados con organismos de baja sensibilidad o no sensibles para la totalidad de los propóleos. (TSAI, G.J. et al., 1999; SANTOS, F. et al., 2002; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997; SCAZZOCCHIO, F. et al., 2006; DOBROWALSKI, J.W. et al., 1991). Sin embargo, no es posible ni tampoco recomendable generalizar que las bacterias Gram negativas sean insensibles a los EEP, ya que los reportes bibliográficos indican que microorganismos como *P. syringae* tienen una sensibilidad similar a las Gram positivas en altas concentraciones de propóleo.

Una posible explicación a la menor sensibilidad de la *E. coli* como organismo Gram negativo, puede deberse a las características de su doble membrana, quien inhabilita y/o retarda la penetración del propóleo en bajas concentraciones.

Una segunda justificación es el considerar que los microorganismos Gram negativos son más resistentes a los propóleos debido a que presentan resistencia a múltiples drogas, empleando un mecanismo de liberación de toxinas anfipáticas al exterior de la membrana, como ha sido claramente justificado en *E. coli* (WALKER, C., 2000; PARK, Y. et al., 1998).

La presencia de propóleos en concentraciones más bajas que el nivel inhibitorio puede ocasionar el crecimiento de un organismo que podría ser inhibido o destruido por altas concentraciones, este es el fenómeno llamado Hormesis. (BURDOCK, G., 1998) Esta situación demuestra que los propóleos están siendo utilizados en el tratamiento de infecciones en concentraciones por debajo de los valores de la IMC, favoreciendo la reducción del riesgo de proliferación o crecimiento en el lugar de aplicación. En general, la actividad antibacteriana de los propóleos se atribuye al contenido de flavonoides (quercetina, galangina, pinocembrina) y ácido caféico, ácido benzoico, ácido cinámico tal como lo refieren diversos autores como LEFKOVITS, et al., (1997), CHAILLOU, et al., (2004) y PRINCIPAL, (2005). Sin embargo, los propóleos estudiados mostraron valores medios de flavonoides, variando de 30,20 a 73,69%, por lo que se los puede considerar como extractos de gran potencial antibacteriano quienes probablemente actúen en la membrana bacteriana o en un sitio de la pared celular

causando daños estructurales o funcionales. (MARCUCCI, 1995; COOK y SAMMAN, 1996; MIRZOEVA, et al., 1997; GATTO, et al., 2002).

Desde un segundo punto de vista y en consecuencia con la información consignada anteriormente respecto al tamaño del halo y al grado de susceptibilidad, la efectividad de los compuestos con actividad antibacteriana presentes en los EEP puede ser atribuida al mayor contenido en fenoles totales para cada una de las muestras analizadas. Es por ello, que el potencial antimicrobiano de los EEP del departamento de Nariño depende funcionalmente del número y cantidad de flavonoides solubles en medio alcohólico y del sinergismo que puede darse entre ellos, de hecho esto incrementa la acción antimicrobiana de los EEP.

KEDZIA, V. et al., (1990) proponen que la acción antibacteriana de los propóleos es compleja y puede deberse al sinergismo entre los flavonoides, ácidos hidroxílicos y sesquiterpenos, porque se ha demostrado que un componente aislado del propóleo no expresa una alta actividad como si lo hace el extracto total. El sinergismo entre los diferentes componentes del propóleo es reportado de manera minuciosa por SCHELLER, S., et al., (1993) y luego confirmado por SCAZZOCCHIO, F., et al., (2006). Como consecuencia, en diferentes muestras, la combinación de diferentes sustancias puede ser esencial para la actividad biológica del propóleo. Así también, CHANG, et al., (2002) reportan que los propóleos contienen varios tipos de flavonoides como flavonoles, flavanonas e isoflavonas, componentes que generalmente son los responsables de la actividad antibacteriana (HERNANDEZ y BEMAL, 1990; SFORCIN, et al., 2000).

LU, et al., (2005) también observaron que dichos agentes responsables de la actividad antibacteriana en el extracto etanólico de propóleo ejercen actividad antioxidante.

Así mismo, un efecto post-antibiótico de los EEP se evidenció gracias a la persistente inhibición del crecimiento bacteriano, efecto que fue muy marcado aún en bacterias Gram negativas cuya susceptibilidad llega a superar un período de 12 horas.

En conclusión, todas las muestras de EEP analizadas mostraron actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*; no obstante, no existen diferencias que demarquen un alto grado de significancia en la actividad entre las muestras analizadas. Los resultados indican que la mayor actividad frente a bacterias Gram positivas como el *S. aureus* no depende de forma exclusiva de un tipo especial de flavonoide, pero si del efecto sinérgico de todos los compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos también permiten suponer una gran utilidad práctica de los propóleos dada su rápida acción con dosis relativamente bajas que conjuntamente a la actividad bactericida sinérgica de los antibióticos presentes en los EEP podría reducir el uso de medicamentos sintéticos y toda la problemática asociada a ello.

CONCLUSIONES

Las características fisicoquímicas de los propóleos de zonas analizadas permiten diferenciarlos, ya que son propias para cada zona y dependen principalmente de su origen floral y biogeográfico, siendo influenciadas por las condiciones ambientales.

No existe un valor estándar referente al índice de oxidación puesto que difieren de forma significativa en virtud a las características propias de la zona, siendo impreciso correlacionar directamente con el contenido de fenoles.

Los propóleos de los municipios de Buesaco y La Unión presentan mejores condiciones físico-químicas, por su alto contenido de resinas y sólidos solubles, así como bajos contenidos de masas mecánicas y ceras, parámetros que pueden conferirles aplicaciones agroindustriales.

El análisis mineral por absorción atómica señala una menor variabilidad en el contenido de sodio y potasio, además denota al calcio y potasio como los minerales más representativos para los propóleos de *bh-PM*, *bh-MB* y *bmh-PM*.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que los propóleos del Departamento de Nariño presentan un elevado contenido de compuestos biológicamente activos como fenoles tipo flavonoide, no existiendo diferencias significativas entre las zonas de muestreo.

La concentración de flavonoides estimada por el método colorimétrico del cloruro de aluminio, fue más bajo para flavonas y flavonoles, respecto a los observados en la determinación de flavanonas con la técnica de la 2,4 -Dinitrofenilhidrazina, mostrando un mayor contenido de flavonoides en las muestras provenientes del municipio de La Unión.

Los EEP mostraron un efecto bactericida significativamente mayor sobre *S. aureus*, en comparación a la actividad sobre *E. coli*. Los resultados indican que la mayor actividad frente a bacterias Gram positivas como el *S. aureus* no depende de forma exclusiva de un tipo de flavonoide, pero si al efecto sinérgico de todos los compuestos fenólicos.

Los halos inhibitorios del crecimiento bacteriano expuestos en los ensayos de actividad biológica permiten admitir una gran utilidad práctica, dada su rápida acción con dosis relativamente bajas, conllevando a proponer una terapia combinada en virtud a su actividad bactericida, sinergismo, así como la posible reducción de resistencia a los agentes antibióticos presentes en los EEP.

El efecto post-antibiótico de los EEP pudo ser elucidado gracias a la persistente inhibición del crecimiento bacteriano, efecto que fue muy marcado aún en bacterias Gram negativas cuya susceptibilidad llega a superar un período de 12 horas. Sin embargo, se esperaría que el efecto post-antibiótico sea mayor cuanto mayor sea la concentración de los agentes de acción antibiótica en los EEP.

La técnica de espectrometría de masas modo positivo fue de gran utilidad en la identificación de la estructura de los flavonoides, el tipo de sustitución de los anillos A y B, la caracterización de los enlaces C-glicosídicos y la secuencia de fragmentación iónica de las flavonas, flavonoles y flavanonas contenidos en los EEP.

Los flavonoides presentes en los EEP corresponden a las formulas moleculares de Pinocembrin-8C-glucósido, 6,8,5'-trimetoxi luteolin 7-metil éter, 6-secbutenil-6,8-dial luteolina, 2,2-dimetil-2-ol-6-carboxietenil benzopirano, Genkwuanina, Ramnetina y Crisina-8C-desoxiglucosido.

RECOMENDACIONES

Es aconsejable efectuar estudios de evaluación y modificación de tipo químico a las moléculas tipo flavonoide presentes en los EEP del departamento de Nariño, con el fin de clarificar la relación estructura química-actividad biológica de este tipo de compuestos, especialmente aquellos con insaturación entre los carbonos 2 y 3 del núcleo y con múltiple sustitución con grupos hidroxilo, quienes podrían ser los responsables de sus perfiles biofarmacéuticos.

Los compuestos identificados en el estudio químico son de interés farmacológico en virtud a los buenos resultados obtenidos en las pruebas de antibiosis *in vitro*, por tanto, se sugiere que posteriores estudios farmacológicos y/o bioquímicos se profundicen en posteriores trabajos de investigación realizándolo *in vivo*.

Se propone evaluar la efectividad antimicrobiana de los extractos del propóleo tomado como criterios de evaluación la variación de la naturaleza o tipo de solvente empleado, la procedencia del propóleo, así como la especie de microorganismo de prueba, con el fin de estimar cual es microorganismo más sensible y más resistente, y bajo qué condiciones experimentales.

Se recomienda para próximos proyectos de investigación la profundización en los procesos de aplicación y pruebas de laboratorio y médicas de los EEP como agente antimicrobiano basados en la evidencia de su acción, a fin de evitar el uso irracional de medicamentos sintéticos que en la práctica médica generan efectos secundarios; así como también proyectar estos conocimientos para fomentar cambios positivos en los estilos de vida y en la aplicación de métodos naturales o alternativos a la medicina tradicional.

De acuerdo con investigaciones consultadas de manera previa, se sugiere la implementación de la técnica de espectrometría de masas en modo positivo así como en modo negativo, para la identificación de las estructuras de las moléculas tipo flavonoide que hayan de estar presentes en los extractos etanólicos de propóleo, puesto que con estos dos procedimientos sería posible dilucidar un mayor número de técnicas, sugerencias o recomendaciones a seguir en el trabajo de examinar los grupos sustituyentes, el tipo y ubicación de los mismos, enlaces, las unidades glucosídicas conjugadas a las estructura del flavonoide, así como la posible ruta de fragmentación tanto de la unidad azúcar como del anillo básico.

Se sugiere llevar a cabo el estudio de la actividad antibacterial de los extractos etanólicos de propóleo en bacterias aisladas clínicamente, evaluando su concentración inhibitoria y su acción en algunos factores de virulencia como las enzimas lipasa y coagulasa comparándolos frente a lo manifestado a un mayor número de antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

ADELMANN, J., PASSOS, M., BREYER, D-H., ROCHA DOS SANTOS, M-H., LENZ, C., FERREIRA LEITE, N., LANÇAS, F-M., FONTANA, J-D. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, 43, 174–178.

