



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica Toxicológica

Laboratorio de Productos Naturales

ANÁLISIS DE LA CALIDAD Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA TÓPICA *IN VIVO* DE PROPÓLEOS DE LA REGIÓN METROPOLITANA

Memoria para optar al título de Química Farmacéutica

CATALINA PAZ FIGUEROA BENAVIDES

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Carla Delporte Vergara¹
Dra. Ximena Silva A²

POFESOR PATROCINANTE

Dra. Carla Delporte Vergara¹

(1) Depto. de Química Farmacológica y Toxicológica.

(2) Unidad de pruebas biológicas, ISP.

Circulación restringida 2012-2014

Santiago, Chile

2012

Dedicada a mis padres, María Alejandra Benavides y Enrique Figueroa, quienes me han ayudado enormemente a llegar hasta esta instancia y a Fabrizio Cavada, mi gran amor, por estar siempre a mi lado.

“El mundo está en manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y de correr el riesgo de vivir sus sueños”

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco a mi familia por ayudarme durante estos largos años, especialmente a mis padres, a mi hermana y a mi abuela, quienes me han enseñado, acompañado y entregado todo su amor desde que nací.

Le doy gracias a Fabrizio, por estar siempre junto a mí, por apoyarme durante los momentos más difíciles y por haberme motivado cuando más lo necesité.

Agradezco a todos mis amigos, quienes logran que las pruebas sean más fáciles y las metas más alcanzables, principalmente a Camila, Javiera y Diego, que han estado a mi lado desde muy pequeños y han sido muchas las experiencias compartidas; y a mis compañeras de carrera, Carolina, Vanessa, Alexandra y Jasmín, quienes superaron junto a mí todas las etapas de la Universidad y gracias a ellas el ánimo y la alegría siempre estuvieron presentes.

Además debo expresar mi gran gratitud y respeto hacia la profesora Carla Delporte por su gran hospitalidad, amabilidad, cariño, apoyo y paciencia. Es una excelente profesora y un gran ejemplo a seguir.

También quiero agradecer especialmente a Gabriela y a Consuelo por el gran apoyo que me brindaron desde que ingresé al laboratorio, por la ayuda incondicional en todos los momentos y por el lindo vínculo formado.

Finalmente le doy gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales por todos los lindos momentos compartidos. A David por su gran disposición y buen humor, a Romina, Cristian, Daniela, Jorge, y Paola por la gran alegría, acogida, compañerismo y ayuda brindada.

SINCERAMENTE, MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS USTEDES.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	7
III. OBJETIVOS	8
1. Objetivos Generales.....	8
2. Objetivos Específicos.....	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Recolección de las muestras.....	9
2. Preparación de extractos globales y seriados.....	10
2.1.- Descerado con ciclos de temperatura.....	10
2.2.- Extracción con solventes de polaridad creciente.....	12
3. Control de calidad fisicoquímica.....	13
3.1.- Características sensoriales.....	13
3.2.- Determinación de la pérdida por calentamiento.....	13
3.3.- Determinación del índice de oxidación.....	14
3.4.- Determinación de sustancias extraíbles en n-hexano.....	14
3.5.- Determinación de resinas.....	15
3.6.- Determinación de impurezas Mecánicas.....	16
3.7.- Determinación de flavonoides.....	17
3.8.- Determinación de compuestos fenólicos totales.....	18
3.9.- Determinación de cenizas.....	19

4.	Determinación de los perfiles cromatográficos por c.c.f.....	20
5.	Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica <i>in vivo</i>	21
V.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
i.	Preparación de extractos globales y seriados.....	24
ii.	Control de calidad fisicoquímica.....	25
1.	Características sensoriales	25
2.	Determinación de la pérdida por calentamiento.....	26
3.	Determinación del índice de Oxidación.....	27
4.	Determinación de sustancias extraíbles en n-hexano.....	28
5.	Determinación de resinas.....	29
6.	Determinación de Impurezas mecánicas.....	30
7.	Determinación de flavonoides.....	32
8.	Determinación de compuestos fenólicos totales.....	34
9.	Determinación de cenizas	35
iii.	Determinación de los perfiles cromatográficos por c.c.f.	36
1.	Reactivo Liebermann.....	37
2.	Reactivo NP y UV-365 nm.....	39
3.	Reactivo p-anisaldehído sulfúrico.....	41
iv.	Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	44
VI.	CONCLUSIÓN	47
VII.	REFERENCIAS	48
1.	Referencias Bibliográficas.....	48
2.	Anexos.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Propóleos en bruto con distintas consistencias y coloraciones.....	1
Figura 2:	<i>Apis mellifera</i> L.....	2
Figura 3:	Propóleo en cápsulas.....	3
Figura 4:	Zonas de recolección del propóleo.....	9
Figura 5:	Propóleo en bruto.....	11
Figura 6:	Solución etanólica de propóleo.....	11
Figura 7:	Baño Termorregulador a 70°C.....	11
Figura 8:	Refrigerador a -20°C.....	11
Figura 9:	Propóleo filtrado en frío.....	11
Figura 10:	Ratón identificado y con la muestra de propóleo aplicada.....	23
Figura 11:	Sacabocados y discos de orejas de 6 mm.....	23
Figura 12:	Propóleo Cajón de Maipo.....	25
Figura 13:	Propóleo Caleu.....	25
Figura 14:	Propóleo Curacaví.....	25
Figura 15:	Propóleo Buin.....	26
Figura 16:	Propóleo Pirque.....	26
Figura 17:	Curva calibración de quercetina.....	32
Figura 18:	Estructura base de los flavonoides.....	33
Figura 19:	Curva calibración de ácido gálico.....	34
Figura 20:	c.c.f.reveladas con Liebermann-Burchard.....	37
Figura 21:	c.c.f. reveladas con Natural products.....	39
Figura 22:	c.c.f. reveladas con ρ -anisaldehído sulfúrico.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1:	Rendimientos de los extractos preparados.....	24
Tabla 2:	Pérdida por calentamiento de los propóleos en bruto.....	26
Tabla 3:	Índice oxidación de los propóleos en bruto.....	27
Tabla 4:	Sustancias extraíbles en n-hexano de los propóleos.....	28
Tabla 5:	Porcentajes de resinas de los propóleos.....	30
Tabla 6:	Impurezas mecánicas de los propóleos.....	31
Tabla 7:	Concentraciones de flavonoides de los propóleos.....	32
Tabla 8:	Concentraciones de compuestos fenólicos totales.....	34
Tabla 9:	Porcentajes de cenizas de los propóleos.....	35
Tabla 10:	Posible perfil químico de los propóleos según c.c.f.....	43
Tabla 11:	Actividad Antiinflamatoria de los EEG.....	44

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1:** Test de Mann-Whitney para TPA de propóleo de Caleu
- Anexo 2:** Test de Mann-Whitney para TPA de propóleo de Cajón del Maipo
- Anexo 3:** Test de Mann-Whitney para TPA de propóleo de Curacaví
- Anexo 4:** Test de Mann-Whitney para TPA de propóleo de Buin
- Anexo 5:** Test de Mann-Whitney para TPA de propóleo de Pirque
- Anexo 6:** Test de Kruskal-Wallis ANOVA para TPA de todos los propóleos
- Anexo 7:** Test de Mann-Whitney para AA de propóleo de Caleu
- Anexo 8:** Test de Mann-Whitney para AA de propóleo de Cajón del Maipo
- Anexo 9:** Test de Mann-Whitney para AA de propóleo de Curacaví
- Anexo 10:** Test de Mann-Whitney para AA de propóleo de Buin
- Anexo 11:** Test de Mann-Whitney para AA de propóleo de Pirque
- Anexo 12:** Test de Kruskal-Wallis ANOVA para AA de todos los propóleos
- Anexo 13:** Test de Mann-Whitney para los EAI entre dos tipos de propóleos
- Anexo 14:** Test de Mann-Whitney para los EAI entre dos tipos de propóleos
- Anexo 15:** Test de Mann-Whitney para los EAI entre dos tipos de propóleos
- Anexo 16:** Test de Mann-Whitney para los EAI entre dos tipos de propóleos

ABREVIATURAS

A	:	Absorbancia
AA	:	Ácido araquidónico
B	:	Buin
C	:	Cenizas
CA	:	Caleu
CAPE	:	Feniletil éster del ácido cafeico
c.c.f.	:	Cromatografías en capa fina
CM	:	Cajón del Maipo
Conc.	:	Concentración
COX	:	Ciclooxigenasa
CV	:	Curacaví
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico
d.s.	:	Desviación estándar
EAI	:	Efecto antiinflamatorio
EEG	:	Extracto etanólico global
EROs	:	Especies reactivas del oxígeno
ESD	:	Extracto seriado de diclorometano
ESE	:	Extracto seriado de etanol
ESH	:	Extracto seriado de hexano
Ext.	:	Extracto
FeCl ₃	:	Tricloruro de hierro (III)
Fenol.	:	Fenoles
fig.	:	Figura
FLA ₂	:	Fosfolipasa A ₂

