

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICION CUALITATIVA DE PROPOLEOS PROVENIENTES DE DOS ZONAS CLIMATICAS DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND CUALITATIVE COMPOSITION PROPOLIS FROM TWO CLIMATIC REGIONS CAUCA DEPARTMENT****ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DE PRÓPOLIS DE DUAS ÁREAS CLIMÁTICAS DO DEPARTAMENTO DO CAUCA**NANCY SAMARA-ORTEGA¹, NEYLA BENITEZ-CAMPO², FABIO A. CABEZAS-FAJARDO³**PALABRAS CLAVE:**

Extracto etanólico, antimicrobiano, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Flavonoides.

KEYWORDS:

Ethanolic extract, antimicrobial, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, flavonoids.

PALAVRAS CHAVE:

Extrato em etanol, antimicrobianos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, flavonóides

RESUMEN

*En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de dos extractos etanólicos de Propóleo (EEP) provenientes de apiarios de los municipios de Totoró y Buenos Aires en el Departamento del Cauca, frente a una bacteria Gram positiva y otra Gram negativa y se determinó la composición cualitativa de metabolitos secundarios de los dos extractos. La actividad bactericida se evaluó por el método de dilución en caldo y el análisis químico se realizó mediante pruebas de reacciones coloridas, cromatografía bidimensional y cromatografía de capa delgada. Ambos EEP mostraron efecto bactericida, donde el Propóleo de Buenos Aires fue más efectivo que el de Totoró frente a *Pseudomonas aeruginosa*, al inhibir su crecimiento a una concentración inferior ($p < 0,05$), mientras que para *Staphylococcus aureus* el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dos extractos. El análisis químico reveló que ambos propóleos poseen flavonoides, alcaloides y cumarinas, entre otros, además que el Propóleo de Buenos Aires posee una mayor complejidad química, lo que sugiere la presencia de compuestos antibacterianos que pueden actuar eficientemente contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.*

ABSTRACT

In this study, we evaluated the antimicrobial activity of two Propolis ethanol extracts (EEP) from apiaries of municipalities Totoro and Buenos Aires in

Recibido para evaluación: 27 de Marzo de 2010. Aprobado para publicación: 16 de Marzo de 2011.

1 Bióloga. Departamento de Biología. Universidad del Cauca.

2 Magister en Microbiología. Departamento de Biología. Docente. Universidad del Valle.

3 Doctor en Ciencias Químicas. Departamento de Química. Docente. Universidad del Cauca.

the Cauca department, against one Gram positive and one Gram negative bacteria and determined the qualitative composition of second metabolites the two extracts. Bactericidal activity was evaluated by the broth dilution method and phytochemical analysis was performed by color reaction, two-dimensional chromatography and thin layer chromatography. Both EEPs had a bactericidal effect, in which the Buenos Aires Propolis was more effective than the Totoró one against *Pseudomonas aeruginosa*, by inhibiting its growth at a lower concentration ($p < 0.05$), while for *Staphylococcus aureus*, statistical analysis showed no significant difference ($p > 0.05$) between the two extracts. Chemical analysis showed that both were composed of flavonoids, alkaloids and coumarins, among others, and that the Buenos Aires Propolis had a greater chemical complexity, suggesting the presence of antibacterial compounds able to act effectively against Gram-positive and Gram negative bacteria.

RESUMO

Neste estudo, avaliou-se a efeito antimicrobiano nos avaliamos a atividade antimicrobiana de dois extratos etanólicos de própolis (EEP) vindos de apiários dos municípios de Totoró e Buenos Aires no Departamento do Cauca, contra uma bactéria Gram positiva e Gram negativa e se determinou a composição qualitativa de metabólitos secundários dos dois extratos. A atividade bactericida foi avaliada pelo método de diluição em caldo e a análise química foi realizada por cromatografia em fase de teste, colorido bidimensional e cromatografia em camada delgada. Os resultados mostraram que os dois EEP tiveram um efeito bactericida, onde a própolis de Buenos Aires foi mais eficaz do que a de Totoró contra *Pseudomonas aeruginosa*, inibindo seu crescimento em menor concentração ($p < 0,05$), enquanto que para *Staphylococcus aureus* a análise estatística não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois extratos. A análise química mostrou que ambas as própolis estão compostas por flavonóides, alcalóides e cumarinas, entre outros, além demais, a própolis de Buenos Aires possui uma maior complexidade química, sugerindo a presença de compostos antibacterianos que podem atuar de forma eficaz contra as bactérias Gram positivas e Gram negativos.