AGA H, SHIBUYA T, SUGIMOTO T, KURIMOTO M, NAKAJIMA SH. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994;58:945–6.

AHN, M-R., KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T., BANG, K-S., NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, 7286-7292.

AHN, M-R., KUMAZAWA, S-A., USUI, Y-A., NAKAMURA, J., MATSUKA, M-B. ZHU FC., TSUTOMU, N. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*. 2007, 101(4), 1383-1392.

AMADO, E., ANDERSSON, H., BARDOEZ, S., SERRA, F., Cost 916: Polyphenols in food; proceedings of a European cost concerted action scientific workshop, Aberdeen, 1997.

AMOROS, M., LURTON, E., BOUSTIE, J., GIRRE, I., SAUVAGER, F., CORMIER, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*. 1994, 64, 235-240.

ASIS, M. Propóleos: El Oro Púrpura de las Abejas: Centro de Información y Documentación Agropecuaria. CIDA. Ciudad de La Habana, Cuba, 1991 p. 123.

ASSEGID GAREDEW, ERIK SCHOMOLZ, INGOLF LAMPRECHT. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. *Thermochimica Acta* 422, 2004. p. 115–124.

BANKOVA V. S.; POPOV, S.S. y MAREKOV, N.L. High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *En: Journal of chromatograph*. (242), 1982, p. 135-143.

BANKOVA, V-S., DE CASTRO, S-L., MARCUCCI, M-C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000, 31, 3-15.

BANSKOTA, A-H., TEZUKA, Y., PRASAIN, J-K., MATSUSHIGE, K., SAIKI, I., KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*. 1998, 61, 896-900.

BANSKOTA, A., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K., KADOTA, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from brazilian propolis. *Journal of Natural Products*. 2000, 63, 1277-1279.

BEGG E.J., BARCGAT, M.L. Aminoglycosides. 50 years on. *Br J. Clin. Pharmacol*, 1995, 39(6): 597- 603.

BELESTRIERI, F., MARINI, D. Complementi alimentari a base di polline, propoli e gelatina reale: determinazione quanti-tative dei principi. En: *Rivista de la Societa Italiana di Scienza de la Alimentaciones*. Vol 2 (1987) 1430148.

BERHOW, M. A., VAUGHN, S. F. Higher plants flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology. In *Principles and Practices in Plant Ecology, Allochemical interactions*; CRS Press: Boca Raton, FL, 1999, 423-437

BIANCHI, Eduardo M. *Calidad del propóleos*. Santiago del Estero. Argentina: C.E.D.I.A., 1996

BORELLI, F. *et al.* Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. 73 (Suppl 1), 2002, p. 53– 63

BRETZ, W. *et al.* Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. En: *Z Naturforsch C A J Biosci*. Vol (53). 1998, p. 11-12: 1045-1048.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*. 1998, 36, 347-363.

CARDILE, V., PANICO, A., GENTILE, B., BORRELLI, F., RUSSO, A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*. 2003, 73, 1027–1035

CASTALDO, S., CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002, 73 Suppl. 1, S1-S6.

CASTELLOTTI, G. y BENDAZZOLI, P. Determinazione della frazione flavonoidica e degli acidi fenolici nella propoli. *Erbori. Doma*. (3) 1997, p. 102- 105.

CASTRO, S-L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Science*. 2001, 3, 49–83.

CHAILLOU, L., H. A. HENERA y J. F. MAIDANA. Estudios de propóleos de Santiago. Argentina. Cien. Tecn. Alim. 2004, 24 (1), p. 11-15.

CHAMBERS, HF, SANDE, MA. Antimicrobial agents. The aminoglycosides. En Hardman JG, Limbird LE, Goodman A, eds. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1995; p. 1.103-1.121.

CHANG, C., *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food & Drug Analysis*. (10) 2002, p. 178-182.

CHOI, Y-M., NOH, D-O., CHO, S-Y., SUH, H-J., KIM, K-M., KIM, J-M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 2006, 39 756–761.

COOK, N.C., SAMMAN, S., 1996. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr. Biochem*. 7, 66–76.

CORTOPASSI, G, HUTCHIN, T. A molecular and celular hypothesis for aminoglycoside-induced deafness. *Hear Res*. 78(1), 1994, p. 27-30.

CUESTA RUBIO, O., CUELLAR CUELLAR, A., ROJAS, N., VELEZ CASTRO, H., RASTRELLI, L., AQUINO, R. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*. 1999, 62, 1013-1015.

CUESTA RUBIO, O., PICCINELLI, A-L., CAMPO FERNANDEZ, M., MARQUEZ HERNANDEZ, I., ROSADO, A., RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 7502- 7509.

CUYCKENS, F., MA, Y., POCSFALVI, G. CLAEYS, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoide glycosides. *Analisis* (10), 2000, p. 888-895.

DANTAS, A-P., OLIVIERI, B-P., GOMES, F., DE CASTRO, S-L. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, 103, 187–193.

DAS, Dk. Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry and high performance liquid chromatography methods for separation and chaeacterization. *Methods Enzymol*. 1994. p. 234, 410 – 420.

DE CARVALHO MACHADO, G-M., LEON, L-L., LISBOA DE CASTRO, S. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2007, 102(1), 73 – 77.

DELGADO RODRÍGUEZ, A. Los aminoglucósidos. Rev. Acta Méd. 1990; 4(2): 238 – 46.

DOBROWALSKI, J.W., VOHORA, S.B., SHARMA, K., SHAH, S.A., NAQVI, S.A.H., DANDIYA, P.C., 1991. Antibacterial, anti-fungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. J. Ethnopharmacol. 35, 77– 82.

DOUGLAS, M. y BENNETTS. Principles and Practice of Infections Disease – 4 th Edition, 2000, 1-40.

GATTO, M.T., FALCOCCHIO, S., GRIPPA, E., MAZZANTI, G., BATTINELLI, L., NICOLOSI, G., LAMBUSTA, D., SASO, L., 2002. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C163-O-acyl-esters. Bioorg. Med. Chem. 10, 269–272.

GHISALBERTI, E. L. Propolis. En: Bee World. Vol 60. 1978, p. 58.

GHISALBERTI, E. Propolis: A review. En: Bee World. Vol.60, No.2. 1979, p. 59-84.

GÓMEZ CARAVACA, A-M., GÓMEZ ROMERO, M., ARRÁEZ ROMÁN, D., SEGURA CARRETERO, A., FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006, 41, 1220–1234.

GOMEZ, L. y OJEDA, C. Comercialización Asociativa de Productos Apícolas en el Departamento de Nariño. San Juan de Pasto, 2002. 50p : il. Trabajo de Grado (Especializta en Gerencia del Mercadeo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas. Departamento de Administración de Empresas.

GONZALEZ, A. y BERNAL, R. Propóleos: Un camino hacia la salud. Cuba: Pablo de la Torriente, 1997. p. 120.

GRANGE JM, DAVEY RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). J R Soc. Med. 1990; 83:159–60.

GREENWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. The composition and plants origins of propolis: a report of work at Oxford. Bee Word 71. 1990, 107-118.

GOUDARD, L.; LIN, L.Z.; MUKHOPADYAY, S.; ROBBINS, R.J.; HARNLY, J.M. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Comp. Anal.* 2007. 9p.

HARBORNE, J. The flavonoid: Advances in research since. 1986: London: Chapman and Hall. 1994.

HAVSTEEN, B-H: Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1993, 32:1141-1148.

HAVSTEEN, B-H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002, 96, 67–202.

HAYACIBARA, M., KOO, H., ROSALEN, P., DUARTE, S., FRANCO, E., BROWEN, W., IKEGAKI, M., CURY, J. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol (101)*. 2006, 110-115.

HEGAZI, A. y ABD EL HADY, F. Egyptian propolis: Antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. En: *Z Naturforsch.* Vol 56, No 1-2. 2001, p. 82- 88.

HELLNER, W., FORKMANN G. Biosynthesis. En: Harborne JB. Ed. *The Flavonoids. Advances in research since 1986.* London. Chapman and Hall. 1993, p. 499-535.

HERNANDEZ, N.M.R., BEMAL, K.C., 1990. Efecto antibiótico del propóleo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* origen clínico humano. *Rev. Cubana Farm.* 24, 45 – 50.

HIKMET, G., BURHAN, A., GOKHAN, D., SELIM, E. and ISMET, Y. Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *Americal Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1(1),2005, 27-31.

HU, F., HEPBURN, H., YINGHUA, L., CHEN, M., RADLOFF, S., DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 100, 276-283.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES. Catálogo de datos geográficos. Departamento de Nariño. 2009

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Anexo 23. Escala de McFarland. Bogotá: Grupo de Microbiología. p. 51

IORISH, N. Propóleos. Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización con fines terapéuticos. Comisión Permanente de Tecnología y Utilaje apícolas. Editorial Apimondia. Bucarest. Rumania, 1975. Capítulo IV: Empleo del Propóleos en medicina, p. 89-90.

JUSTESEN, U.. J. Chromatographic A 902. 2000, 369.

KEDZIA, B., GEPPERT, B., IWASZKIEWICZ, J., 1990. Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis. *Phytotherapie* 6, 7 – 10.

KEEN Cl., HOLT Rr., OTEIZA P., FRAGA C., SCHMITZ H. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J. Clin Nutr.* 2005, p. 298, 303.

KILIC A, BAYSALLAR M, BESIRBELLIOGLU B, SALIH B, SORKUN K, TANYUKSEL M. In vitro antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Ann Microbiol* 2005;55:113–7

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOVA, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology.* 1999, 64, 235-240.

KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry.* 2004, 84, 329-339.

LEE, S. E., SHIN, H. T., HWANG, H. J., & KIM, H. J. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadar* seed. *Phytotherapy Research.* 2003. 17, 1041–1047.

LEFKOVITS, I. Z.Z. SA y P.B. Fischer. Caffeic acid phenethyl ester profoundly modifies protein synthesis profile in type 5 adenovirus transformed cloned rat embryo fibroblast cells. *Int. J. Oncologi.* 11 (1). 1997, p. 59-67.

LUCENA, MI. ANDRADE, RJ, CABELLO, Mr. Aminoglycoside antibiotics induce aggregation but no fusion of negatively-charged liposomes. *Eur J Pharmacol* 289 (2). 1995, p. 321-33.

LU, L-C., CHEN, Y-W., CHOU, C-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology.* 2005, 102, 213 - 220

MAIDANA, F. Características Físico-químicas del Propóleos de la República Argentina. Tucumán. Tesis Doctoral, para obtener el título de Doctor en Biología. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Tucumán. Argentina, 1997. 250 p.

MARCUCCI, M. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *En: Apidologie*. Vol 26. 1995, p. 83-99.