Flav.	:	Flavonoides
graf.	:	Gráfico
H	:	Perdida por calentamiento
ILs	:	Interleuquinas
IM	:	Impurezas mecánicas
iNOS	:	Óxido nítrico sintasa inducible
I. Oxidación	:	Índice de oxidación
ISP	:	Instituto de Salud Pública
LOX	:	Lipoxigenasa
LTs	:	Leucotrienos
NF- $\kappa\beta$:	Factor nuclear kappa B
nm.	:	Nanómetros
NO	:	Óxido nítrico
NP	:	Natural Products
n.v.	:	Nombre vulgar
ORAC	:	Oxygen radical absorbance capacity
P	:	Pirque
PIs	:	Prostaciclinas
PGs	:	Prostaglandinas
PKC	:	Proteína quinasa C
PL	:	Fosfolípidos
R	:	Resinas
R _d	:	Rendimiento
S _E	:	Sustancias extraíbles en n-hexano
RNA	:	Ácido ribonucleico

SEM	:	Error estándar de la media
TLR _s	:	Receptores de tipo Toll
TNF- α	:	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	:	13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
Tpo.	:	Tiempo
TXs	:	Tromboxanos
v.s.	:	Versus

RESUMEN

El propóleo es una sustancia de naturaleza compleja, altamente adhesiva, recolectada y usada por las abejas. Está constituido por sustancias resinosas, gomosas y balsámicas; ceras, aceites esenciales y polen. La obtención del propóleo se lleva a cabo cuando las abejas extraen sustancias de las yemas vegetales, hojas y grietas de las cortezas de los árboles, para mezclarlas posteriormente con secreciones de sus glándulas mandibulares (cera y enzimas).

Al propóleo se le han atribuido diversas propiedades farmacológicas tales como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antiulcerosa, hepatoprotectora y antitumoral, entre otras.

El siguiente trabajo tuvo como objetivo evaluar la calidad fisicoquímica de cinco propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile (Caleu, Cajón del Maipo, Curacaví, Buin y Pirque), utilizando como referencia la Norma IRAM-INTA 15935-1, del Instituto Argentino de Normalización, y evaluar el efecto antiinflamatorio tópico (EAI) en ratones, utilizando al ácido araquidónico (AA) y al 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) como agentes inflamatorios.

Los propóleos evaluados, cumplieron con los parámetros exigidos por la norma Argentina IRAM-INTA 15935-1 (2008), demostrando que los propóleos chilenos son similares o incluso mejores, respecto a la calidad, que los propóleos colombianos, argentinos y brasileros.

Todos los extractos etanólicos globales de los propóleos estudiados presentaron actividad antiinflamatoria significativa al utilizar TPA como agente inflamatorio, donde el resultado mayor fue para el propóleo de Curacaví ($62,6 \% \pm 3,7$), el menor fue para el de Caleu ($49,5 \% \pm 3,2$) y ninguno superó el efecto alcanzado por el fármaco de referencia indometacina ($92,9 \% \pm 3,2$). En cambio para la inflamación causada por AA cuatro de los cinco propóleos mostraron actividad antiinflamatoria significativa, donde el valor más alto fue para el propóleo de Buin ($58,7 \% \pm 6,5$) y lo sigue de forma muy cercana el de Curacaví ($57,8 \% \pm 3,9$); ambos muestran un efecto muy superior al fármaco de referencia nimesulida ($48,8 \% \pm 4,0$). Finalmente, la magnitud de los EAI estuvo directamente relacionada con la concentración de compuestos fenólicos totales de este producto apícola.

ABSTRACT

QUALITY ANALYSIS AND *IN VIVO* TOPICAL ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF PROPOLIS FROM METROPOLITAN REGION

Propolis is a complex, highly adhesive substance, collected and used by bees. It consists of resinous, rubbery and balsamic substances; waxes, essential oils and pollen. The obtaining of propolis is performed when substances extracted by bees from plant buds, leaves and crevices in the bark of trees, are later mixed with secretions from their mandibular glands.

Several pharmacological properties have been ascribed for propolis such as antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antiulcer, hepatoprotective and anti-tumor, among others.

The objective of this study was to evaluate the physicochemical quality of five propolis from the Región Metropolitana de Santiago de Chile (Caleu, Cajon del Maipo, Curacaví, Buin and Pirque), using the IRAM-INTA 15935-1 standard, by the Instituto Argentino de Normalización as reference and evaluate the topical anti-inflammatory effect (EAI, in Spanish) in mice, using the arachidonic acid (AA) and 13-tetradecanoylphorbol 12-acetate (TPA) as inflammatory agents.

The evaluated propolis, succeeded with the parameters required by the argentinian standard IRAM-INTA 15935-1 (2008), showing that the chilean propolis were similar or even better than its colombian, argentinian and brazilian counterparts, in quality terms.

All of the studied global ethanol extracts of propolis showed significant anti-inflammatory activity using TPA as inflammatory agent, where the higher result was for propolis from Curacaví (62,6 % \pm 3,7), the lowest was for propolis from Caleu (49,5 % \pm 3,2) and none exceeded the effect achieved by the reference drug indomethacin (92,9 % \pm 3,2). On the other hand, for the AA induced inflammation, four out of five propolis showed significant anti-inflammatory activity, where the highest value was for propolis from Buin (58,7 % \pm 6,5) followed very closely by propolis from Curacaví (57,8 % \pm 3,9). Both showed a far superior

effect to the reference drug nimesulide ($48,8 \% \pm 4,0$). Finally, the results for EAI are closely related to the concentration of total phenolic compounds of propolis.

I. INTRODUCCIÓN

La palabra **propóleo** deriva del griego *pro* (en defensa de) y *polis* (ciudad); con ella se designa a la sustancia que recubre la colmena o *polis* de las abejas, desempeñando funciones defensivas (Palomino *et al.*, 2009).

El propóleo es una sustancia de naturaleza compleja, altamente adhesiva, recolectada y usada por las *Apis mellifera* L. (n.v. abejas) (Peña, 2008). Está constituido por sustancias resinosas, gomosas y balsámicas; ceras, aceites esenciales y polen (Woisky & Salatino, 1998; Tosi *et al.*, 2006). Como se aprecia en la figura 1, la consistencia es muy variada y presentan distintas tonalidades de color castaño, marrón, pardo, rojizo y verde, según sea el origen botánico y geográfico (Salamanca *et al.*, 2007). El aroma puede ser suave, intenso, dulce o desagradable, según el lugar de recolección (Tosi *et al.*, 2006).

**A****B**

Figura 1: Propóleos en bruto con distintas consistencias y coloraciones, A. Propóleo de Buin; B. Propóleo de Curacaví

La obtención del propóleo se lleva a cabo cuando las abejas propolizadoras (figura 2) extraen, mediante sus mandíbulas, exudados de las yemas vegetales, de las hojas y de las grietas de las cortezas de los árboles, para posteriormente mezclarlos con secreciones de sus glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) permitiendo su ablandamiento para tritararlo, y produciendo una hidrólisis enzimática a algunos de sus componentes (Salamanca *et al.*, 2007; Kalogeropoulos *et al.*, 2009).

Las abejas utilizan el propóleo para barnizar el interior de la colmena con fines desinfectantes, para cerrar grietas y consolidar los componentes estructurales. También lo utilizan para recubrir los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena (escarabajos, lagartijas, entre otras), los que quedan embalsamados evitando así su descomposición (Palomino *et al.*, 2009).

La composición química del propóleo es compleja y depende de la flora presente en el área de recolección, sin embargo, se han identificado como principales componentes: alcoholes, aldehídos, aminoácidos, ácidos y ésteres aromáticos, flavonoides, ácidos grasos, lignanos, triterpenos y esteroides (Woisky & Salatino, 1998; Russo *et al.*, 2004).



Figura 2: *Apis mellifera* L.

En el hemisferio norte (Europa, América del Norte, del Sur y Asia occidental), las especies vegetales, que las abejas comúnmente visitan para la elaboración del propóleo, son las siguientes: *Populus spp.* (n.v. Álamos), *Betula spp.* (n.v. Abedules), *Ulmus spp.* (n.v. Olmos), *Quercus spp.* (n.v. Robles), *Salix spp.* (n.v. Sauces), *Aesculus hippocastanum* L. (n.v. Castaño de Indias) y *Picea spp.* (n.v. Coníferas) (Kosalec *et al.*, 2003).

Este producto de la colmena ha sido utilizado desde tiempos antiguos por las propiedades farmacéuticas que se le han atribuido, tales como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antiulcerosa, hepatoprotectora, antitumoral, entre otras. Cabe destacar que algunos de estos efectos han sido relacionados con el contenido de compuestos fenólicos, especialmente de flavonoides (Peña, 2008; Alencar *et al.*, 2007).

Los flavonoides, junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres, genéricamente incluidos en los denominados “compuestos fenólicos”, son actualmente considerados los principales componentes bioactivos del propóleo. Estos compuestos tienen importantes propiedades farmacológicas, destacándose la actividad antioxidante que permite disminuir la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, particularmente frente a radicales alcoxi y superóxido (Salamanca *et al.*, 2007).

Dentro de los flavonoides descritos comúnmente en el propóleo se han encontrado: apigenina, crisina, quercetina, canferol, galangina, pinocembrina, hesperidina, acacetina, medicarpina y canferido, entre otros (Bedascarrasbure *et al.*, 2004; Alencar *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 2004).