INTRODUCCIÓN

El Propóleo es una sustancia resinosa producida por las abejas para el aislamiento y protección del panal especialmente contra los microorganismos patógenos [1]. La palabra Propóleo que significa "para la defensa de la colmena" da la idea de un compuesto muy importante para las abejas [2]. Es elaborado por insectos pertenecientes a la familia Apidae, principalmente la especie *Apis mellifera* [3] a partir de diferentes resinas y exudados vegetales [4,5]; por lo cual la composición del Propóleo varía de acuerdo a la región, zona de vida, época de colecta, por el entorno ecológico y las especies vegetales de las cuales se extraen las resinas [5]. Múltiples estudios bacteriológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, han confirmado la acción bacteriostática y bactericida que se le atribuye al Propóleo. [1,4,6,7,8]. Esta actividad puede ser debida a la cantidad y al tipo de compuestos fenólicos de que está constituido, los que pueden estar representados por las agliconas de flavonoides, ácidos fenólicos o sus ésteres ya que muchos flavonoides son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos [3,8].

Al Propóleo se le considera una mezcla de grandes potencialidades para el tratamiento de afecciones provocadas por diferentes microorganismos en seres humanos y animales; atribuyéndosele propiedades farmacológicas tanto a nivel sistémico como dermatológico [9]. Los géneros *Staphylococcus* y *Pseudomonas* son representantes de bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas respectivamente, consideradas como comensales de la piel y causantes de muchas infecciones entre ellas las del aparato respiratorio [9]. Por ello, es importante determinar el efecto bactericida del Propóleo obtenido en dos zonas climáticas diferentes como en las que se encuentran ubicados Totoró y Buenos Aires, sobre estas dos bacterias ya que no se conoce la influencia de las dos zonas en la composición química del Propóleo.

Además, en la actualidad se reconoce la importancia de los compuestos de origen natural porque poseen innumerables características, son de bajo costo y sus principios activos están biológicamente equilibrados evitando que se acumulen en el organismo, no presentando efectos secundarios o colaterales [10]. Debido al uso

indiscriminado y prolongado de antimicrobianos artificiales se ha elevado el número de patógenos mutantes resistentes; tomando fuerza el uso de antimicrobianos naturales como una alternativa eficaz y económica en el tratamiento de infecciones bacterianas [4]. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, mediante el presente trabajo se pretende evaluar la actividad bactericida de EEP provenientes de dos regiones climáticas distintas, frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y determinar la composición cualitativa de los dos extractos.

MÉTODO

Obtención del Propóleo. Las muestras de Propóleo puro se obtuvieron por medio de la Sociedad de Apicultores del Cauca (COAPICA), provenientes de apiarios localizados en el municipio de Buenos Aires (03°01'08" N y 76°38'37" O), con temperatura media de 23°C, a 1.225 m.s.n.m. con precipitación media anual de 2.024 mm, y el municipio de Totoró (02°38'06" N y 02°15'30" O), con temperatura media de 14°C, a 2.750 m.s.n.m. y precipitación media anual de 2.000 mm. [11].

Preparación de los extractos. Las dos muestras de Propóleo se llevaron al laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca donde se pesaron y fraccionaron en trozos más pequeños. Se colocaron 250 gramos de cada Propóleo en frascos de vidrio y se añadieron 600 mL de etanol al 96%, de tal manera que el solvente cubriera los trozos de Propóleo. Se dejaron en extracción a temperatura ambiente (23 °C), protegidos de la luz y con agitación ocasional por aproximadamente un mes, la preparación se realizó de acuerdo a las especificaciones de los extractos de uso comercial en COAPICA. Posteriormente, los extractos fueron filtrados con papel filtro whatman N°1 y mantenidos en refrigeración hasta el momento de su utilización.