MARCUCCI, M.C., FERRERES F., GARCÍA-VIGUERA C., BANKOVA V.S., DE CASTRO S.L., DANTAS A.P., VALENTE P.H.M., PAULINO N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001, 74,105–112.

MARQUELE, F-D., DI MAMBRO, V-M., GEORGETTI, S-R., CASAGRANDE, R., VALIM, Y., FONSECA, M-J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, 39, 455-462.

MARTÍNEZ, I., VALVERDE, M., GASPARD, ROS. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Unidad Docente de Bromatología e Inspección de Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo, Murcia, España. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Rev. ALAN V. 50 N.1 Caracas, Marzo. 2000.

MARTINEZ, T. y FIGUEROA, J. Evaluación microbiológica de extractos de propóleo colombianos. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Trabajo de investigación apícola. 2002.

MATSUDA, J.; HAVSTEEN, B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 2002, 32:1141 – 1148.

MENESES RAMIREZ, E-A. Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del propoleos recolectado en el apiario de la universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 2006.

M.I. NIEVA MORENO, M.; M.I. ISLA N. G. CUDMANI, M. A. vattuone and A.R. Sampietro, Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) Propolis. *J. Ethnopharmacol*. 68 (1999) 97 – 102.

MIKSICEK, P. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol*. 1993, p. 37-44.

MIRZOEVA, O., GRISHANIN, R. CALDER, P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* (52). 1997, p. 239-246.

MISHIMA, S., INOH, Y., NARITA, Y., OHTA, S., SAKAMOTO, T., ARAKI, Y., SUZUKI, K-M., AKAO, Y., NOZAWA., Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of

granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005, 13, 5814 – 5818.

MOREIRA, L., DIAS, L-G., PEREIRA, J-A., ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46, 3482–3485.

NAGY, M. y GRANCAI, D. Colorimetric determination of flavonones in propolis. *Pharmazie*. (51). 1996, p. 100- 101.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 4th ed. Approved Standard M11-A4, 1997.

NOUR-EDDINE, ES-SAFI; LUCIEN, KERHOAS; EINHORN, JACQUES; PAUL, DUCROT. Application el ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside and luteolin 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside. *J. Mass spectrometry* 247. 2005, 93 -100.

ORSOLIC, N., KNEZEVIC, A-H., SVER, L., TERZIC, S., BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, 94, 307–315.

OKSUZ, H.; DURAN, N.; TAMER, C.; CETIN, M.; SILICI, S. Effect of Propolis in the Treatment of Experimental *Staphylococcus aureus* Keratitis in Rabbits. *Ophthalmic Res.*, 2005; 37: 328 – 334.

OZKUL, G.; BASTOS, E.M. Botanic origin of green propolis. In: *J. Propolis. Res. Assoc. Toquio, Japan.* , 2003.

PALOMINO, G., LADY ROSSANA. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Facultad de Ciencias - Escuela de Química. Medellín. 2009, 74

PARK, Y. y IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (62). 1998, p. 2230- 2232.

PARK, Y., IKEGAKI, M., ABREU, J., ALCICI, N. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc Tecnol Aliment.* (18). 1998, p. 313-318.

PIETTA, P.G., GARDANA, C., PIETTA A.M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 Suppl. 1 (2002) S7–S20.

POPOVA, M., BANKOVA, V., BUTOVSKA, D., PETKOV, V., NIKOLOVA DAMYANOVA, B., SABATINI, A-G., MARCAZZAN, G-L. BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*. 2004, 15, 235-240.

POPOVA, M., SILICI, S., KAFTANOGLU, O., BANKOVA, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. 2005, 12, 221-228.

PORTO, A., MACHADO, S., DE OLIVEIRA, C., BITTRICH, V., AMARAL, M., MARSAIOLI, A. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* oral resins. *Phytochemistry*. 2000, 55, 755-768.

PRINCIPAL, J. El propóleo. Prospectivas terapéuticas en la medicina humana y veterinaria. *Memorias I Congreso Internacional de Apicultores de los Andes y III Congreso de Apicultura*. San Cristibal. Tachira. Venezuela, 2005.

RAYMOND, E. MARCH; ERROL, G. LEWARDS; CHRISTOPHER, J. STADEY; XIU-SHENG, MIAO; XIAOMING, ZHAO; CHRIS D, METCALFE. A comparasion of flavonoid glycosides by electrospray tándem mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry* 248. 2006, 61- 85.

ROCHA PASIN, P.L.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 3, 2006. 249 – 254.

SALAMANCA, G. *et al.* *El sistema de control y puntos críticos en la extracción y beneficios de propóleos*. Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires, Argentina, Octubre, 2000.

SALAMANCA, G.; CORREA CARVAJAL, I.; PRINCIPAL, J. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En: XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. *Memorias XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas: Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 2002.

SALAMANCA, G., RAMÍREZ, C.; PUBIANO, L. Composición mineral de algunas muestras de propóleo colombiano colectados por *Apis Mellifera Escutellata*. <http://www.apicultura.com>. 19 Oct. 2005

SALATINO, A., WEINSTEIN TEIXEIRA, E., NEGRI, G., MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2005, 2(1), 33-38.

SANDE, M.A, MANDEL, GL. Los aminoglucósidos. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8 ed. Editorial Médica Panamericana. 1993: 1065 - 82.

SANTOS FA, BASTOS EM, UZEDA M, CARVALHO MA, FARIAS LM, et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 2002; 80:1–7.

SCAZZOCCHIO F, D'AURIA FD, ALESSANDRINI D, PANTANELLA F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 2006; 161:327–33.

SCAZZOCCHIO F, D'AURIA FD, ALESSANDRINI D, PANTANELLA F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 2006; 161:327–33.

SCHELLER, S. KROL, W.,, SHANI, J., PIETSZ, G., CZUBA, Z., 1993. Synergistic effect of ethanol extract of propolis and antibiotics in the growth of *Staphylococcus aureus*. *Drug Res.* 43, 607– 609.

SFORCIN, J.M., FERNANDES JR., A., LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73, 243– 249.

SINGLETON, V-L., ROSSI, J-A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 1965, 16,144-58

SOLANO, S. G. y CORONADO, A. Actividad antibacteriana y antifúngica de tres muestras de propóleo Nacional. Trabajo de grado (Farmacólogo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Bogotá, 2000, p.127.

SOLEO DE FUNARI, C., DE OLIVEIRA FERRO, V., MATHOR, M-B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology.* 2007, 111, 206–212.

STARZYK, J., SCHELLER, S., SZAARSKI, J., MOSKWA, M., STOJKO, A., *Arzneim- Forsch. Drug Res.* 27 (1997) 1198–1199.

STOBIECKI. M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry.* 2000, 54. 237 – 256.

TRUSHEVA, B., POPOVA, M., NAYDENSKI, H., TSVETKOVA, I., RODRIGUEZ, J. G., BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia.* 2004, 75, 683-689.

TRUSHEVA, B., POPOVA, M., BANKOVA, V., SIMOVA, S., MARCUCCI, M. C., LAGUNA, P., DA ROCHA PASIN, F., TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. Advance Acces Published. 2006, 1-6.

TSAI, G.J., SU, W.H., 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli. J. Food Prot. 62, 239–243.

TTGER, EC. Resistance to drugs targeting protein synthesis in mycobacteria. Trends Microbiol. 2 (10) 1994, p. 416-21.

USIA, T., BANSKOTA, A., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K., KADOTA, S. Constituents of chinese propolis and their antiproliferative activities. Journal of Naturals Products. 2002, 65, 673-676.

UZEL, A., SORKUN, K., ONCAG, O., COGULU, D., GENÇAY, O., SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiological Research. 2005, 160, 189-195.

VALCIC, S., MONTENEGRO, G., TIMMERMANN, B-N. Lignans from Chilean Propolis. Journal of Natural Products. 1998, 61, 771-775.

WALKER CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. Periodontol 2000; 10:79–88.

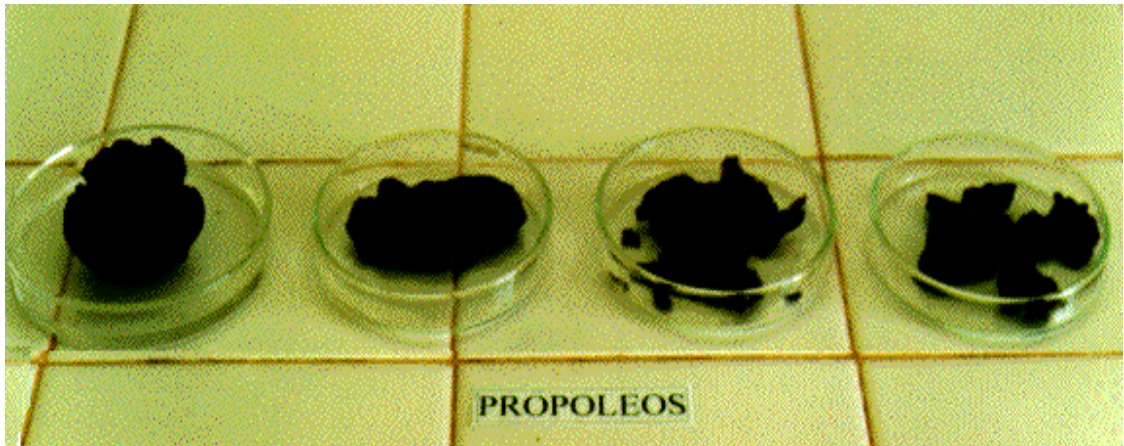
WANG, B-J., LIEN, Y-H., YU, Z-R. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. Food Chemistry. 2004, 86, 237-243.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K.R.; MAJOR, H.J.; HOSTETTMANN, K. J. Chromatographic. A 926. 2001, 29.

WOISKY, R-G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research. 1998, 37(2), 99-105.

ANEXOS

Anexo A. Muestras de resinas propólicas granuladas.



Anexo B. Muestras de resinas propólicas pulverizadas.



Anexo C. Protocolo del análisis fisicoquímico preliminar.

Sólidos fijos y sólidos totales: Una muestra de 2g de propóleo se colocó en un crisol limpio y tarado, se llevó a la mufla a una temperatura de 550 °C durante 24 horas, las cenizas se llevaron en un desecador hasta la balanza para ser pesadas.

Contenido de impurezas o masas mecánicas: En un cartucho de celulosa para Soxhlet se pesó 0,5g de la muestra pulverizada protegiendo el material pesado con una capa de algodón, enseguida se transfirió el cartucho al portamuestras para la extracción durante 10 a 12 horas empleando 90 mL de etanol al 96% y se controló la temperatura de tal manera que se obtenga entre 8 a 12 ciclos. El extracto se transfirió a un beaker lavando el balón Soxhlet con dos porciones de 5 mL de etanol al 96%. Luego se secó el cartucho a 45°C por 2 horas, se removió el residuo y se pesó.