El propóleo es ampliamente utilizado en la medicina folclórica, en apiterapia, como constituyente de productos cosméticos y como comida saludable, entre otros (Kalogeropoulos *et al.*, 2009). A pesar de que se han reportado reacciones alérgicas debido a la presencia de las ceras (Peña, 2008), el propóleo es relativamente seguro, observándose que, a una dosis de 2000 mg/Kg administrada en ratones, no presentó efectos tóxicos agudos (Mohammadzadeh *et al.*, 2007b).

Finalmente, la amplia diversidad en la composición química de este producto apícola y su empleo generalizado en la industria, han traído como consecuencia la necesidad del control de calidad y la estandarización de sus componentes activos. Con este fin, se han desarrollado diversas normas internacionales, como por ejemplo, la norma Ramal Rusa RST 317-1977, la norma Ramal del Ministerio de Agricultura de Cuba-1994, el reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos del Ministerio de Agricultura de Brasil-1999 y la norma IRAM, del Instituto Argentino de Normalización – Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA-2008 (Palomino *et al.*, 2009), esta última fue utilizada para realizar el análisis de la calidad fisicoquímica de los propóleos evaluados (características sensoriales, pérdida por calentamiento, índice de oxidación, sustancias extraíbles en n-hexano, determinación de resinas, determinación de impurezas mecánicas, determinación de flavonoides, determinación de compuestos fenólicos totales y determinación de cenizas), debido a que es una versión actualizada de las primeras normas realizadas, permitiéndonos comparar nuestros resultados, con otros estudios internacionales.

Es evidente que la introducción efectiva del propóleo en la terapéutica depende de las condiciones estandarizadas de recolección y de los procedimientos sistemáticos de control de sus parámetros físico-químicos, químicos y microbiológicos (Woisky & Salatino, 1998). Actualmente en Chile todavía no se ha creado ningún protocolo o norma



Figura 3: Propóleo en cápsulas

para evaluar a los propóleos nacionales. A pesar de ello, se comercializan en la farmacia una serie de preparados con fines terapéuticos, como son los spray de uso local, jarabes y cápsulas (figura 3), entre otros.

Muchos países han estudiado los efectos farmacológicos de sus propóleos, como por ejemplo, se ha evaluado la actividad antioxidante de propóleos de Irán (Mohammadzadeh *et al.*, 2007a), la actividad antimicrobiana de propóleos de Brasil (Alencar *et al.*, 2007), la actividad antitumoral de propóleos de Croacia (Orsolíc & Basic, 2004) y el efecto antiinflamatorio de propóleos de Corea (Seon Song *et al.*, 2002). Por el contrario, en Chile son bastante limitados estos estudios, encontrando sólo el efecto antifúngico sobre *Candida spp.* (Herrera *et al.*, 2010) y la capacidad de modular el metabolismo de la glucosa en ratones diabéticos. (Pacheco *et al.*, 2011). Sin embargo, existe una mayor diversidad de estudios chilenos relacionados con la determinación de la composición química de nuestros propóleos (Peña, 2008). Por todo lo mencionado anteriormente, es de suma importancia la realización de nuevos estudios científicos en este tema, ya que nos permitirán identificar y clasificar las diversas propiedades farmacológicas de los propóleos de distintos lugares de nuestro país y avanzar hacia la estandarización de este producto apícola.

En esta memoria se determinó la actividad antiinflamatoria tópica, de propóleos de distintos lugares de la Región Metropolitana de Santiago. Para este estudio se utilizaron dos agentes inflamatorios, 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) y ácido araquidónico (AA), debido a que generan distintos mediadores proinflamatorios permitiéndonos estimar el posible mecanismo de acción de los propóleos.

La **inflamación** es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados, por patógenos o por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque es dolorosa, normalmente es una respuesta reparadora, que contempla entre otras cosas, la eliminación de agentes patógenos y de células infectadas, la creación de barreras y la reparación del tejido lesionado por la agresión o por la respuesta del huésped (García, 2008).

La respuesta tisular a la agresión contempla cuatro componentes, a modo de una cascada inflamatoria, estas son: Inductores inflamatorios, los sensores que los detectan, los mediadores inflamatorios inducidos por los sensores y los tejidos diana que serán afectados por los mediadores. Así, el tipo de vía inducida, dependerá de la naturaleza de la activación inflamatoria. De esta forma, las bacterias serán detectadas por los receptores de tipo Toll (TLR_s) propios de los macrófagos, produciendo citoquinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral- α , interleuquinas), prostaglandinas (PGs) y quimioquinas. Estos mediadores actúan en diversos tejidos, incluyendo vasos sanguíneos, provocando vasodilatación y extravasación de neutrófilos. Los neutrófilos juntos a los macrófagos y los mastocitos destruyen a los patógenos. A su vez, las infecciones virales inducen a la síntesis de Interferones de tipo I y la activación de linfocitos citotóxicos, mientras que las infecciones por parásitos producen interleuquina-5 (IL-5) e histamina por mastocitos y basófilos (Medzhitov, 2010).

El reconocimiento de estos patógenos conduce a la síntesis de mediadores lipídicos de la inflamación conocidos bajo el nombre colectivo de eicosanoides. Los eicosanoides derivan del ácido araquidónico (AA), un ácido graso ω -6 poliinsaturado que los mamíferos pueden incorporar directamente a través la dieta o sintetizar a partir de ácido linoleico (Astudillo *et al.*, 2009).

Dentro de este grupo de mediadores lipídicos encontramos a las prostaglandinas (PGs), que son pequeñas moléculas que regulan numerosos procesos orgánicos. La producción de PGs comienza con la liberación de AA desde los fosfolípidos (PL) de las membranas celulares, por acción de la fosfolipasa A₂ (FLA₂) en respuesta a estímulos inflamatorios. El AA es convertido a PGH₂ por las enzimas ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2). COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y participa en procesos homeostáticos (ej. protección del epitelio gástrico); COX-2, por el contrario, es una enzima inducible y se encuentra involucrada principalmente en la regulación de la inflamación. La vía COX da lugar a PGs, tromboxanos (TXs) y prostaciclina (PI). Las PIs son eficaces antiinflamatorios, mientras que las PGs clásicas (PGE₂ y PGF_{2 α}) y TXs son proinflamatorias. El AA puede ser metabolizado a través de otras dos vías enzimáticas: lipoxigenasas (LOXs), que dan lugar a los hidroperóxidos, leucotrienos (LTs) y lipoxinas; y el citocromo P₄₅₀ que forma derivados epóxidos. Mientras que los LTs son potentes proinflamatorios, las lipoxinas frenan el proceso inflamatorio. De esta

forma, cuando la concentración local de PGE₂ incrementa, consigue un efecto inhibitor de la COX₂ y de la LOX-5 (generadora de LTB₄), a la vez que induce la expresión de LOX-15 (generadora de lipoxinas que frenan el influjo de neutrófilos). Tales efectos detienen el proceso de inflamación (García, 2008).

Por otra parte, el incremento de la concentración local de mediadores proinflamatorios provocan los signos clínicos de la inflamación: calor, rubor, tumor y dolor; definidos previamente por el doctor romano Cornelius Celso (García, 2008). Posteriormente Rudolph Virchow en 1858 agregó un quinto signo, el trastorno de la función (*functio laesa*) (Medzhitov, 2010). Estos síntomas microscópicamente se entienden como producto de la vasodilatación, acumulación de leucocitos, infiltración del líquido intersticial y la estimulación nerviosa (Cone, 2001).

En las diferentes investigaciones, es bastante común observar que se utilice AA y TPA como agentes inflamatorios tópicos en animales. Este último se obtiene del aceite de croton (*Croton tiglium* L.) y posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores. Su mecanismo de acción no está dilucidado totalmente, pero se sabe que es mediado por la activación de la proteína quinasa C (PKC), y de la FLA₂, como también por la inducción de las COXs y la translocación/activación de las LOXs (Franco *et al.*, 2007; Murakawa *et al.*, 2006). A nivel bioquímico aumenta la producción de eicosanoides, principalmente de PGE₂ y LTB₄; y de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Murakawa *et al.*, 2006; Puignero *et al.*, 1998). La inflamación por TPA consta de dos etapas, una temprana (3 h después de la aplicación) donde el engrosamiento de la dermis es evidente, pero con poca cantidad de infiltrado; y una tardía (6 h, en este momento se observa el edema máximo ocurrido) donde hay una gran cantidad de infiltrados (Murakawa *et al.*, 2006). También hay producción del ácido ribonucleico (RNA) y del ácido desoxirribonucleico (DNA) entre las 12 h y 48 h con el fin de sintetizar nuevas proteínas en el desarrollo del edema, ya que se producen cambios en la agrupación epidérmica de estas (Gómez *et al.*, 2011; Inoue *et al.*, 1989). A diferencia del TPA, el AA induce una respuesta inflamatoria de corta duración (6 h), paralela a la generación de PGs, TXs y de LTs (Puignero *et al.*, 1998), presentando un edema máximo transcurrido 1 h tras la aplicación del agente inflamatorio.

II. HIPÓTESIS

Los propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile cumplen con el criterio de calidad fisicoquímica, exigido por la norma IRAM, del Instituto Argentino de Normalización – Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA-2008.