Microorganismos empleados. Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca. Los microorganismos se seleccionaron por ser representativos de grupos bacterianos que difieren en morfología, reacción de Gram y por su importancia clínica.

Preparación del inóculo bacteriano. Los microorganismos fueron inoculados en caldo nutritivo e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas. Posteriormente, se realizó la curva de crecimiento por densidad óptica a 600 nm, [12,13], con el propósito de determinar el tiempo que toma cada cepa en alcanzar el punto máximo de la fase exponencial, el número de células se estimó por recuento en cámara de Neubauer, en la que se determinó una población de $5,4 - 11,0 \times 10^7$ células/mL para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. De acuerdo a lo obtenido en la curva de crecimiento, los microorganismos se dejaron crecer nuevamente en caldo nutritivo, antes del ensayo por un periodo de 9 y 15 horas para *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente.

Determinación de la actividad antimicrobiana. Se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que corresponde a la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de 24 horas de incubación [14]. Se utilizó el método de dilución en caldo, en el que al primer tubo de caldo Muller Hinton, se le añadieron 2 mL de extracto de Propóleo, de este se tomó una alícuota de 2 mL que se añadió al tubo siguiente y así se procedió sucesivamente con los tubos restantes, de esta forma la concentración en cada tubo fue disminuyendo a la mitad. Cada tubo fue inoculado con 100 μL de la suspensión bacteriana en el punto máximo de la fase exponencial y luego se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, posteriormente se tomaron 100 μL de cada uno de ellos y se sembraron en agar Mueller Hinton, las placas se incubaron por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$; los aislados fueron considerados sensibles al extracto de Propóleo cuando no hubo crecimiento en las placas después de 24 horas de incubación, cada ensayo fue sometido a 10 repeticiones.

Para descartar el efecto del etanol en el control negativo, se prepararon paralelamente una serie con la misma cantidad de tubos para cada bacteria, en este caso se añadieron 2mL de etanol al 96%, al primer tubo y se realizaron las diluciones respectivas; como se observó que el etanol inhibió el crecimiento bacteriano en la primera dilución para ambas bacterias, se descartó este resultado en la determinación de la CMB, debido al efecto del etanol. Como control positivo se utilizó ciprofloxacina (200 mg/10mL) ya que según las pruebas de susceptibilidad a antibióticos los dos microorganismos fueron sensibles al mismo.

Comparación cualitativa de los componentes del Propóleo

Se realizó la identificación de metabolitos secundarios mediante reacciones coloridas. La determinación de flavonoides se efectuó mediante la prueba de Shinoda. [15] y de Hidróxido de sodio [16]. Se utilizó la prueba de Dragendorff para determinar la presencia de alcaloides [15]. En la determinación de esteroides se utilizó el reactivo de Liebermann-Burchard e igualmente se hizo la prueba de cumarinas por lectura con lámpara U.V. Para la cromatografía bidimensional, se utilizaron láminas de papel cromatográfico Whatman N°3, se corrió la primera dimensión con una mezcla de terbutanol:ácido-acético:agua (TBA) y la segunda dimensión con la mezcla, ácido acético:agua (HOAc). Luego se revelaron mediante luz U.V. y se procedió a demarcar cada mancha para identificar los componentes de la muestra por comparación con la plantilla de distribución de flavonoides de Mabry et al [17] y se calculó el Rf para cada componente. Adicionalmente se realizó cromatografía de capa delgada (CCD) en cromato placas de sílica gel. Se utilizó para la fase móvil una mezcla de Hex:AcOEt:HOAc. La visualización del perfil general de las muestras fue realizada a través de lámpara UV a una longitud de onda de 365 nm y 254 nm. [18].

Diseño experimental. Se empleó un diseño de bloques completamente aleatorizado, en el cual las repeticiones del experimento fueron los bloques y en cada experimento se evaluaron todas las concentraciones de Propóleo de las dos localidades. El análisis de los datos se hizo mediante la prueba no paramétrica de Kruskal

Wallis y la prueba de comparaciones múltiples T3 de Dunnett para varianzas no homogéneas, el análisis se hizo con el paquete estadístico SPSS, con un nivel máximo de significancia de 0.05.