Índice de Oxidación: En un tubo de ensayo se midió 0,5 mL de EEP diluido (2 mL de EEP llevados a 50 mL con agua destilada) y se mezclaron con 0,5 mL de agua destilada y 1 mL de ácido sulfúrico al 20%, se sometieron a refrigeración en baño de hielo de 2 a 5°C. Se adicionaron a continuación 50 µL de permanganato de potasio 0,1 N, solución estandarizada frente a oxalato de sodio hasta alcanzar el punto de equivalencia, finalmente se estimó el tiempo requerido para que la solución ácida de permanganato sea reducida.

Cera: El extracto obtenido de la extracción Soxhlet se refrigeró durante una noche para su posterior filtración (en un papel filtro previamente seco a 50°C y pesado), se lavó con tres porciones de 5 mL de etanol al 96% refrigerado y se aforó a 100 mL con el solvente empleado. El sólido se dejó a temperatura ambiente toda una noche, enseguida se secó a 50 °C por un periodo de 10 minutos, se dejó enfriar y se pesó.

Resinas: Se extrajo las resinas a partir de muestras de 1g colocadas en frascos ámbar con tapa, con 10 mL de etanol al 96% a 40°C, con agitación diaria de 30 minutos, durante 72 horas. Luego el frasco se llevó a 0°C durante 4 horas, se filtró para retener las ceras e impurezas mecánicas. Se eliminó el solvente del filtrado por evaporación suave y se determinó el contenido de resinas por gravimetría, que se expresó en porcentaje (P/P).

Acidez: Sobre 50 mL de agua destilada, recientemente hervida para eliminar el anhídrido carbónico y neutralizada con solución de hidróxido de sodio 0.05N en presencia de fenolftaleína, se agregó 1 mL del EEP y se tituló con la misma solución hasta la aparición del color rosado. El volumen total de la solución de hidróxido de sodio corresponde a la acidez total representada por los ácidos fijos y volátiles contenidos en el volumen de la muestra, con excepción del ácido carbónico eliminado con anterioridad.

Compuestos Fenólicos: Los compuestos fenólicos se determinaron mediante la técnica del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se trató el extracto etanólico de propóleos (0.1% v/v) con 2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agregó carbonato de sodio al 15% y se aforó a 20mL con agua destilada. Luego de 10 minutos de reposo se determinó la absorbancia a 765nm. La concentración de fenoles totales se obtuvo a partir de la curva de calibración construida con concentraciones conocidas de soluciones patrón de ácido gálico.

Anexo D. Condiciones del análisis por absorción atómica.

Elemento	λ (nm)	I (mA)	Combustible	L.D. Equipo	Rango lineal	Slit	Sensibilidad Equipo
Níquel	232.0	3.5	A/A: Oxidante	0,004	2,0	0,7	0,092
Zinc	213.9	5.0	A/A: Oxidante	0,0008	1,0	0,7	0,018
Hierro	248.3	5.0	A/A: Oxidante	0,003	5,0	0,2	0,10
Manganeso	279.5	5.0	A/A: Oxidante	0,001	2,0	0,2	0,052
Sodio	589.0	5.0	A/A: Oxidante	0,0002	1,0	0,4	0,012
Calcio	422.7	3.5	A/ON: Reductor	0,001	5,0	0,7	0,092
Potasio	766.5	5.0	A/A: Oxidante	0,002	2,0	1,4	0,043
Magnesio	285,2		A/A: Oxidante	0,00001	0,5	0,7	0,0078
Cobre	324,8		A/A: Oxidante	0,001	5,0	0,7	0,077

A/ON: Acetileno: Oxido nitroso; A/A: Acetileno: Aire

λ : Longitud de Onda

I: Corriente

L.D.: Límite de Detección.

Anexo E. Contenido mineral de los propóleos municipio de Buesaco.

MUESTRA	CONCENTRACION (ppm)								
	K	Na	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	Ni
1	1923,67	348,38	61,11	43,44	344,87	ND	10,48	64,49	ND
2	1257,34	376,84	63,79	36,67	243,27	ND	7,87	73,62	ND
3	1567,74	394,06	74,24	61,64	348,56	ND	16,37	80,45	ND
SD	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001
CV	0,74	0,87	0,62	0,69	0,80	0,62	0,65	0,62	0,42

ND, No Detectable

S.D, Desviación estándar

C.V, Coeficiente de Variación

Anexo F. Contenido mineral de los propóleos Granja Experimental Botana.

MUESTRA	CONCENTRACION (ppm)								
	K	Na	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	Ni
1	2018,74	353,71	2314,56	349,89	374,59	ND	100,31	89,77	0,86
2	1480,18	496,34	1780,76	322,05	291,77	ND	69,81	146,61	0,88
3	1977,64	430,65	3244,11	406,97	403,21	ND	103,36	90,83	3,08
SD	0,003	0,002	0,002	0,003	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002
CV	0,75	0,62	0,75	0,76	0,54	0,76	0,53	0,77	0,64

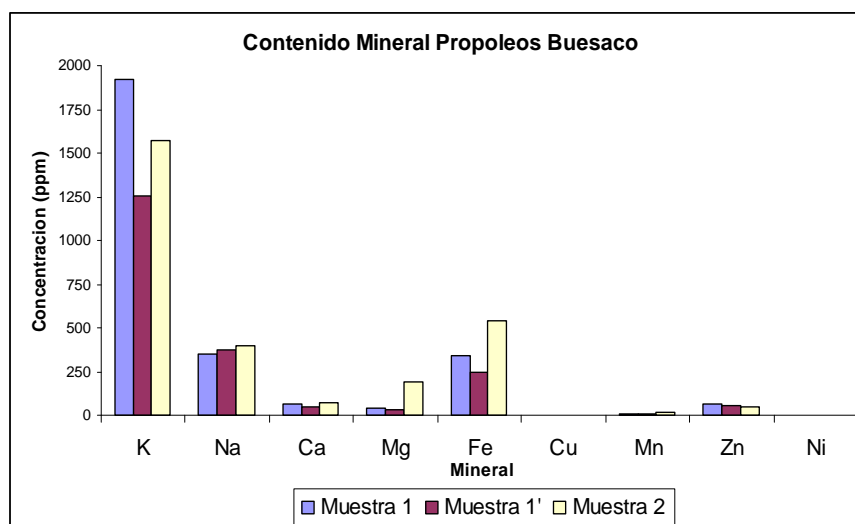
ND, No Detectable S.D, Desviación estándar C.V, Coeficiente de Variación

Anexo G. Contenido mineral de los propóleos municipio de La Unión.

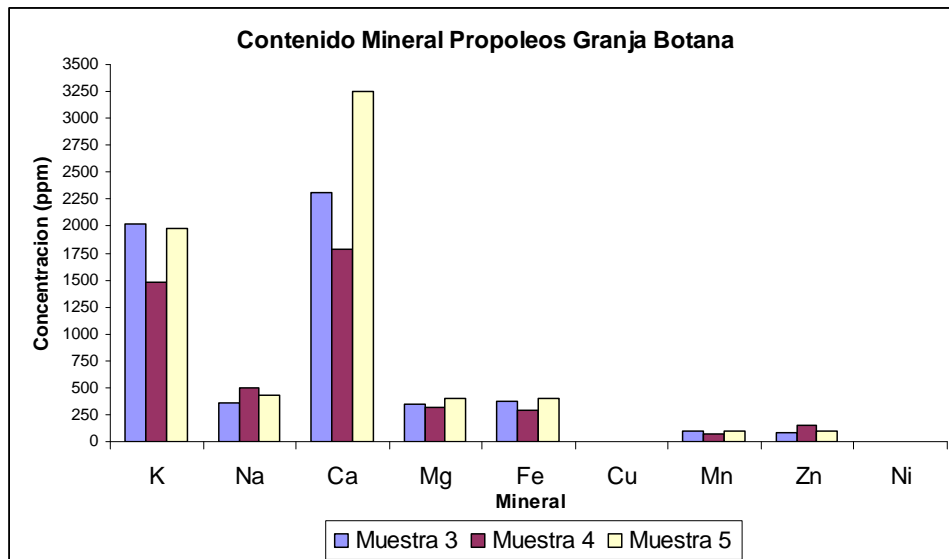
MUESTRA	CONCENTRACION (ppm)								
	K	Na	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	Ni
1	2064,66	332,56	873,30	683,08	93,15	ND	5,41	33,91	ND
2	2341,69	329,22	1103,74	649,67	99,20	ND	5,59	24,53	ND
3	1448,09	356,44	942,79	957,95	113,41	ND	5,93	46,37	ND
SD	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002
CV	0,89	0,56	0,67	0,74	0,67	0,58	0,35	0,58	0,67

ND, No Detectable SD, Desviación estándar CV, Coeficiente de Variación

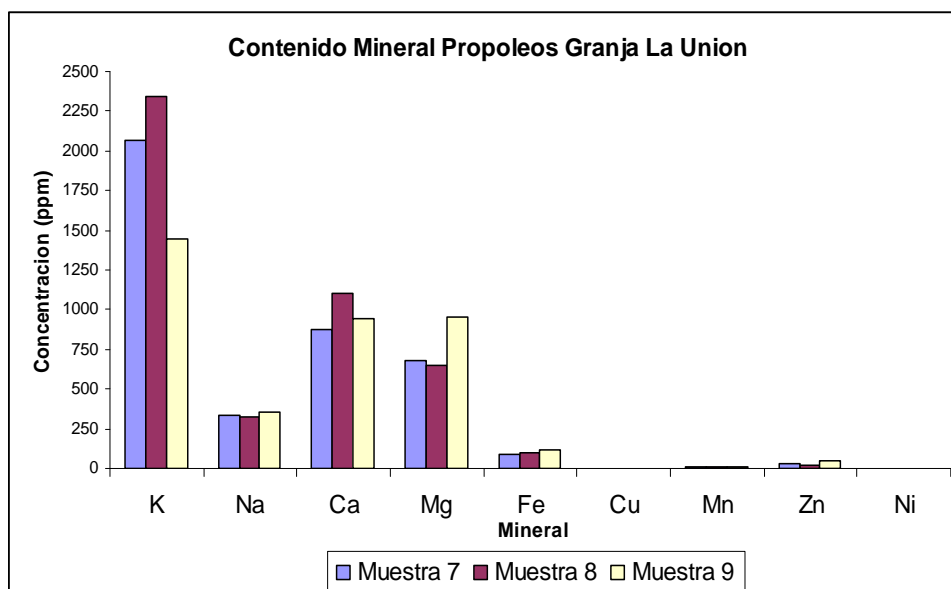
Anexo H. Análisis comparativo del contenido mineral de los propóleos del municipio de Buesaco.