Los propóleos presentan actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* y la magnitud de ésta depende directamente de la concentración de flavonoides y del total de los compuestos fenólicos presentes en las muestras.

III. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

Contribuir al conocimiento farmacológico de distintas muestras de propóleos de la Región Metropolitana de Santiago (Caleu, Cajón del Maipo, Buin, Curacaví y Pirque), determinando su actividad antiinflamatoria tópica. Además de contribuir con la determinación de las propiedades fisicoquímicas de los propóleos, mediante un análisis del control de calidad de éstos.

2. Objetivos específicos

- Recolectar las muestras de propóleos y preparar los distintos extractos.
- Analizar la calidad fisicoquímica de los propóleos Chilenos según la norma Argentina IRAM-INTA 15935-1 (2008), que incluye la concentración de flavonoides y compuestos fenólicos totales.
- Analizar cualitativamente, en forma comparativa, la composición química de los propóleos mediante cromatografías en capa fina (c.c.f.).
- Evaluar *in vivo* la actividad antiinflamatoria tópica de los diferentes extractos globales.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección de las muestras

Se recolectaron muestras de propóleo, durante el periodo de primavera-verano del año 2011, de colmenas situadas en las siguientes localidades de la Región Metropolitana de Santiago (fig. 4):

- ❖ Cajón del Maipo
- ❖ Caleu
- ❖ Curacaví
- ❖ Buin
- ❖ Pirque

Posteriormente las muestras fueron almacenadas a 8°C y protegidas de la luz.



Figura 4: Zonas de recolección del propóleo

2. Preparación de extractos globales y seriados

2.1.- Descerado con ciclos de temperatura

Para poder elaborar los distintos extractos, fue necesario realizar un proceso previo de descerado mixto (con ciclos de temperatura), según las metodologías propuestas por Alencar *et al.* (2007) y Kalogeropoulos *et al.* (2009).

2.1.1. Procedimiento

Como se visualiza en el esquema 2.1.2, se masaron 300 g de propóleo en bruto y se adicionaron 500 mL de etanol. La mezcla etanólica se introdujo a un baño termoregulado a 70°C durante 30 min. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se refrigeró a -20°C, durante 12 h. Se filtró en frío con papel plegado múltiple y se conservó el sobrenadante para repetir el procedimiento un mínimo de tres veces, para lograr la eliminación completa de las ceras.

2.1.2. Esquema



Figura 5: Propóleo en bruto



Figura 6: Solución etanólica de propóleo

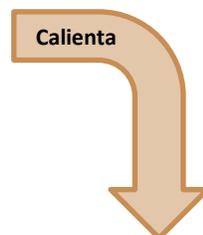


Figura 8: Refrigerador a -20°C



Figura 7: Baño Termorregulador a 70°C



Figura 9: Propóleo filtrado en frío

2.2.- Extracción con solventes de polaridad creciente para obtener los extractos seriados

2.2.1. Procedimiento

Una vez descerado el propóleo, se concentró el extracto en un evaporador rotatorio hasta eliminar completamente el solvente (etanol), obteniendo así el extracto etanólico global (EEG). Se guardó una cantidad suficiente del EEG seco y el resto se utilizó para obtener los extractos seriados, los cuales se elaboraron mediante la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y etanol, para luego ser concentradas en el evaporador rotatorio hasta eliminar el solvente. Obteniendo de esta forma los extractos: seriados de hexano (ESH), seriados de diclorometano (ESD) y los extractos seriados de etanol (ESE), respectivamente. Cada extracción se realizó mediante agitación constante y hasta lograr el total agotamiento de la muestra.

2.2.2. Cálculos

- Se calculó el rendimiento (R_d) de los extractos mediante la siguiente fórmula:

$$R_d = \frac{P_f \cdot 100}{P_i}$$

Dónde:

R_d = Rendimiento (g/100g)

P_f = Masa final del EEG o de los extractos seriados

P_i = Masa muestra propóleo en bruto (en caso de EEG) y masa del EEG seco (en caso de extractos seriados)

3. Control de calidad fisicoquímica de acuerdo con la Norma Argentina IRAM-INTA (2008)

3.1.- Características sensoriales del propóleo en bruto

La determinación se realizó mediante los sentidos, lo evaluaron cinco personas y se consideró el resultado mayoritario. Se determinó: olor (intenso, suave, dulce), color (amarillo, pardo, verdoso, marrón, rojizo o negro), sabor (suave, fuerte y picante), consistencia (maleable o rígido) y aspecto (homogéneo o heterogéneo) (según la Norma Argentina IRAM-INTA, 2008).

3.2.- Determinación de la pérdida por calentamiento del propóleo en bruto

3.2.1. Procedimiento

La determinación se efectuó por triplicado. Se taró una cápsula de porcelana previamente secada en estufa a 100°C y se masaron aproximadamente 4 g de propóleo en bruto, se calentó en una estufa regulada a 100°C ± 2°C durante 2 h. Posteriormente se retiró la cápsula, se colocó en un desecador hasta que llegó a temperatura ambiente y se masó. El resultado se expresó como el promedio de las mediciones ± la desviación estándar (d.s.) (según Norma Argentina IRAM-INTA., 2008).

3.2.2. Cálculos

- Se calculó la pérdida por calentamiento (H) mediante la siguiente fórmula:

$$H = 100 \cdot \left[1 - \frac{(C_{TS} - m_{100})}{(C_{TH} - m_{100})} \right]$$

Dónde:

H = Pérdida por calentamiento (humedad) (g/ 100 g)

C_{TS} = Masa de la cápsula con la muestra seca (g)

C_{TH} = Masa de la cápsula con la muestra en bruto (g)

M₁₀₀ = Masa de la cápsula vacía (g)

3.3.- Determinación del índice de oxidación

3.3.1. Procedimiento

La determinación se efectuó por triplicado. Se masaron 0,2 g de la muestra de propóleo en bruto y se colocó en un matraz de 125 mL. Se añadió 5 mL de etanol 96 % y se dejó en reposo durante 1 h. Luego se completó el volumen con agua destilada, se filtró a través de un papel filtro simple y se recogió el filtrado. Se colocaron 2 mL del filtrado en un tubo de ensayo, se añadió 1 mL de solución de ácido sulfúrico al 98% y se agitó durante 1 min. Posteriormente se agregó en el tubo 1 gota de solución de permanganato de potasio 0,1 N y se puso en marcha el cronómetro al entrar en contacto la gota con la solución. Se registró el tiempo en que la solución tardó en decolorarse, en segundos (s). El permanganato al reducirse cambia de un color rosado fuerte a incoloro. El resultado se expresó como el promedio de las determinaciones \pm d.s. (según Norma Argentina IRAM-INTA, 2008).

3.4.- Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles en n-hexano

3.4.1. Procedimiento

La determinación se efectuó por triplicado. Se masaron aproximadamente 2 g de propóleo en bruto, se depositó en un cartucho de celulosa seco previamente tarado y posteriormente se colocó en el cuerpo de un extractor de Soxhlet. Se taró el balón del extractor de Soxhlet, y se colocó en él un volumen adecuado de n-hexano y se calentó durante 6 h, una vez que el solvente entró en ebullición. En el balón quedaron las ceras disueltas en n-hexano, por lo que fue necesario evaporar el solvente en un evaporador rotatorio; el remanente se trasladó a una cápsula de Petri, la cual se colocó en un desecador hasta temperatura ambiente, para

finalmente masarla. Se masó hasta lograr constancia de masa (cuya diferencia no fuese más de 5 mg). El resultado se expresó como el promedio de las determinaciones \pm d.s. (según Norma Argentina IRAM-INTA, 2008).

3.4.2. Cálculos

- Se calculó el contenido de sustancias extraíbles (S_E) mediante la fórmula siguiente:

$$S_E = \frac{(B_{C1} - B_{C0})}{m} \cdot 100$$

Dónde:

S_E = Contenido de sustancias extraíbles en n-hexano (g/100 g)

B_{C1} = Masa de la cápsula de Petri con sustancias extraíbles (g)

B_{C0} = Masa de la cápsula vacía (g)

m = Masa del propóleo bruto (g)

3.5.- Determinación del porcentaje de resinas

3.5.1. Procedimiento

La determinación se efectuó por triplicado. Se colocó el remanente de cada una de las muestras resultantes del procedimiento anterior (es decir el propóleo en bruto agotado con n-hexano), en el cuerpo de un extractor Soxhlet y se colocó en el balón del extractor un volumen adecuado de etanol al 96% y se calentó hasta que el solvente entró en ebullición. Se mantuvo en esas condiciones durante 6 h como mínimo, hasta que el etanol en contacto con la muestra fuera incoloro. El punto final de la extracción se determinó agregando aproximadamente 0,1 mL de una solución de $FeCl_3$ al 10%, a un 1 mL de dicho etanol y se observó el cambio de color de la solución; cuando no viró de amarillento a verdoso, se dio por finalizada la extracción. La aparición de un color verde indica la presencia de compuestos fenólicos (Silver et al., 1979).