RESULTADOS

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) obtenida para inhibir a *S. aureus*, fue de 15,39 mg/mL y 17,03 mg/mL para los dos EEP analizados (Cuadro 1), no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto a la capacidad inhibitoria de los dos extractos para esta bacteria. Valores más altos de CMB fueron reportados por Marcucci [19], donde encontraron que *S. aureus* fue inhibida con 120 mg/mL de Propóleo. Entretanto, otros autores han reportado rangos menores de concentración inhibitoria para la misma [18,20]. Por otro lado, la CMB encontrada para *P. aeruginosa* utilizando el Propóleo de Buenos Aires, fue de 17,03 mg/mL, menor que la hallada para el Propóleo de Totoró, cuya CMB fue de 30,78 mg/mL.

(Cuadro 2), mostrando que dicha bacteria necesitó mayor concentración del extracto de Totoró para ser inhibida, mientras que el EEP de Buenos Aires inhibió las dos bacterias a la misma concentración. (Cuadros 1 y 2). Estos resultados coinciden con otros estudios en donde se reporta una mayor sensibilidad de bacterias Gram positivas que de Gram negativas al Propóleo [4,6,21], lo cual puede explicarse al tener presente que las bacterias gram negativas poseen una pared celular más compleja, con una proporción lipídica mayor, que

Cuadro 1. Concentración mínima bactericida (CMB) de los EEP de Totoró y Buenos sobre *S. aureus*.

TOTORO	EFECTO				P Sig.	
	Concentraciones Bactericidas (mg/mL)		Concentraciones No Bactericidas (mg/mL)			
	123,13	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 55,33±6,50 (42,19-68,47)	7,69	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 3,39±0,40 (2,57-4,21)	0,000 Sig ***	
	61,57		3,85			
	30,78		1,12			
	15,39		0,96			
BUENOS AIRES	68,12	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 39,74±3,94 (31,67-47,80)	8,51	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 4,97±0,49 (3,96-5,97)		0,000 Sig ***
	34,06		4,26			
	17,03		2,13			
P Sig.	0,234 No significativa		0,092 No significativa			

Cuadro 2. Concentración mínima bactericida (CMB) de los EEP de Totoró y Buenos sobre *P. aeruginosa*.

TOTORO	EFECTO				P Sig.
	Concentraciones Bactericidas (mg/mL)		Concentraciones No Bactericidas (mg/ mL)		
	123,13	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 55,33±6,50 (42,19-68,47)	7,69	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 3,39±0,40 (2,57-4,21)	0,000 Sig ***
	61,57		3,85		
	30,78		1,12		
	15,39		0,96		
BUENOS AIRES	68,12	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 39,74±3,94 (31,67-47,80)	8,51	[Media + E.E.(I.C. 95%)] 4,97±0,49 (3,96-5,97)	0,000 Sig ***
	34,06		4,26		
	17,03		2,13		
P Sig.	0,234 No significativa		0,092 No significativa		

las gram positivas, tales características pueden estar involucradas con la mayor resistencia a los extractos. [22]. Además el análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la actividad antimicrobiana (Cuadro 2), corroborando que para la inhibición de *P. aeruginosa* fue más efectivo el Propóleo de Buenos Aires que el de Totoró, coincidiendo con los resultados de otros investigadores en donde reportan, diferencias significativas en la actividad antibiótica de Propóleos

de diverso origen geográfico. [5,6,23,24,25]. Este resultado parecería contradictorio debido a que en la detección cualitativa de los metabolitos, se encontró que los dos propóleos estudiados presentaban los mismos componentes (Cuadro 3), por lo que se pudiera esperar una acción antimicrobiana similar, pero según Martínez [2] los patrones de una molécula o grupo de moléculas en particular pueden ser suficientemente distintos para permitir la discriminación entre Propóleos de diferente origen geográfico, por lo que muy seguramente, otro