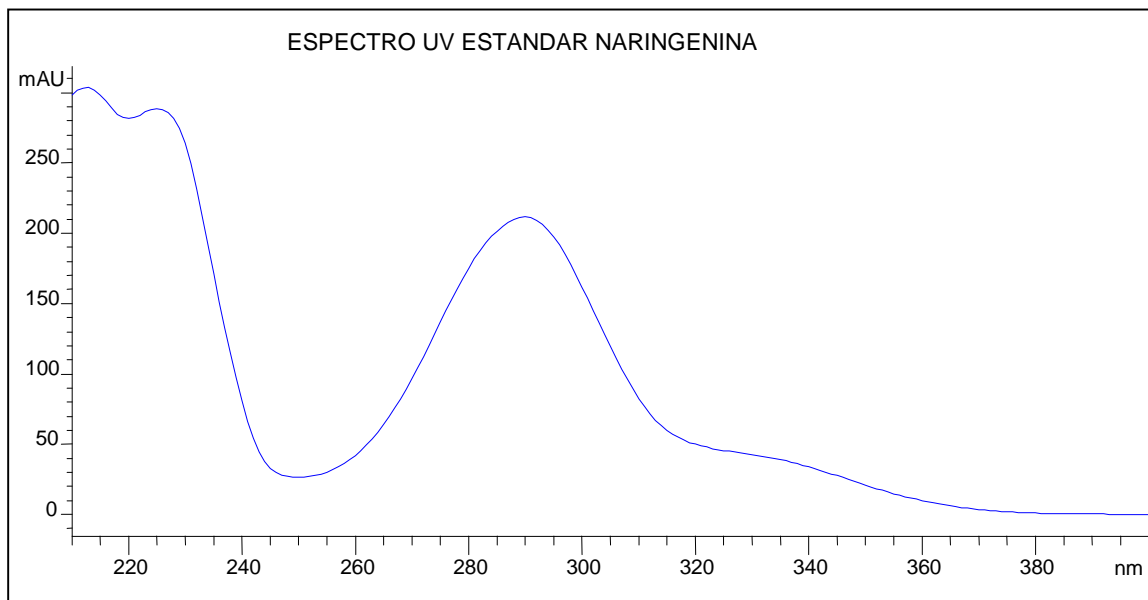
Anexo I. Análisis comparativo del contenido mineral de los propóleos de la Granja Experimental Botana UNar.



Anexo J. Análisis comparativo del contenido mineral de los propóleos del municipio de La Unión.

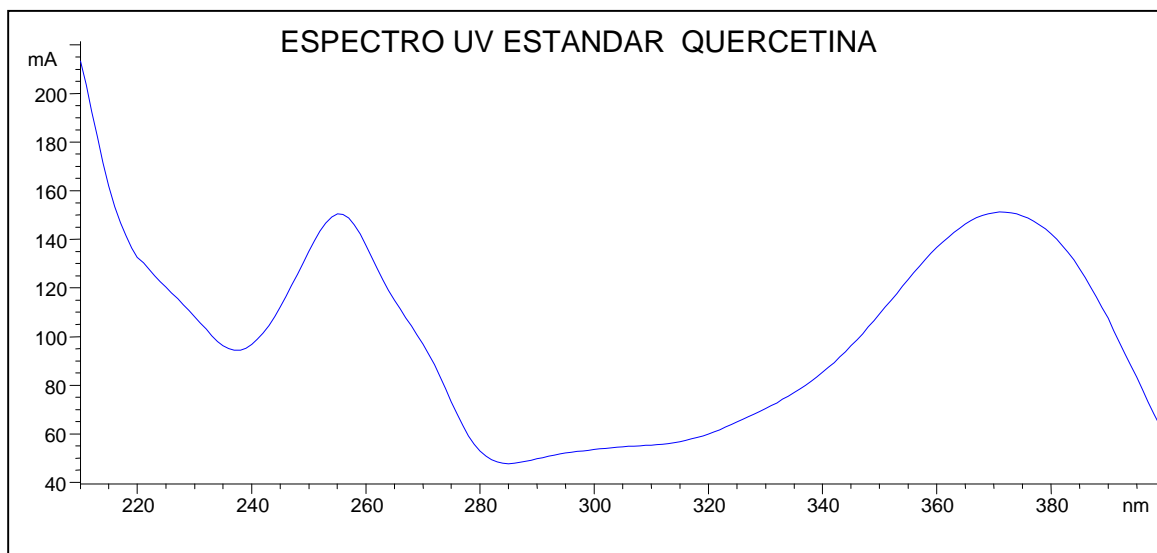


Anexo K. Espectro UV para el estándar Naringenina



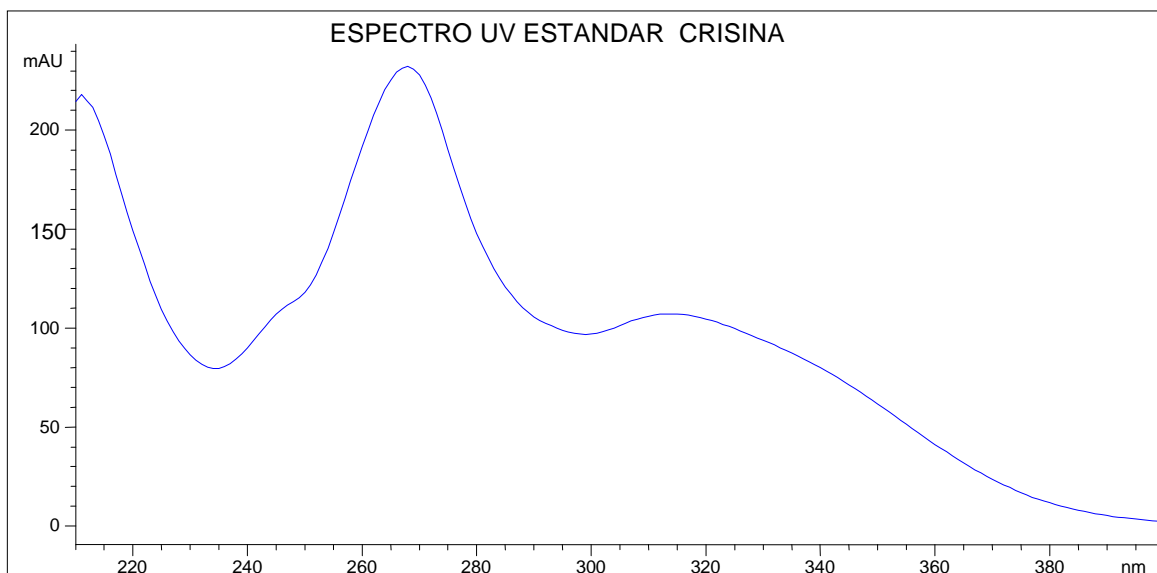
Esta figura señala un máximo de absorción a una longitud de onda de 295 nm para el estándar Naringenina

Anexo L. Espectro UV para el estándar Quercetina



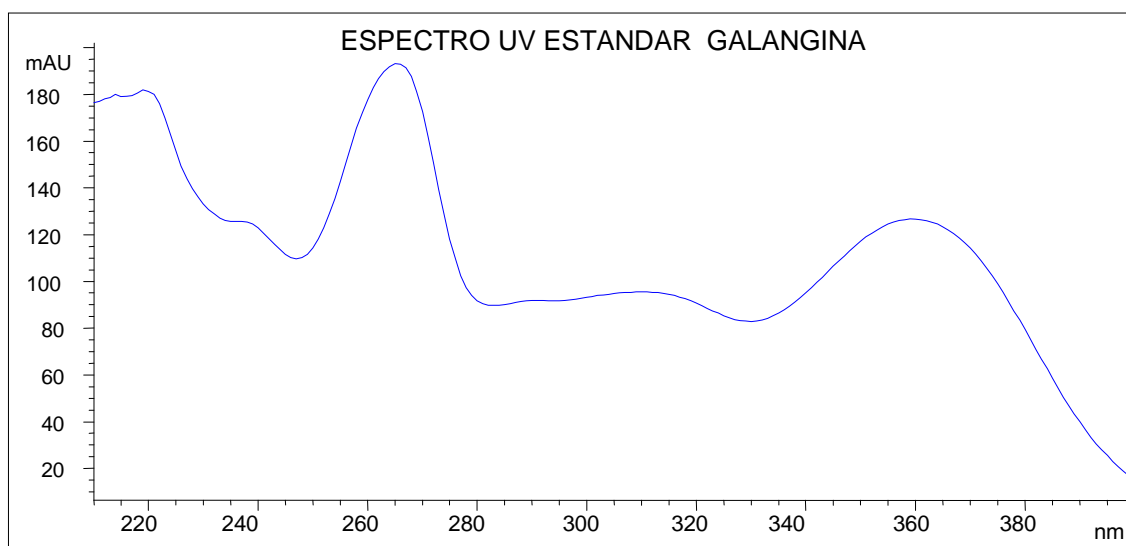
Esta figura señala dos máximos de absorción a una longitud de onda de 255 y 370 nm para el estándar Quercetina

Anexo M. Espectro UV para el estándar Crisina



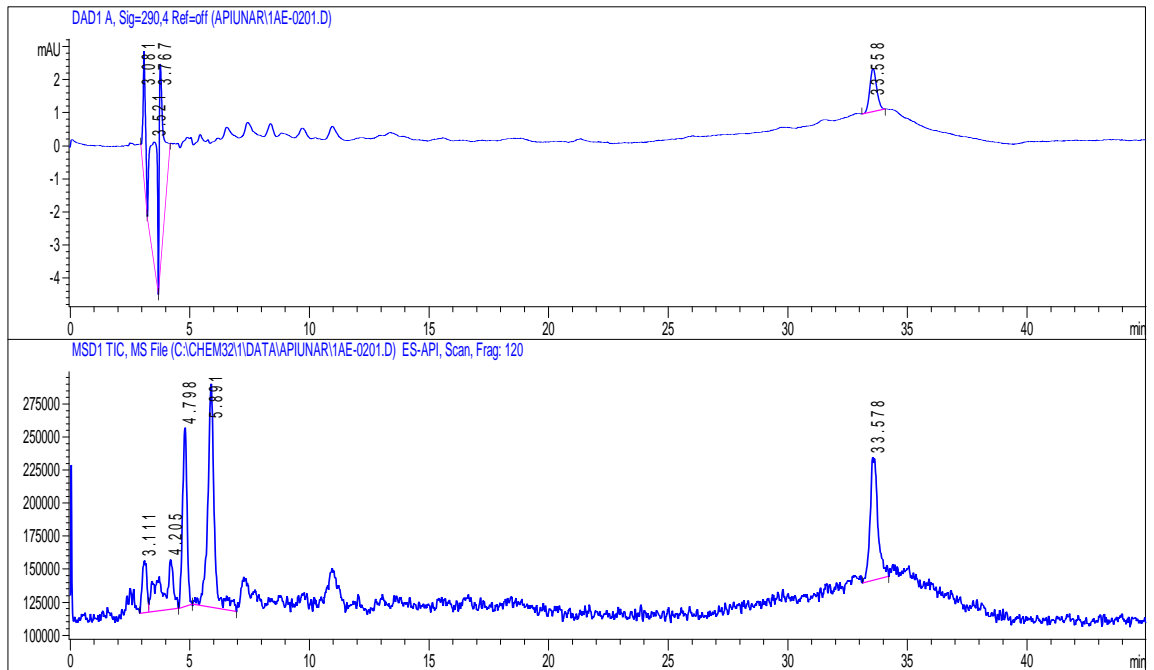
El espectro indica un máximo de absorción a una longitud de onda de 270 nm para el estándar Crisina