Posteriormente se depositó cuantitativamente la solución etanólica contenida en el balón a un matraz aforado de 100 mL y se aforó con etanol. A una muestra de 50 mL de esta solución se le eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio y a continuación, se colocó en una estufa a 80 °C para evaporar los restos de etanol. Luego, se colocó en un desecador hasta temperatura ambiente y se masó. Se repitió el último procedimiento hasta lograr constancia de masa, (cuya diferencia no fuese más de 5 mg). Los 50 mL restantes se guardaron en frascos ámbar para la determinación de compuestos fenólicos y flavonoides. El resultado se expresó como el promedio de las determinaciones \pm d.s. (según Norma Argentina IRAM-INTA, 2008).

3.5.2. Cálculos

- Se calcularon los porcentajes de resinas (R) mediante la fórmula siguiente:

$$R = \frac{(B_{R1} - B_{R0})}{m} \cdot 200$$

Dónde:

R = Contenido de resinas (g/100 g)

B_{R1} = Masa del balón con resinas secas (g)

B_{R0} = Masa del balón vacío seco (g)

M = Masa del propóleo en bruto (g)

3.6.- Determinación del porcentaje de impurezas mecánicas

3.6.1. Procedimiento

El ensayo se efectuó por triplicado. El propóleo en bruto proveniente de los puntos 3.4.1. y 3.5.1. (es decir, la muestra agotada con n-hexano y etanol) fue secada a 80 °C, luego fue depositada en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se masó hasta peso constante (cuya diferencia no fuese más de 5 mg). El resultado se expresó como el promedio de las determinaciones \pm la d.s. (según Norma Argentina IRAM-INTA., 2008).

3.6.2. Cálculos

- El contenido de impurezas mecánicas (IM) fue calculado mediante la fórmula siguiente:

$$IM = \frac{(P_1 - P)}{m} \cdot 100$$

Dónde:

IM = Contenido de impurezas mecánicas (g/100g)

P1 = Masa del cartucho (o el papel) seco (g)

P = Masa del cartucho (o el papel) vacío seco (g)

m = Masa de la muestra (g)

3.7.- Determinación de flavonoides mediante la reacción colorimétrica con tricloruro de aluminio

La determinación de los flavonoides de la solución etanólica de resinas (proveniente del ensayo 3.5.1) de cada uno de los propóleos en estudio, se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico con tricloruro de aluminio. La sustancia patrón utilizada fue la quercetina.

3.7.1. Procedimiento para construir la curva de calibración de quercetina

Se prepararon soluciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL de quercetina en metanol. A distintos volúmenes de una solución madre de quercetina (concentración de 100 µg/mL), se le agregaron 0,5 mL de una solución de tricloruro de aluminio (5 % p/v) y se enrasó a 25 mL con metanol. Se dejaron 30 min en la oscuridad, para luego leer las absorbancias a 465 nm en un espectrofotómetro Unicam UV-VIS (según Norma Argentina IRAM-INTA., 2008).

3.7.2. Procedimiento para la determinación de flavonoides de las muestras

La determinación se efectuó por triplicado. Se pipetearon 0,5 mL de la solución etanólica de resinas, se agregaron 0,5 mL de la solución de tricloruro de aluminio y luego se enrasaron con metanol a 25 mL. Se preparó un blanco con 0,5 mL de alcohol etílico y 0,5 mL de solución de tricloruro de aluminio y se enrasó con metanol. Las soluciones se dejaron en la oscuridad durante 30 min, se colocaron en una cubeta de cuarzo y se leyeron las absorbancias a 465 nm.

Cuando se obtuvo una absorbancia (A) muy baja o muy alta, se aumentó o disminuyó la concentración de las soluciones etanólicas de resinas, respectivamente. Con los valores de A obtenidos, se interpoló en la curva de calibración, y se obtuvieron las concentraciones de flavonoides expresadas como equivalentes de quercetina. El resultado (g/100g) se enunció como el promedio de las determinaciones \pm d.s. (según Norma Argentina IRAM-INTA, 2008).

3.8.- Determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método de microfolin

La determinación del contenido total de compuestos fenólicos de la solución etanólica de resinas (proveniente del ensayo 3.5.1) de cada uno de los propóleos en estudio, se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La sustancia patrón utilizada fue el ácido gálico.

3.8.1. Procedimiento para realizar la curva calibración de ácido gálico

Se prepararon soluciones acuosas con distintas concentraciones de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 % p/v) desde una solución madre de ácido gálico al 1 % p/v. El volumen final fue de 10 mL.

Posteriormente se tomaron 100 μ L de cada solución y se colocaron en tubos eppendorf, se agregaron 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó suavemente y se dejaron en reposo durante 2 min. Luego se añadieron 800 μ L de una solución de carbonato de sodio y se calentó en un baño termorregulador a 40°C durante 20 min. Finalmente, se colocaron las soluciones en cubetas de cuarzo y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro Unicam UV-VIS a 740

nm, contra un blanco (100 μ L agua destilada, 100 μ L reactivo de Folin-Ciocalteu y 800 μ L de la solución de carbonato de sodio, sometido a las mismas condiciones) (Cicco *et al.*, 2009).

3.8.2. Procedimiento para la determinación de compuestos fenólicos totales de las muestras

La determinación se efectuó por triplicado. Se tomó 5 ml de la solución etanólica de resinas (proveniente del ensayo 3.5.1) de cada propóleo y se completó a un volumen de 100 mL con agua destilada. Se realizaron las diluciones necesarias y se agregaron 100 μ L de la solución a un tubo eppendorf, seguido de 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego se agitaron suavemente y se dejaron en reposo durante 2 min. Se añadieron 800 μ L de la solución de carbonato de sodio y se calentaron en un baño termorregulado a 50 °C durante 20 min. Finalmente se colocaron las soluciones en cubetas de cuarzo y se leyeron las A en un espectrofotómetro a 740 nm contra un blanco preparado en las mismas condiciones. Los valores de A obtenidos, se interpolaron en la curva de calibración, y se obtuvieron las concentraciones de compuestos fenólicos totales, expresadas como equivalentes de ácido gálico. El resultado (g/100) se enunció como el promedio de las determinaciones \pm d.s. (Cicco *et al.*, 2009).

3.9.- Determinación del porcentaje de cenizas en las muestra de propóleo en bruto

Las muestras evaluadas provienen del ensayo 3.2.1, es decir son muestras de propóleos en bruto previamente sometidas a calentamiento a 100°C durante 2 h.

3.9.1. Procedimiento

La determinación se efectuó por triplicado. A la muestra, se le agregó ácido sulfúrico al 98% y se quemó en un mechero bajo campana para eliminar elementos orgánicos, según farmacopea. Luego se llevó a un horno de mufla, y se incineró a 550 °C \pm 25 °C, hasta obtener las cenizas. A continuación se dejó enfriar en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente, para luego masarlas hasta obtener masa constante (no difieren entre sí en más de 5 mg). El resultado se expresó como el promedio de las determinaciones \pm d.s. (según Norma Argentina IRAM-INTA., 2008).

3.9.2. Cálculos

- Se calculó el porcentaje de cenizas (C), mediante la fórmula siguiente:

$$C = \frac{(C_z - m)}{(C_{ph} - m)} \cdot 100$$

Dónde:

C = Porcentaje cenizas (g/100 g)

C_Z = Masa de la cápsula con cenizas (g)

C_{Ph} = Masa de la cápsula con la muestra húmeda (g)

m = Masa de la cápsula (g)

4. Determinación de los perfiles cromatográficos de los diferentes extractos de propóleos, por cromatografía en capa fina (c.c.f.)

Se realizó un análisis cualitativo mediante c.c.f. de los distintos extractos preparados (globales y seriados, provenientes del punto 2.2.1) de los cinco propóleos en estudio, con el objetivo de determinar la probable presencia de familias de compuestos frecuentemente descritos en los propóleos como fenoles, triterpenoides y esteroides, entre otros.

Las cromatografías fueron desarrolladas en cromatofolios de aluminio con Sílica gel 60 F₂₅₄, empleando como fase móvil una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético glacial (60:40:1).

Los cromatofolios fueron visualizados a luz ultravioleta a las longitudes de onda 254 y 365 nm y reveladas con los siguientes reactivos (Wagner & Blatt, 1996):

- Liebermann-Burchard (5 mL de anhídrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 50 mL de etanol absoluto). Los cromatofolios rociados con este reactivo fueron

calentados a 100°C por 2 min y observados al visible. Este revelador permitió detectar la posible presencia de triterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y esteroides.

- Natural products (NP) (2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol). Los cromatofolios rociados con este reactivo fueron observados a luz UV a una longitud de onda de 365 nm. Este reactivo permitió detectar la posible presencia de flavonoides, otros ácidos fenólicos y cumarinas.
- P-anisaldehído sulfúrico (0,5 mL de anisaldehído, 10 mL ácido de acético glacial, 85 mL de etanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado). Los cromatofolios rociados con este reactivo fueron calentados a 100°C por 2 min y observados al visible. Este reactivo permitió detectar la posible presencia de triterpenoides, saponinas y aceites esenciales.

5. Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica *in vivo*

5.1. Procedimiento

Los ensayos fueron llevados a cabo empleando ocho ratones tratados con cada extracto a evaluar y dieciséis animales controles, ambos de la cepa CF1 (ratones albinos suizos) de 20-25 g.