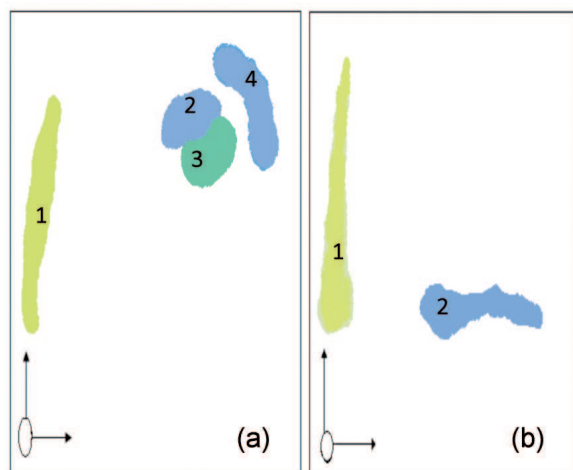
factor que determina el resultado obtenido es la diversidad de flavonoides y otros componentes presentes en los extractos (Figura 1 y Cuadro 4), pues se ha propuesto que actúan en sinergismo para optimizar su acción y no solo la cantidad, sino la variedad de compuestos fenólicos y de diferentes grupos químicos aumenta enormemente la funcionalidad del Propóleo. [22].

Según los resultados de la cromatografía bidimensional y los espectros obtenidos (Figuras 1, 2 y 3) se observaron 4 manchas de distinta intensidad para el Propóleo de Buenos Aires y 2 manchas para el de Totoró. Además, el análisis preliminar no mostró presencia de esteroides y terpenoides para los dos extractos, mientras que estuvieron presentes metabolitos secundarios como las cumarinas, alcaloides y flavonoides en ambos propóleos (Cuadro 3). Estos resultados coinciden con lo planteado por algunos autores en relación a que los compuestos nitrogenados y los polifenoles constituyen los dos grupos de metabolitos secundarios de mayor distribución en las plantas superiores y que harían parte de la composición química de los propóleos [26,27]. A estos últimos se les ha atribuido el alto potencial antibacteriano, por lo cual su hallazgo es interesante para la acción efectiva de los extractos analizados, pero en otros estudios, los demás grupos químicos encontrados, se reportan entre los más importantes con actividad antimicrobiana [5,28]. Los resultados obtenidos fueron contrarios a los reportados por Solano y Coronado [29], quienes encontraron ausencia de alcaloides y cumarinas, pero hallaron esteroides en tres muestras de Propóleo provenientes de los departamen-

Cuadro 3. Determinación cualitativa de algunos componentes del Propóleo de Totoró y Buenos Aires.

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

Figura 1. Cromatogramas de los propóleos de: (a) Buenos Aires, (b) Totoró.



tos de Boyacá, Quindío y Cundinamarca, pudiéndose de esta manera establecer grandes diferencias en la composición química de los propóleos entre departamentos cercanos al departamento del Cauca.

Además el resultado positivo en la identificación de flavonoides fue corroborado por cromatografía bidimensional y observadas las 6 manchas obtenidas por espectroscopia UV visible en el cromatograma, que según lo reportado por Mabry [17], podemos señalar la presencia de flavonoles, flavonolas e isoflavonas. Los espectros obtenidos (Figuras 2 y 3) exhibieron un perfil de barrido similar a los reportados por Park [30] y Adellmann [3], con Propóleos de diferentes regiones de Brasil y con máximos de absorción entre las longitudes de onda que se conoce son atribuidos a los flavonoides y fenoles. Según la literatura, los núcleos de flavonoides señalados se encuentran entre los principales componentes de los Propóleos. [31,32,33]. De acuerdo con los análisis por CCD (Figura 4), aunque algunas bandas fueron similares para ambas muestras, en general se presentaron variaciones en el perfil cromatográfico de

los dos extractos, observándose que el EEP de Buenos Aires tuvo mayor variedad de compuestos químicos que el de Totoró.

El resultado observado confirma lo expresado anteriormente sobre la importancia de la composición química de los propóleos para su efectiva acción. Estas diferencias en la composición pueden estar determinadas por la diversidad de la flora predominante en cada zona biogeográfica donde están situados los apiarios; gran parte de la vegetación encontrada en estos municipios corresponde a especies arbustivas y arbóreas productoras de resinas, látex, mucílagos y gomas que son señaladas como una de las principales fuentes naturales que las abejas convierten en propóleos en las regiones tropicales, [31]. Según estudios químicos [27,34], en muchas de estas secreciones se han encontrado una gran cantidad de metabolitos secundarios.