Anexo N. Espectro UV para el estándar Galangina

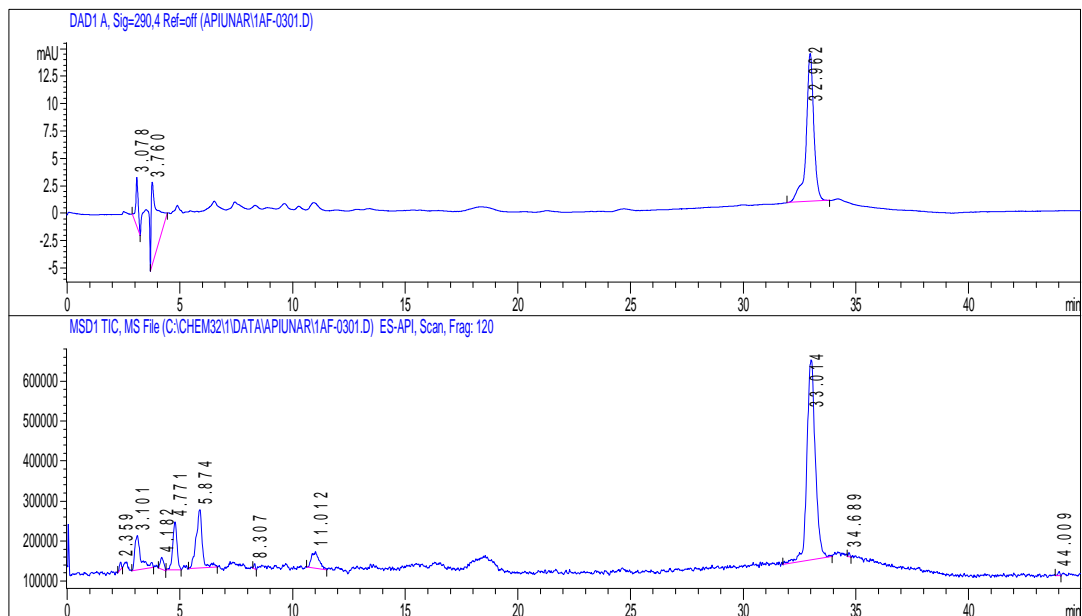


En este espectro se observa dos máximos de absorción a una longitud de onda de 265 y 360 nm

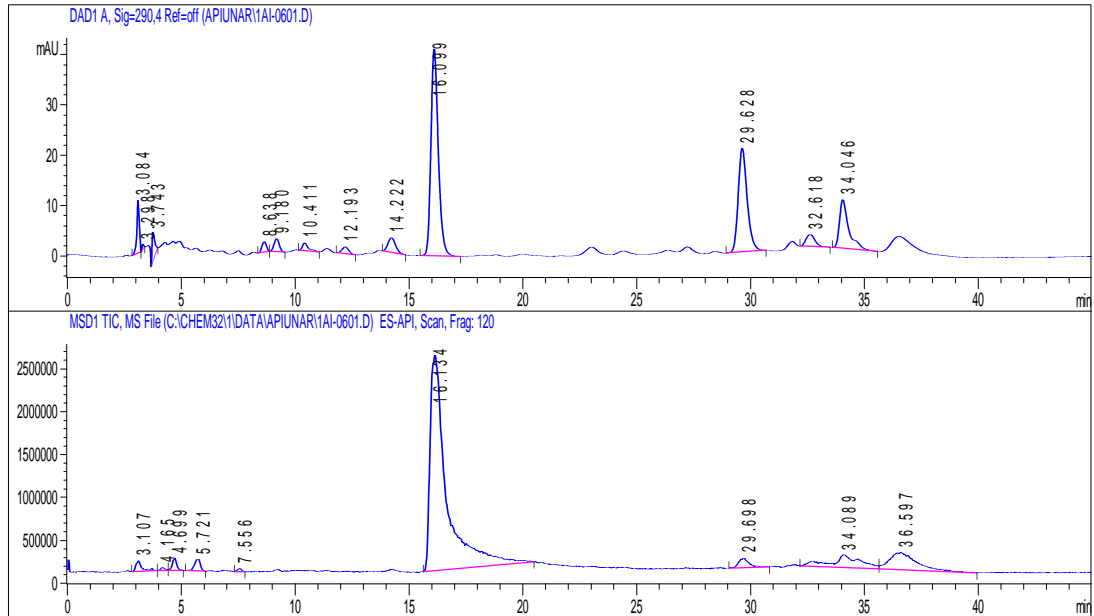
Anexo Ñ. Perfil de HPLC con detección UV (panel superior) y MS (panel inferior) de muestras de EEP Granja Botana UdeNar.



Anexo O. Perfil de HPLC con detección UV (panel superior) y MS (panel inferior) de muestras de EEP Municipio de Buesaco.



Anexo P. Perfil de HPLC con detección UV (panel superior) y MS (panel inferior) de muestras de EEP del municipio de La Unión.



Anexo Q. Actividad antibacterial de los EEP contra *Escherichia coli* ATCC 9.341 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 por el método de Kirby-Bauer.

Prueba	Microorganismo					
	Zona de inhibición (mm) para <i>E. coli</i>			Zona de inhibición (mm) para <i>S. aureus</i>		
Muestras	Promedio	Halo Máx.	Halo Min.	Promedio	Halo Máx.	Halo Min.
Bco. 1	18,3	23,3	16,7	24,2	26,0	22,7
Bco. 2	18,1	19,3	13,3	30,9	39,3	26,0
Bco.3	18,0	24,0	14,0	22,0	26,0	18,7
G.Unar 1	13,0	18,7	8,7	10,4	12,7	8,0
G.Unar 2	15,1	18,7	10,0	10,3	13,3	4,7
G.Unar 3	16,6	20,0	14,0	11,5	16,0	7,3
Unión 1	13,9	15,3	12,7	18,9	22,7	16,0
Unión 2	13,6	15,3	12,0	15,3	19,3	12,7
Unión 3	12,6	14,7	10,0	17,2	23,3	13,3
Blanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C. Bco.	44,2	50,0	38,0	26,5	33,7	22,0
C. G.Unar	20,0	20,0	20,0	15,3	18,0	12,0
C. Unión	34,9	38,0	32,0	23,3	28,0	20,0

C.: Control. Sulfato de estreptomina 10mg/mL
 Blanco: Etanol al 80% como un control negativo

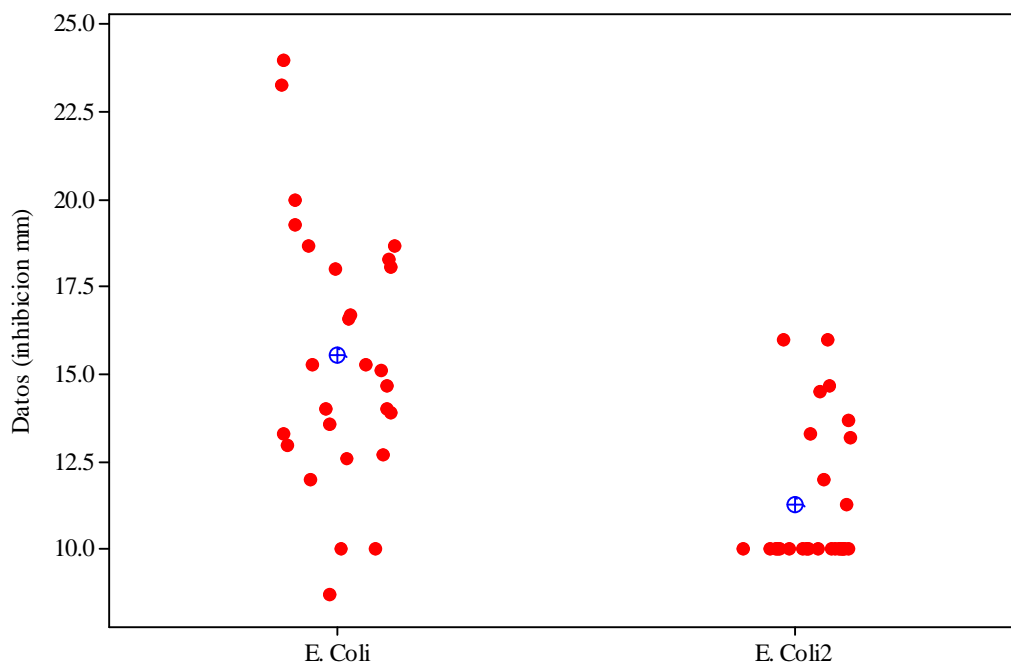
Anexo R. Actividad antibacterial de los EEP contra *Escherichia coli* ATCC 9.341 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 por el método de Difusión en Pozos.