Se aplicaron 10 µL de la muestra en la parte interna de la oreja derecha del ratón y 10 µL en la parte externa, como se puede observar en la figura 10, mientras que en la oreja izquierda se aplicó sólo el vehículo de la muestra. Luego de 5 min se aplicó en la oreja derecha el agente inflamatorio, AA o TPA, a la dosis de 2 mg/oreja y 5 µg/oreja, respectivamente (Lloret y Moreno, 1955).

Los fármacos de referencia que se utilizaron son nimesulida para el AA e indometacina para el TPA.

Una hora después de aplicado el AA o 6 horas después de aplicado el TPA los animales se sacrificaron por dislocación cervical y a continuación se les extrajo a cada ratón un disco de 6

mm de diámetro de ambas orejas como se aprecia en la figura 11. La magnitud del edema fue determinada mediante la diferencia del peso de la oreja derecha respecto de la izquierda. La actividad antiinflamatoria de las muestras fueron calculadas comparando la mediana de los pesos de los edemas producidos en los animales controles y en los tratados con la muestra.

El manejo estadístico de los datos para determinar la significancia de los efectos antiinflamatorios (EAI) de las muestras, fue a través del método no paramétrico para datos independientes, Mann-Whitney y la significancia estadística de todos los grupos fue evaluada usando el test Kruskal-Wallis. Las diferencias serán consideradas significativas para un $p \leq 0,05$.

Este ensayo fue realizado en la Unidad de pruebas Biológicas del Instituto de Salud Pública (ISP), el cual cumple con las normas internacionales de mantención de animales de experimentación. En donde los modelos biológicos fueron mantenidos en instalaciones debidamente certificadas y los ensayos realizados se ajustaron a los principios éticos contenidos en las “Normas Internacionales en investigación Biomédicas que involucra el uso de animales”.

De acuerdo a las normas internacionales de bioética animal, se debe utilizar el mínimo de animales necesarios para obtener resultados válidos, aplicando siempre el principio de las 3 Rs (Reemplazar animales por otro sistema, Reducir número de animales y Refinar el trato del animal). Debido a esto, se calculó estadísticamente el número de animales necesitados para este ensayo, resultando que 8 es el número mínimo de ratones requeridos a intervenir, suficientes para obtener resultados estadísticamente significativos.

5.2. Imágenes

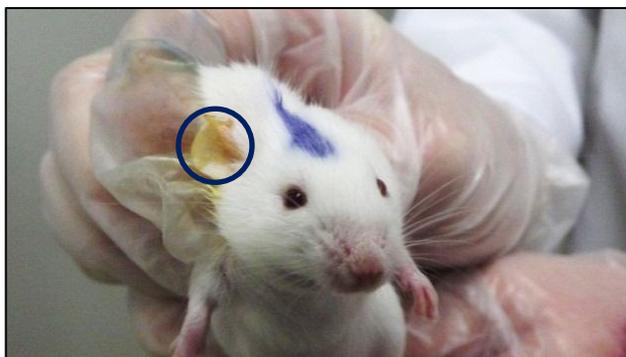


Figura 10: Ratón identificado y con la muestra de propóleo aplicada

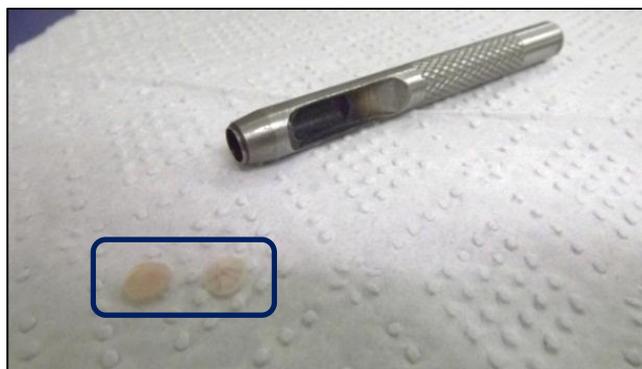


Figura 11: Sacabocados y discos de orejas de 6 mm

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

i. Preparación de los extractos globales y seriados

Los resultados de los rendimientos (R_d) de los extractos globales y seriados preparados, se expresan en la tabla 1 para los propóleos de Cajón del Maipo (CM), Caleu (CA), Curacaví (CV), Buin (B) y Pirque (P).

Tabla 1: Rendimientos de los diferentes extractos de propóleos

Propóleo	R_d EEG	R_d ESH	R_d ESD	R_d ESE
CM	23,5 %	0,1 %	87,3 %	1,9 %
CA	20,5 %	3,6 %	89,1 %	4,0 %
CV	26,0 %	0,2 %	84,8 %	6,1 %
B	33,0 %	0,3 %	62,0 %	19,6 %
P	31,5 %	0,2 %	69,2 %	7,4 %

Al observar los resultados, respecto a los extractos seriados, notamos que los rendimientos de los ESH son similares (a excepción del propóleo de Caleu) y muy bajos, esto último podría deberse a que hubo un proceso previo de descerado, el cual pudo arrastrar parte de los compuestos apolares. También podemos resaltar que dentro de los extractos seriados, el mejor rendimiento es para el ESD, luego le sigue el ESE y en último lugar el ESH.

Finalmente se pudo apreciar que los R_d de los todos los EEG son relativamente similares entre ellos.

ii. **Control de calidad fisicoquímica de acuerdo con la Norma Argentina IRAM-INTA (2008)**

1. **Características sensoriales del propóleo en bruto**

Se expresan a continuación los resultados de las características sensoriales evaluadas para los propóleos, junto a las fotografías de los propóleos en bruto de CM, CA, CV, B y P (figuras 12, 13, 14,15 y 16, respectivamente).

- **Propóleo Cajón de Maipo**

Color: Anaranjado y distintas tonalidades de café
 Olor: Dulce suave
 Sabor: insípido
 Consistencia: Maleable, granulado y poco pegajoso
 Aspecto: homogéneo



Figura 12

- **Propóleo Caleu**

Color: café verdoso oscuro
 Olor: dulce suave y agradable
 Sabor: cera suave
 Consistencia: duro y rígido
 Aspecto: heterogéneo



Figura 13

- **Propóleo Curacaví**

Color: amarillo mostaza
 Olor: dulce muy intenso
 Sabor: cera suave
 Consistencia: duro, rígido y pegajoso
 Aspecto: heterogéneo



Figura 14

- **Propóleo Buin**

Color: café tierra

Olor: dulce medianamente intenso

Sabor: insípido

Consistencia: maleable y pulverizado

Aspecto: homogéneo



Figura 15

- **Propóleo Pirque**

Color: amarillo mostaza oscuro con zonas anaranjadas

Olor: dulce suave y agradable

Sabor: insípido

Consistencia: rígido y pegajoso

Aspecto: homogéneo



Figura 16

2. Determinación de la pérdida por calentamiento del propóleo en bruto

Los resultados obtenidos en la determinación de humedad de las muestras de propóleos en bruto de CM, CA, CV, B y P se observan a continuación en la tabla 2.

Tabla 2: Pérdida por calentamiento de los propóleos en bruto

Propóleo	H ₁	H ₂	H ₃	H
CM	2,8 % p/p	2,9 % p/p	3,0 % p/p	2,9 % p/p ± 0,1
CA	2,3 % p/p	1,9 % p/p	2,1 % p/p	2,1 % p/p ± 0,2
CV	1,9 % p/p	2,0 % p/p	2,1 % p/p	2,0 % p/p ± 0,1
B	2,9 % p/p	3,5 % p/p	2,7 % p/p	3,0 % p/p ± 0,4
P	0,87 % p/p	0,92 % p/p	0,75 % p/p	0,85 % p/p ± 0,1

Según los requisitos de calidad exigidos por la norma Argentina utilizada, IRAM-INTA 15935-1 (2008), la pérdida por calentamiento tiene un máximo de 10% (10g/100g). Teniendo en cuenta el requisito de la norma, los cinco propóleos cumplen con este criterio, mostrando resultados bastante similares entre ellos, exceptuando al de Pirque que obtuvo un resultado mucho menor.

Este análisis es importante debido a que si las muestras poseen una humedad excesiva, se favorece el desarrollo de mohos y levaduras, además de fermentaciones que generan productos no deseados y toxinas perjudiciales para el organismo (Palomino *et al.*, 2010).

Propóleos de Argentina sometidos al mismo procedimiento han obtenido resultados entre 1,4% y 6,2% (Tosi *et al.*, 2006), siendo semejantes o incluso un poco más elevados, que los valores obtenidos por los propóleos evaluados en este trabajo. Lo mismo sucede si comparamos nuestros resultados con propóleos de Brasil, los cuales han obtenido porcentajes de humedad entre 3,4% y 5,4% (Días *et al.*, 2012).

3. Determinación del índice de oxidación

Los resultados de la determinación del índice de oxidación de las muestras de propóleos en bruto de CM, CA, CV, B y P, se enuncian en la tabla 3.