El municipio de Buenos Aires posee un clima cálido el cual probablemente favorece el desarrollo de una mayor diversidad de especies vegetales de interés apícola y por ende una composición química más variada.

CONCLUSIONES

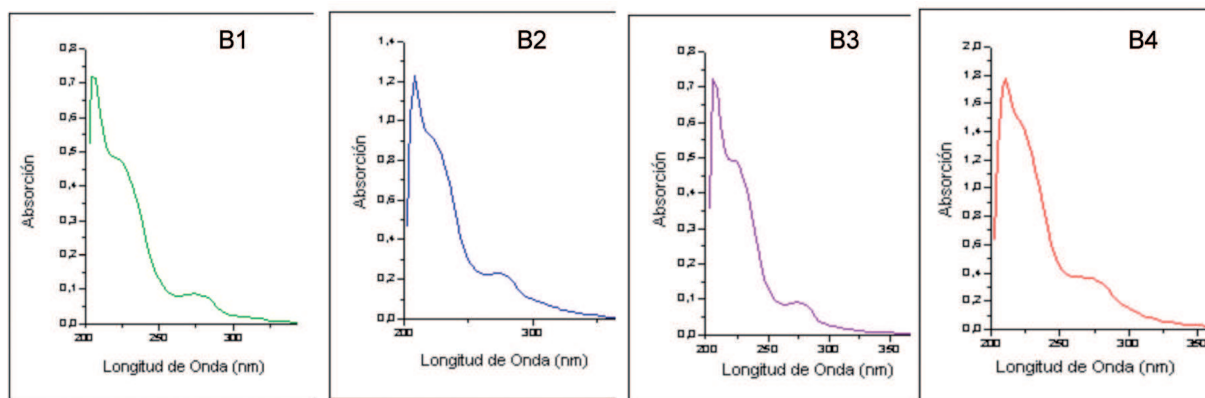
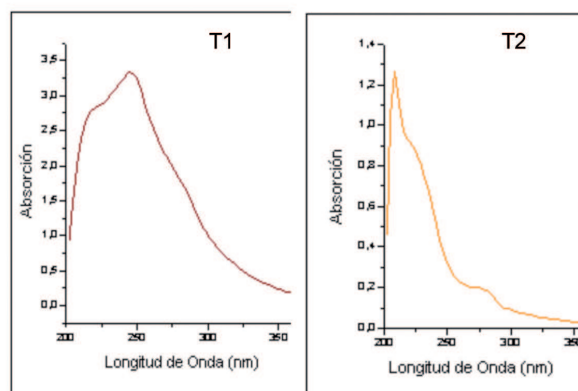
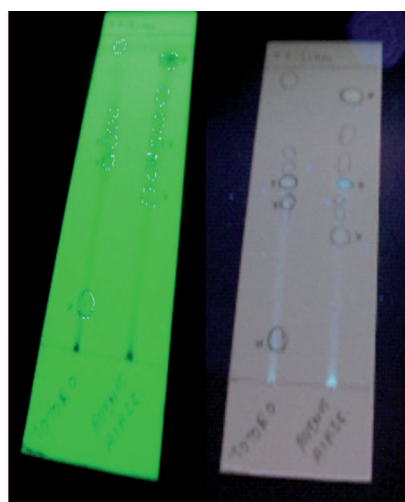
Los EEP provenientes de Totoró y Buenos Aires presentaron una actividad bactericida similar contra *S. aureus* no hallándose diferencias significativas en las Concentraciones Mínimas Bactericidas.