Prueba	Microorganismo					
	Zona de inhibición (mm) para <i>E. coli</i>			Zona de inhibición (mm) para <i>S. aureus</i>		
Muestras	Promedio	Halo Máx.	Halo Min.	Promedio	Halo Máx.	Halo Min.
Bco. 1	10,0	10,0	10,0	17,3	20,7	13,3
Bco. 2	10,0	10,0	10,0	16,3	20,0	13,3
Bco.3	10,0	10,0	10,0	16,7	21,3	14,0
G.Unar 1	10,0	10,0	10,0	13,3	16,0	11,3
G.Unar 2	10,0	10,0	10,0	14,7	17,3	12,7
G.Unar 3	10,0	10,0	10,0	14,4	16,7	12,0
Unión 1	14,5	16,0	13,3	16,6	21,3	13,3
Unión 2	13,7	16,0	11,3	17,4	27,3	12,0
Unión 3	13,2	14,7	12,0	15,9	18,7	14,0
Blanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C. Bco.	31,3	32,0	30,0	21,6	22,0	20,0
C. G.Unar	31,3	32,0	30,0	21,6	22,0	20,0
C. Unión	36,4	42,0	30,0	26,7	30,0	22,0

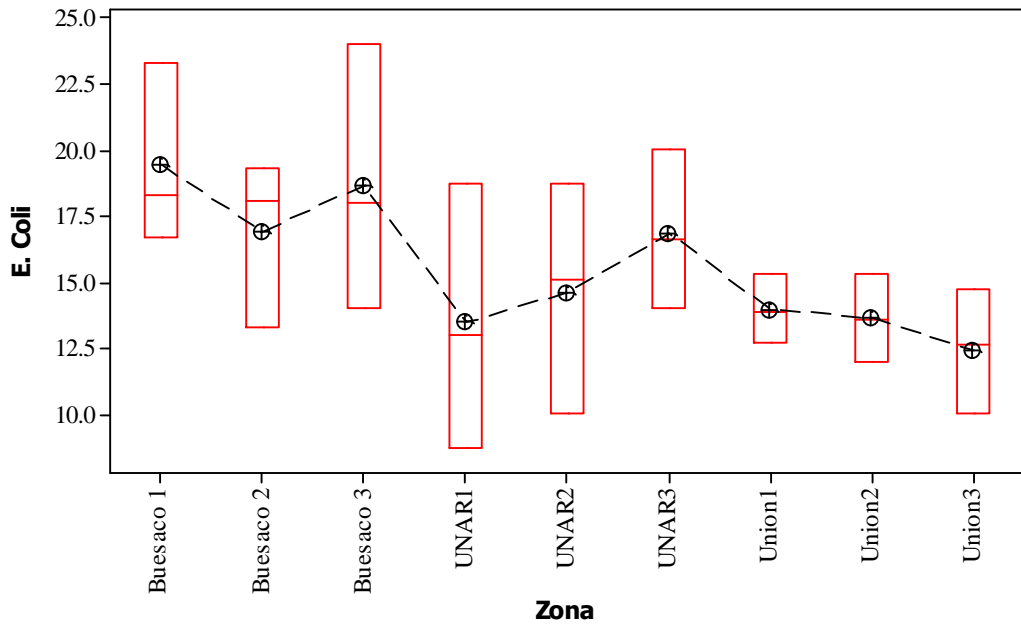
C.: Control. Sulfato de estreptomicina 10mg/mL

Blanco: Etanol al 80% como un control negativo

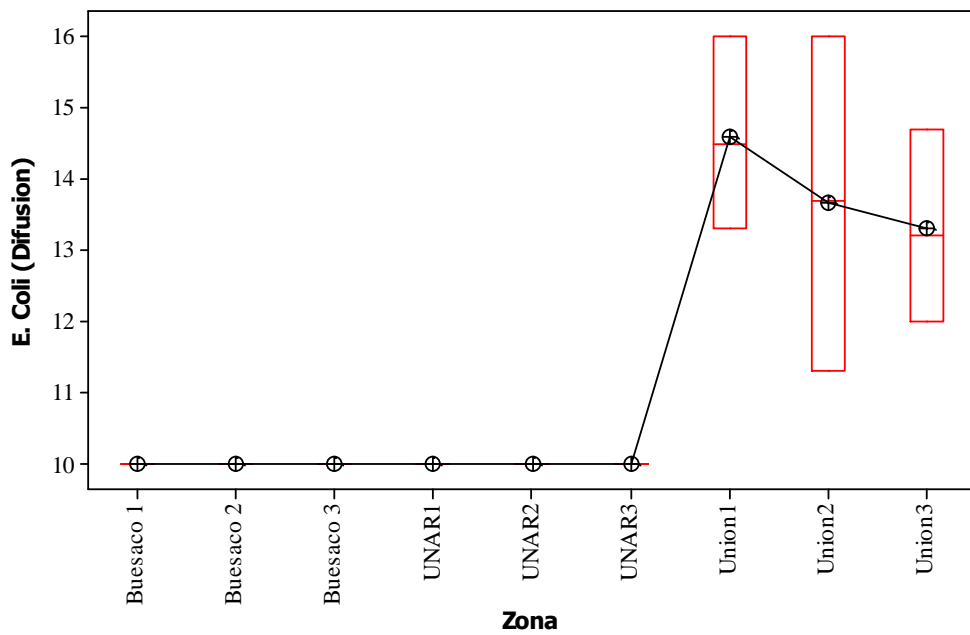
Anexo S. Diagrama de dispersión evaluación antibacteriana. (Izq). Método de Kirby-Bauer. (Der) Difusión en Pozos. *E. coli*



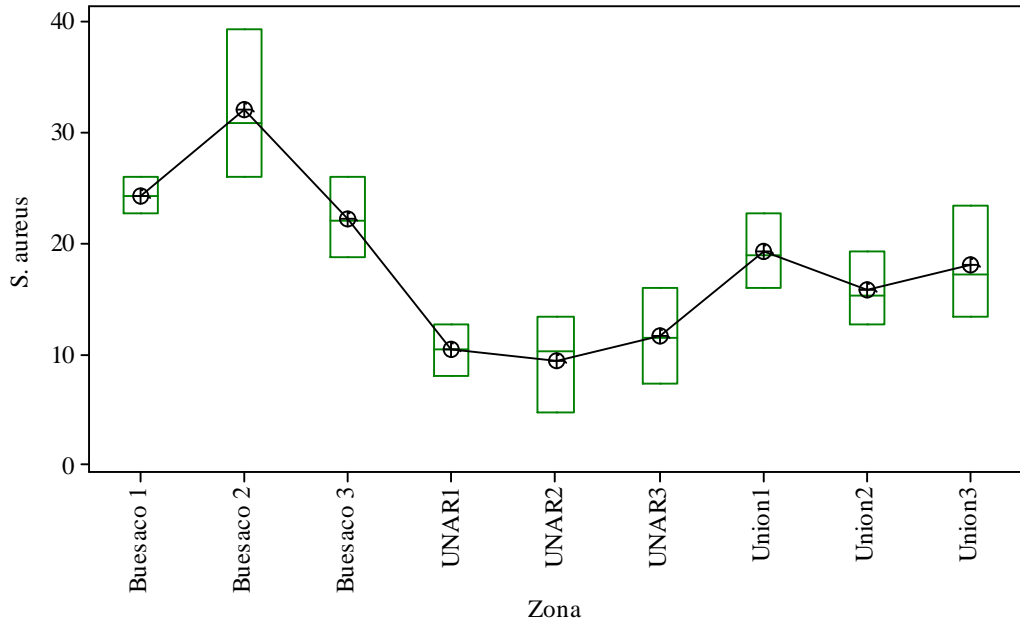
Anexo T. Gráfico de cajas Box-Plot. Método Kirby-Bauer para *E. coli*



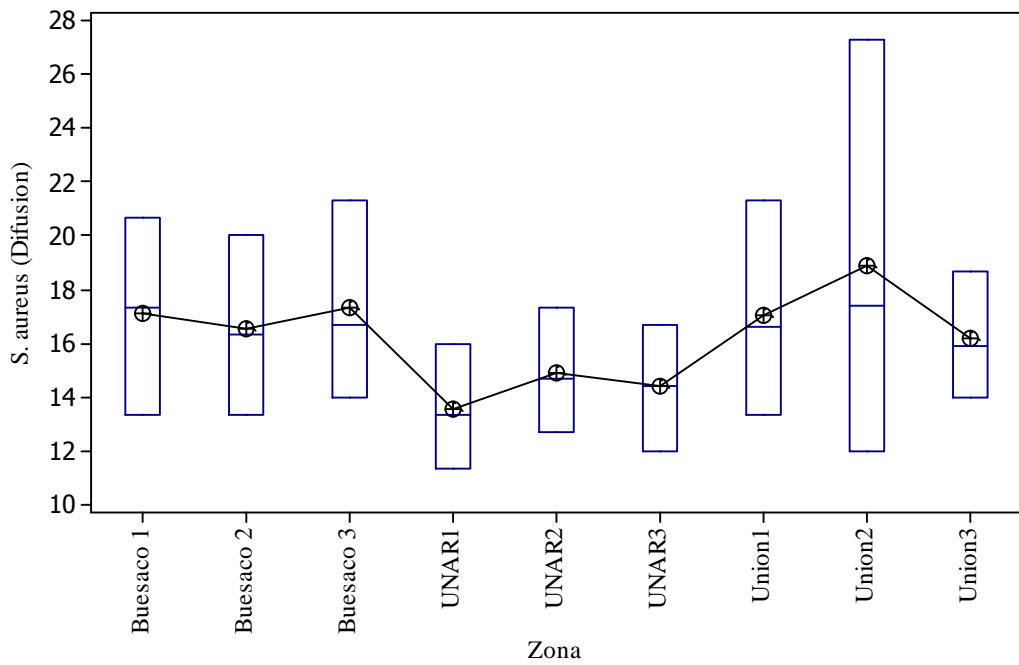
Anexo U. Gráfico de cajas Box-Plot. Método de Difusión en Pozos para *E. coli*



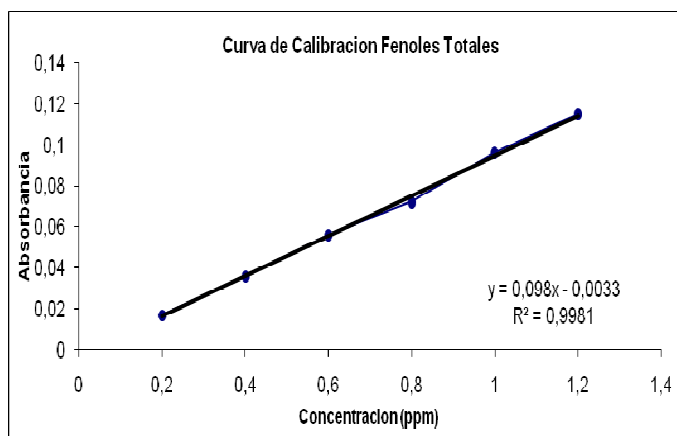
Anexo V. Gráfico de cajas Box-Plot. Método de Kirby-Bauer para *S. aureus*



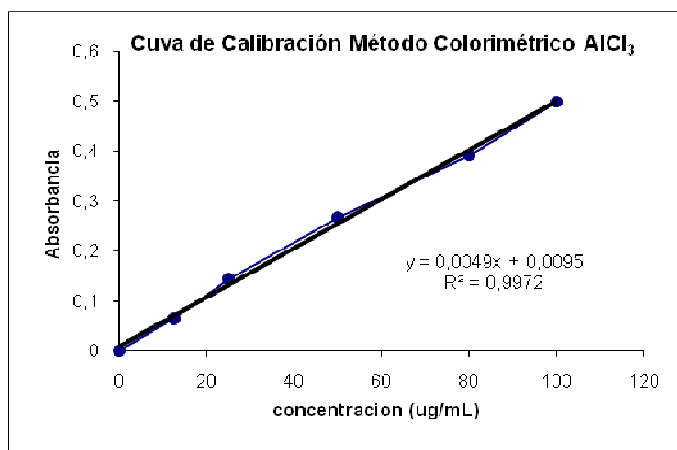
Anexo W. Gráfico de cajas Box-Plot. Método de Difusión en Pozos para *S. aureus*



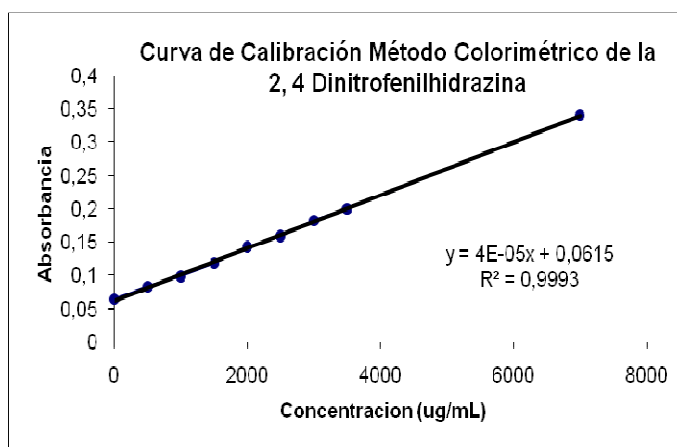
Anexo X. Curva de calibración Compuestos Fenólicos.