Tabla 3: Índice de oxidación de los propóleos en bruto

Propóleo	Tpo. Decoloración 1	Tpo. Decoloración 2	Tpo. Decoloración 3	I. Oxidación
CM	3,0 s	3,7 s	4,6 s	3,7 s ± 0,8
CA	11,6 s	13,3 s	18,6 s	14,5 s ± 3,7
CV	2,6 s	2,9 s	1,6 s	2,4 s ± 0,7
B	8,3 s	8,2 s	9,2 s	8,6 s ± 0,6
P	4,31 s	3,12 s	2,66 s	3,36 s ± 0,9

Según los requisitos de calidad exigidos, de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el tiempo máximo de decoloración de las muestras es de 22 s, por lo tanto, todas las

muestras de propóleos evaluadas cumplen con esta exigencia, siendo el de Curacaví el más bajo y el de Caleu el más alto.

Este tipo de análisis es utilizado para determinar la capacidad reductora de las muestras, permitiendo tener una estimación del efecto antioxidante de los propóleos (Salamanca *et al.*, 2007) y por lo tanto, indicando la posible presencia de compuestos de naturaleza fenólica, o con grupos funcionales oxidables (hidroxilos, insaturaciones, entre otras). (Palomino *et al.*, 2010). Sin embargo, este método es cualitativo y bastante subjetivo, dependiendo dentro de muchas cosas de la capacidad visual del analista.

Tosi *et al.* (2006) evaluaron el índice de oxidación de propóleos argentinos y obtuvieron resultados entre 16 y 21 s, los cuales son bastante más elevados que los obtenidos por los propóleos evaluados en este trabajo; mientras que propóleos colombianos obtuvieron un rango de valores entre 2,1 s. y 19,2 s., siendo más cercanos a nuestros resultados (Salamanca *et al.*, 2007).

4. Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles en n-hexano

A continuación se visualizan los resultados obtenidos en la determinación de sustancias extraíbles con n-hexano, para las muestras de CM, CA, CV, B y P, por medio de la tabla 4.

Tabla 4: Sustancias extraíbles en n-hexano de los propóleos

Propóleo	S _{E 1}	S _{E 2}	S _{E 3}	S _E
CM	27,7 % p/p	24,8 % p/p	29,7 % p/p	27,4 % p/p ± 2,5
CA	25,9 % p/p	26,4 % p/p	27,9 % p/p	26,7% p/p ± 1,0
CV	21,7 % p/p	19,3 % p/p	20,1 % p/p	20,4 % p/p ± 1,2
B	25,0 % p/p	25,6 % p/p	23,0 % p/p	24,5 % p/p ± 1,4
P	24,9 % p/p	22,9 % p/p	21,7 % p/p	23,2 % p/p ± 1,6

Según la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el máximo de sustancias extraíbles con n-hexano es de un 35% y de acuerdo a los resultados presentados en las tablas, todas las muestras de propóleo estudiadas cumplen con este parámetro de calidad. El resultado menor es el de Curacaví y el mayor es el de Cajón del Maipo.

Una gran cantidad de sustancias extraídas con solventes apolares como es el hexano, indica un gran contenido de ceras en el propóleo (Palomino *et al.*, 2010). Teniendo presente que los componentes bioactivos de los propóleos no se encuentran en las ceras, desde el punto de vista terapéutico, sería ideal que éstos tengan un bajo contenido de ceras y un mayor contenido de resinas. Además es importante mencionar, que el contenido de ceras está determinado por la época del año en donde se extrajo el propóleo y el procedimiento de cosecha (Palomino *et al.*, 2010; Woisky & Salatino, 1998).

Al evaluar nuestros resultados, podemos determinar que las diferentes muestras de propóleos poseen una baja cantidad de cera y además, los resultados son muy parecidos entre sí, demostrando cierta similitud entre los distintos tipos de propóleos en este aspecto.

Finalmente, investigaciones en propóleos argentinos obtuvieron valores entre 27,1% y 33,2% para este parámetro (Tosi *et al.*, 2006), resultando ser levemente superiores a los propóleos chilenos evaluados en este trabajo. Mientras que el porcentaje de ceras extraídas con hexano, para un propóleo de Antioquia, Colombia (72,32%) (Palomino *et al.*, 2010) fue considerablemente más alto.

5. Determinación del porcentaje de resinas

Por medio de la tabla 5 se expresan los resultados de la determinación de resinas para los propóleos de CM, CA, CV, B y P.

Tabla 5: Porcentajes de resinas de los propóleos

Propóleo	R ₁	R ₂	R ₃	R
CM	55,8 % p/p	58,6 % p/p	55,8 % p/p	56,7 % p/p ± 1,6
CA	65,2 % p/p	65,9 % p/p	73,1 % p/p	68,1 % p/p ± 4,4
CV	82,3 % p/p	82,3 % p/p	82,3 % p/p	82,3 % p/p ± 0,0
B	72,8 % p/p	70,0 % p/p	73,2 % p/p	72,0 % p/p ± 1,7
P	75,2 % p/p	84,4 % p/p	76,6 % p/p	78,7 % p/p ± 5,0

Según los requisitos de calidad exigidos por la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el contenido mínimo de resinas para los propóleos es de un 35% p/p y todas las muestras analizadas están por sobre ese valor, cumpliendo satisfactoriamente con este requisito.

Es importante saber que cuanto mayor sea el valor de esta fracción, mejor será el propóleo en términos de rendimiento farmacológico y mejor será la calidad del producto final, puesto que es allí donde se encuentran los compuestos con actividad biológica, tal como se mencionó anteriormente (Palomino *et al.*, 2010).

En este parámetro notamos que existe una mayor variabilidad de los resultados, donde los valores más altos son para los propóleos de Curacaví y Pirque, que de acuerdo a lo mencionado anteriormente, serían las muestras con mejor rendimiento.

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos en un estudio argentino (40,1% – 61,2%) (Tosi *et al.*, 2006) y uno colombiano (14,08%) (Palomino *et al.*, 2010), realizados de la misma forma, podemos apreciar que nuestros valores son considerablemente más elevados que el de los otros propóleos.

6. Determinación del porcentaje de impurezas mecánicas

Los resultados de la determinación de impurezas mecánicas para los propóleos de CM, CA, CV, B y P, se expresan en la tabla 6.

Tabla 6: Impurezas mecánicas de los propóleos

Propóleo	IM ₁	IM ₂	IM ₃	IM
CM	9,0 % p/p	9,4 % p/p	8,4 % p/p	8,9 % p/p ± 0,5
CA	14,7 % p/p	14,6 % p/p	14,7 % p/p	14,7 % p/p ± 0,1
CV	4,6 % p/p	4,6 % p/p	4,6 % p/p	4,6 % p/p ± 0,0
B	14,3 % p/p	15,2 % p/p	13,9 % p/p	14,5 % p/p ± 0,7
P	2,8 % p/p	2,5 % p/p	3,1 % p/p	2,8 % p/p ± 0,3

Según los requisitos de calidad exigidos por la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el contenido máximo de impurezas mecánicas permitido es de 25 %. De acuerdo a esto, todas las muestras cumplen con esta exigencia.

Al igual que las ceras, las impurezas mecánicas no contienen principios activos y su elevada presencia disminuyen la potencial eficacia terapéutica del propóleo (Palomino *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha relacionado este parámetro con el método de extracción por raspaje de los bastidores y otras partes de la colmena, donde las muestras de propóleo recolectadas se podrían contaminar con impurezas (Casanova, 2009).

Los resultados más bajos son para los propóleos de Curacaví y Pirque, mientras que el resultado más alto es para el de Caleu, pero a pesar de eso no sobrepasa lo exigido como máximo según la norma utilizada.

Finalmente, podemos concluir que los resultados obtenidos en este ensayo, muestran que los propóleos chilenos analizados presentan menos impurezas mecánicas que los propóleos argentinos (20,0% - 21,8%) (Tosi *et al.*, 2006) y un porcentaje similar a un propóleo de Colombia (10,47%) (Palomino *et al.*, 2010).

7. Determinación de flavonoides mediante la reacción colorimétrica con tricloruro de aluminio

En la figura 17 se presenta la curva de calibración de quercetina, en la cual se interpolan las absorbancias obtenidas en el ensayo, de las distintas muestras de propóleos, con el fin de obtener la concentración de flavonoides expresados como equivalentes de quercetina.

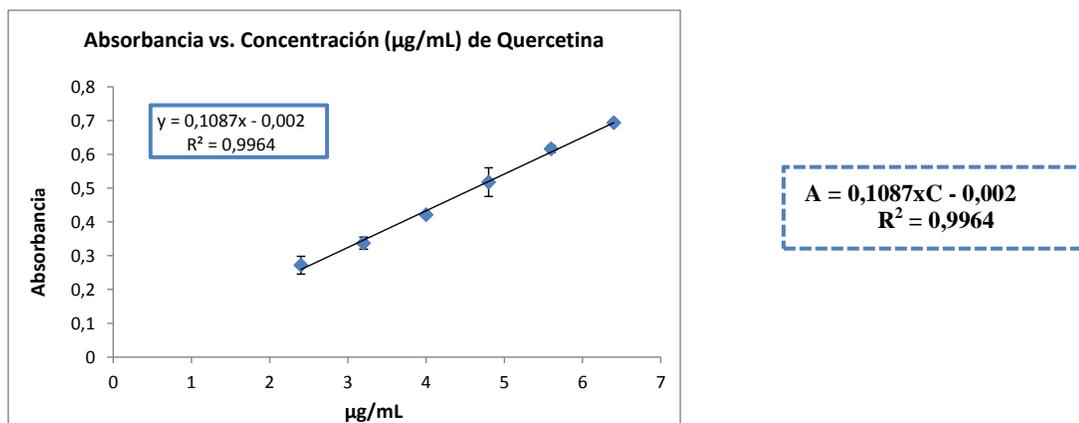


Figura 17: Curva calibración de quercetina

Los resultados de las concentraciones de flavonoides expresadas como equivalentes de quercetina, para los distintos propóleos, se detallan en la tabla 7.