El EEP de Buenos Aires inhibió a *P. aeruginosa* a una concentración significativamente menor que el de Totoró, e igualmente mostró una mayor complejidad química, lo que sugiere la presencia de compuestos que están implicados en la inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esta complejidad puede presentarse debido a diversidad particular en la flora existente en la región de donde las abejas toman la

Cuadro 4. Datos cromatográficos y espectroscópicos de los propóleos de Buenos Aires y Totoró

	Color	Rf Encontrado	λ (nm) Encontrada	Possible Clase de Flavonoide	Estructuras base
B1	Verde Limón	0.51	277	Flavonol y Flavanona	
B2	Azul ciano	0.81	276	Flavanona e Isoflavona	
B3	Verde Turquesa	0.69	277	Flavonol y Flavanona	
B4	Azul ciano	0.76	275	Flavanona e Isoflavona	
T1	Amarillo Limón	0.54	246	Flavonol e Isoflavona	
T2	Azul Ciano	0.33	276	Flavanona e Isoflavona	

B1-B4: Propóleos de Buenos Aires. T1-T2: Propóleos de Totoró.

Figura 2. Espectro de absorción para las manchas del Propóleo de Buenos Aires.**Figura 3.** Espectro de absorción para las manchas del Propóleo de Totoró**Figura 4.** Cromatografía en capa delgada de los dos propóleos.

Izquierda: Totoró. Derecha: Buenos Aires

materia prima para producir los propóleos.

En ambos propóleos se encontraron metabolitos secundarios como alcaloides, cumarinas y flavonoides, que según la literatura son los principios biológicamente activos en este compuesto.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca (MUC). Al profesor Nelson Rojas y al laboratorio del Departamento de Biología de la Universidad del Cauca por facilitar sus instalaciones.

REFERENCIAS

- [1] FERNANDES, J. A. *et al.* Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100(5), 2005, p.: 563-566,
- [2] MARTINEZ, T. Espectro antimicrobiano del propóleo proveniente de apiarios de la zona norte del Valle del Cauca y Sur del Quindío. [Trabajo de Grado Zootecnista] (Santafé de Bogotá). Universidad Nacional, Facultad de medicina veterinaria y de zootecnia, 2003, 76 p.
- [3] ADELLMAN, J. Propolis: variabilidade composicional, correlacao com a flora e bioatividade antimicrobiana/ antioxidante. [Ms.C. Ciencias Farmacéuticas]. Curitiba (Brasil). Universidad Federal de Paraná, Facultad de Ciencias de la Salud, 2005, 176 p.