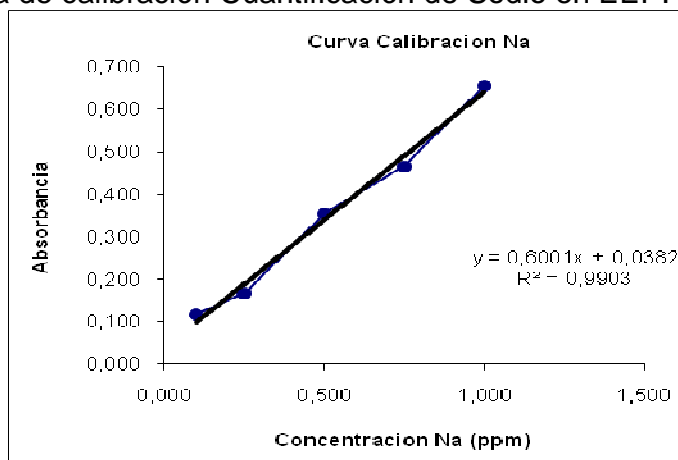
Anexo Y. Curva de calibración Método Colorimétrico del Cloruro de Aluminio.



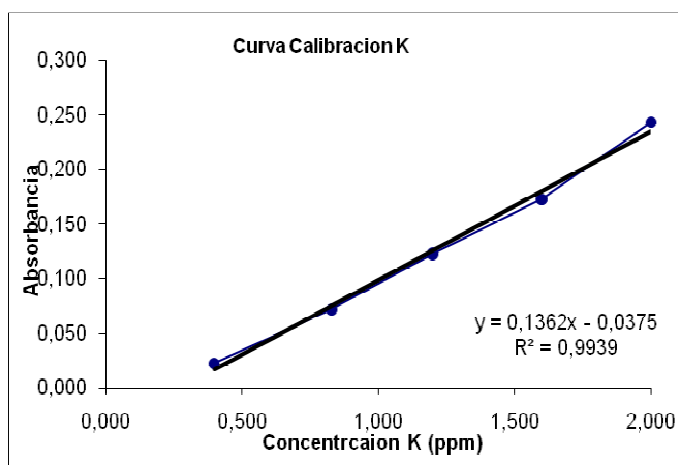
Anexo Z. Curva de calibración Método Colorimétrico de la 2,4 Dinitrofenilhidrazina.



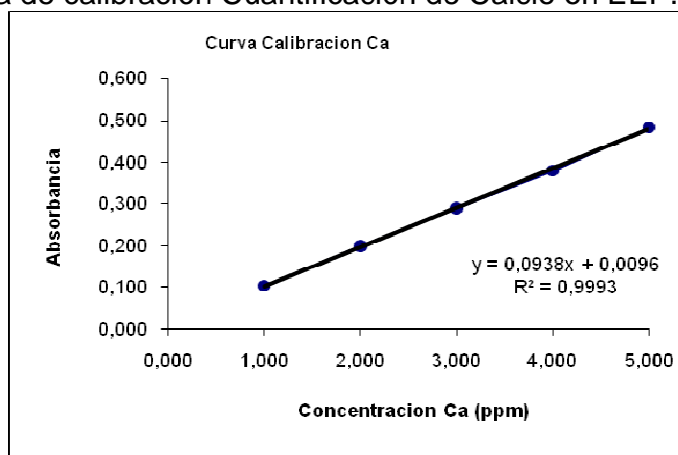
Anexo A1. Curva de calibración Cuantificación de Sodio en EEP.



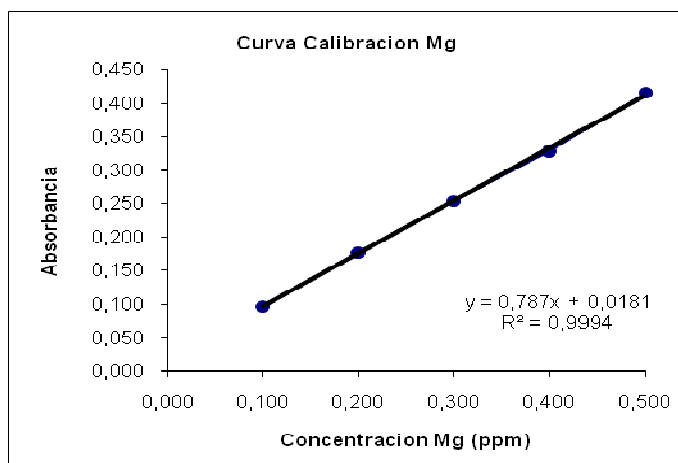
Anexo B1. Curva de calibración Cuantificación de Potasio en EEP.



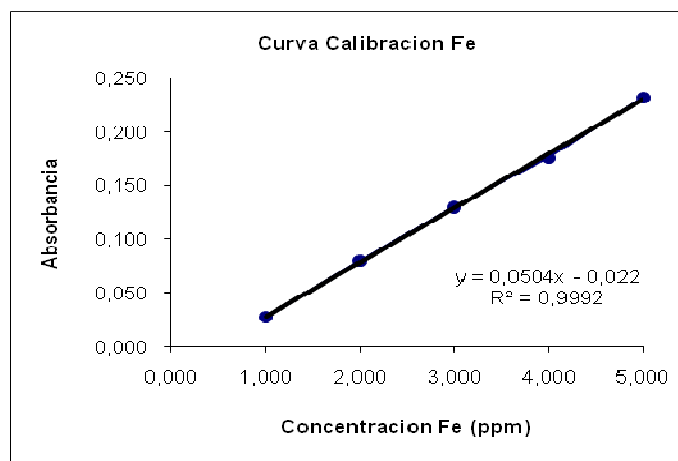
Anexo C1. Curva de calibración Cuantificación de Calcio en EEP.



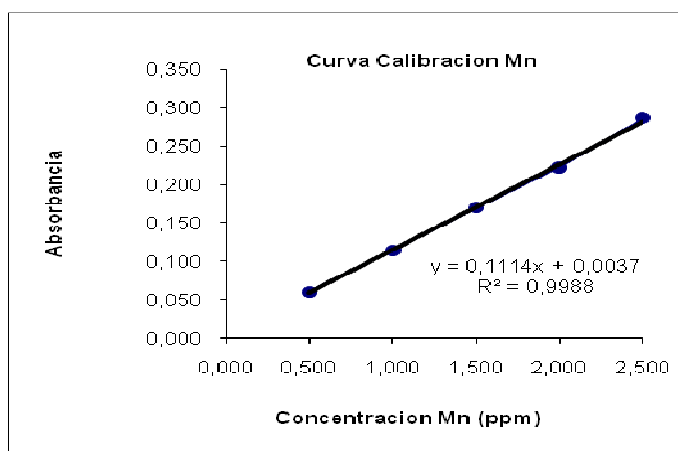
Anexo D1. Curva de calibración Cuantificación de Magnesio en EEP.



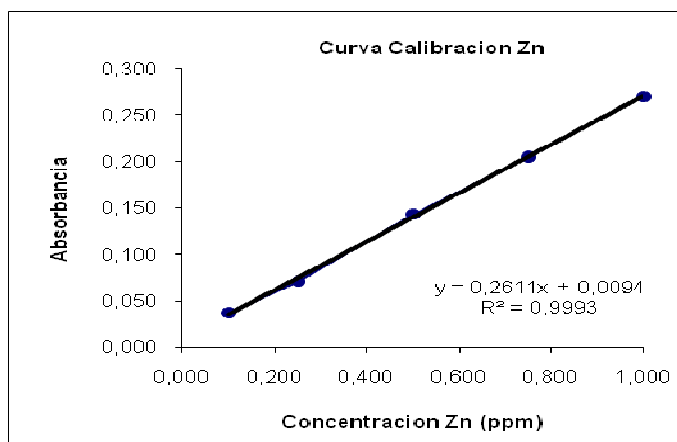
Anexo E1. Curva de calibración Cuantificación de Hierro en EEP.



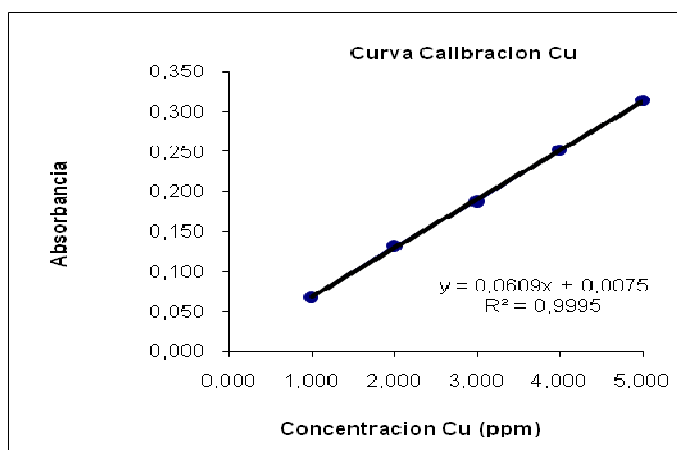
Anexo F1. Curva de calibración Cuantificación de Manganeso en EEP.



Anexo G1. Curva de calibración Cuantificación de Zinc en EEP.



Anexo H1. Curva de calibración Cuantificación de Cobre en EEP.



Anexo I1. Curva de calibración Cuantificación de Níquel en EEP.