- [4] VARGAS A. C de, et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. *Ciencia Rural.*, 34(1), 2004, p. 159-163.
- [5] FURANI, C. Análise de própolis da Serra do Japi, determinação em processos de cicatrização. [Ms.C. Ciencias Farmacéuticas]. Sao Pablo (Brasil). Universidad de Sao Pablo, Facultad de Ciencias Farmaceuticas, 2005, 138 p
- [6] TOLOSA, L y CAÑIZARES E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica.*, 43(1-2), 2002; p. 187-204.
- [7] ORSI, R *et al.* Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* [online]. Available: <http://www.scielo.br/scielo> [citado 3 de Junio de 2008].
- [8] MODAK, B. *et al.* Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: Efecto del tipo de estructura. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química.*, 47 (1), 2002; p. 114-118.
- [9] BROOKS, F.G; BUTEL, S.J y MORSE, A.S. Microbiología medica: de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18 ed. (México): Manual Moderno, 2005, p. 219-224, 257-259.
- [10] DEL RIO MARTINEZ, P. I. Actividad Biocida de un Propolis Chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*. : Estudio in Vitro. [MS.C. Cirujano dentista]. Santiago de Chile (Chile), Universidad de Chile. Facultad de Odontología, 2006, 120 p.
- [11] COLOMBIA. CORPORACION AUTONOMA REGIONAL DEL CAUCA. Información preliminar de los municipios del Departamento del Cauca. Popayán, Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1999, p. 14-15, 76-77.
- [12] GOTTENBOS, B; V., HENNY, C. and BUSSCHER, H. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *J. of Biomed Mater Research.* 50, 2000; p. 208-214.
- [13] BENITEZ-CAMPO, N., VIVAS, D.H Y ROSERO, E.D. Toxicidad de los principales plaguicidas utilizados en el municipio de Popayán, usando *Bacillus subtilis*. *Rev. Biotecnol.en el sector agropecuario y agroindustrial.* 7(1), 2009, p. 11-22.
- [14] QUINTANA, G *et al.* Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana.* [online], Available: <http://www.upch.edu.pe/famed/rmh/16-1/v16n1ao6.htm>. [citado 7 de abril de 2008].
- [15] DOMINGUEZ, X. A. Métodos de investigación fitoquímica. 3 ed. (México): Limusa, 1985. 281 p.
- [16] FRAGOSO, A. *et al* . Síntesis y caracterización físico-química y biológica de complejos de inclusión de naproxeno con polímeros de dextrana-B-Ciclodextrina. [online]. Available: http://www.scf.sld.cu/pdf/congreso_04/libro-resumenes.pdf. [citado 11 de agosto de 2008].
- [17] MABRY, T.J; MARKHAM, K.R and THOMAS, M.B. The sistematic identification of flavonoids. New York: Springer Verlag, 1970. p.354.
- [18] SAWAYA, A. *et al.* Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 35(1), 2004, 104-109.
- [19] MARCUCCI, M. C; WOISKY, R. G. e SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. *Mensagem doce. Química Nova.* 46, 1998; p. 3-9.
- [20] PALOMINO L.R., et al., Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del Propóleos en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.*, 63(1), 2010, p. 5373-5383.
- [21] FONTANA, J. D et al. Profiling propolis flavonoids by means of micellar electrokinetic capillary chromatography, capillary gas chromatography and bactericidal action. *Chromatographia*, 52(3-4)., 2000; p. 147-151.
- [22] MIRZOEVA, O. K, GRISHANIN and CALDER PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrana potencial and motility of bacteria. *Microbiol. Research.*; 152(3), 1997, p. 239-246.
- [23] FERNANDES, J. A, *et al.* Atividade antimicrobiana de própolis de Apis mellifera obtidas em três regiões do Brasil. *Ciencia Rural* [online]. Available: <http://www.scielo.br/scielo>. Php [citado 8 de Noviembre de 2007].
- [24] KOO, H et al. Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* *Revista da Universidade de Franca.*, 7(1), 1999, p 48-49.
- [25] KUJUNGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and

- antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64,1999; p. 235-240.
- [26] BANKOVA, V. S. DE CASTRO. S.L and MARCUCCI, MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.*, 31(1), 2000; p. 3–15.
- [27] BALDIZAN, A, et al. Metabolitos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque decíduo tropical de los llanos centrales venezolanos. *Zootecnia tropical*. [online]. Available: <http://www.ceniapengov.ve/pbd/RevistasCientificas/ZootecniaTropical.htm>. [citado 3 de diciembre de 2008].
- [28] DOMINGO, D y LOPEZ BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista española de quimioterapia* [online]. Available: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>. [citado 14 de enero de 2010].
- [29] SOLANO, S.C y CORONADO, A.M. Actividad antibacteriana de tres muestras de Propóleo nacional. [Trabajo de grado. Químico farmacéutico]. Santafé de Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 2000, p.60.
- [30] PARK, Y.K. et al. Estudo da preparacao dos extratos de propolis e suas aplicacoes. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. [online]. Available: <http://www.scielo.br/scielo> [citado 29 de Noviembre de 2007].
- [31] SALAMANCA, G. *et al.* Origen, naturaleza y características de los propóleos Colombianos. *Apicer-vices* [online]. Available: http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origen_propoleos_1.htm. [citado 29 de Noviembre de 2007].
- [32] SALAMANCA, G *et al* Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*. [online]. Available: <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/ZootecniaTropical/zt2502/pdf/salamanca.pdf>. [citado 29 de Noviembre de 2007].
- [33] MUÑOZ, O *et al.* Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*. [online]. Available: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n4/a17v30n4.pdf>. [citado 29 de Noviembre de 2007].
- [34] FERNANDEZ DE CORDOBA, H; BATISTA BAEZ, M y DARDUY DOMINGUEZ, R. Tamizaje de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. II Península de Guanahacabibes. *Revista cubana de enfermería Review* [online]. Available: <http://www.scielo.sld.cu/scielo>. [citado 29 de Noviembre de 2007]