Tabla 7: Concentraciones de flavonoides de los propóleos

	Cajón del Maipo	Caleu	Curacaví	Buín	Pirque
C ₁ (g/100g)	0,46	0,37	0,89	3,65	0,76
C ₂ (g/100g)	0,54	0,30	0,85	4,08	0,93
C ₃ (g/100g)	0,51	0,28	0,93	3,51	0,85
Concentraciones equivalentes de quercetina	0,50 % ± 0,04	0,32 % ± 0,05	0,89 % ± 0,04	3,75 % ± 0,30	0,85 % ± 0,09

Según los requisitos de calidad exigidos, de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), la mínima cantidad de flavonoides presentes en las muestras debe ser un 1% y

observamos que la mayoría de los propóleos evaluados están por debajo de lo requerido, a excepción de Buin, que alcanza un valor mucho más elevado.

Se puede considerar que los flavonoides están conformados por una estructura básica derivada de la fenilcromona, que consiste en 2 anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de 3 átomos de carbono, la cual puede contener varias moléculas de OH como sustituyentes (figura 18). Gracias a su estructura es que se le atribuyen sus distintas propiedades, principalmente el efecto antioxidante (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

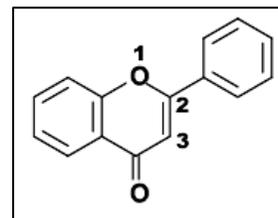


Figura 18: Estructura base de los flavonoides

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por propóleos colombianos (0,52% - 3,25%), notamos que los valores de ambos trabajos son muy similares (Salamanca *et al.*, 2007), al igual que los obtenidos por los propóleos de Brasil (0,77% - 2,69%) (Woisky & Salatino, 1998). Mientras que resultados de propóleos de Argentina son bastante superiores a todos los anteriores (3,61% - 12,28%) (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

Debemos resaltar que según la metodología establecida por la norma argentina, sólo se pueden determinar flavonas y flavonoles, ya que éstos desde el punto de vista reactivo, pueden formar complejos estables con el tricloruro de aluminio y así ser susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta-visible; pero no así las flavanonas, las cuales se deben determinar por otro método (2-4 dinitrofenilhidrazina) (Salamanca *et al.*, 2007).

También es importante destacar que al analizar los resultados de numerosos estudios, los propóleos en general, describen grandes diferencias con respecto a la cantidad de flavonoides presentes y esto se atribuye en parte, a que las muestras son de distintas zonas geográficas (distinta vegetación circundante a la colmena), lo que sustenta la necesidad de estandarizar los diferentes tipos de propóleos (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

8. Determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método de microfolin

En la figura 19 se ilustra la curva de calibración de ácido gálico, en la cual se interpolan las absorbancias obtenidas en el ensayo, con el fin de obtener la concentración de compuestos fenólicos totales, expresados como equivalentes de ácido gálico.

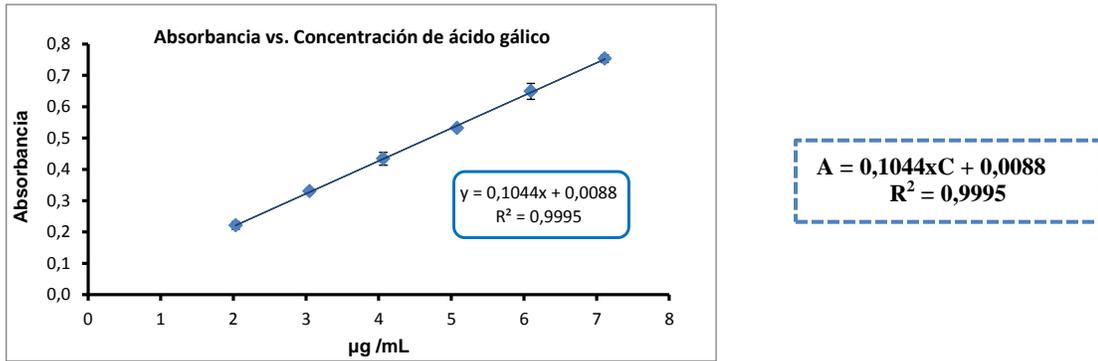


Figura 19: Curva calibración de ácido gálico

Los resultados de las concentraciones de compuestos fenólicos totales, expresadas como equivalentes de ácido gálico para los distintos propóleos se detallan en la tabla 8.

Tabla 8: Concentraciones de compuestos fenólicos totales

	Cajón del Maipo	Caleu	Curacaví	Buin	Pirque
C ₁ (g/100g)	14,45	14,64	22,24	20,15	19,10
C ₂ (g/100g)	14,50	14,79	23,23	23,54	19,18
C ₃ (g/100g)	16,80	12,82	24,49	21,73	21,41
Concentraciones equivalentes de ácido gálico	15,25 % ± 1,34	14,08 % ± 1,10	23,32 % ± 1,13	21,80 % ± 1,70	19,90% ± 1,31

Según la norma Argentina IRAM-INTA 15935-1 (2008), el contenido mínimo de compuestos fenólicos que deben contener las muestras es de 5 %, según esto podemos observar que todas las muestras superan con mucha diferencia esta exigencia, donde el valor más bajo es de un 14,1 % para el propóleo de Caleu y el más alto es de un 23,3 %, para el de Curacaví, no

existiendo grandes diferencias entre todas las muestras. Cabe destacar que nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por propóleos argentinos (13,7 - 21,3 %) (Bedascarrasbure *et al.*, 2004) y un poco superiores a los de Brasil (8,8 - 13,7 %) (Woisky & Salatino, 1998).

Dentro de los compuestos fenólicos más estudiados presentes comúnmente en el propóleo se encuentra el feniletil éster del ácido cafeico (CAPE), a este compuesto se le han atribuido diversas propiedades farmacológicas, destacándose: el efecto antiinflamatorio, al inhibir la actividad de la COX de manera dosis dependiente (Rossi *et al.*, 2002); el efecto antitumoral al fomentar la apoptosis celular, detener el ciclo celular y reducir la angiogénesis (Jing Wu *et al.*, 2011); y el efecto hipoglicemiante, al aumentar la recaptación de la glucosa, e incrementar la sensibilidad de las células por la insulina (Soo Lee *et al.*, 2007).

9. Determinación del porcentaje de cenizas en las muestras de propóleo en bruto

Los resultados obtenidos en la determinación de cenizas, para los propóleos de CM, CA, CV, B y P, se detallan a continuación, en la tabla 9.

Tabla 9: Porcentajes de cenizas de los propóleos

Propóleo	C ₁	C ₂	C ₃	C
CM	1,5 % p/p	1,5 % p/p	1,5 % p/p	1,5 % p/p ± 0,0
CA	1,8 % p/p	1,9 % p/p	1,8 % p/p	1,8 % p/p ± 0,1
CV	1,3 % p/p	1,4 % p/p	1,6 % p/p	1,4 % p/p ± 0,2
B	3,2 % p/p	3,2 % p/p	3,2 % p/p	3,2 % p/p ± 0,0
P	1,08 % p/p	1,09 % p/p	1,05 % p/p	1,07 % p/p ± 0,02

Según los requisitos de calidad exigidos, de acuerdo con la norma IRAM-INTA 15935-1 (2008), el contenido máximo de cenizas permitido es de 5 %. Al observar los resultados obtenidos, vemos que todas las muestras de propóleos analizadas cumplen con este requisito.

También podemos observar que los resultados son bastante parecidos, exceptuando a Buin que es el que presenta la mayor cantidad de cenizas.

Las cenizas son el residuo inorgánico del propóleo y su medición sirve para determinar, en parte, si las muestras de propóleo han sido adulteradas con algún material como es la arcilla, ya que, el porcentaje de cenizas se dispara a valores muy superiores (Woisky & Salatino, 1998).

Finalmente, si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por propóleos de Argentina (1,8% - 2,4%) (Tosi *et al.*, 2006) y propóleos de Brasil (1,6% - 2,2%) (Días *et al.*, 2012), podemos observar que los resultados son bastante similares entre ellos, a excepción del propóleo de Buin que obtuvo un valor levemente superior al resto.

iii. Determinación de los perfiles cromatográficos de los diferentes extractos de propóleos, por cromatografía en capa fina (c.c.f.)

En las Figuras 20, 21 y 22, podemos observar los cromatogramas de los distintos extractos de los propóleos en estudio, al ser revelados con distintos reactivos. Cada extracto presentó un perfil cromatográfico diferente lo que se evidenció en el número, color e intensidad de las manchas y las polaridades de los compuestos presentes (en la sílica gel los compuestos polares quedan retenidos en la fase estacionaria, por lo tanto sus Rf o factor de retención son menores).

1. c.c.f. reveladas con el reactivo Liebermann-Burchard y observadas al visible

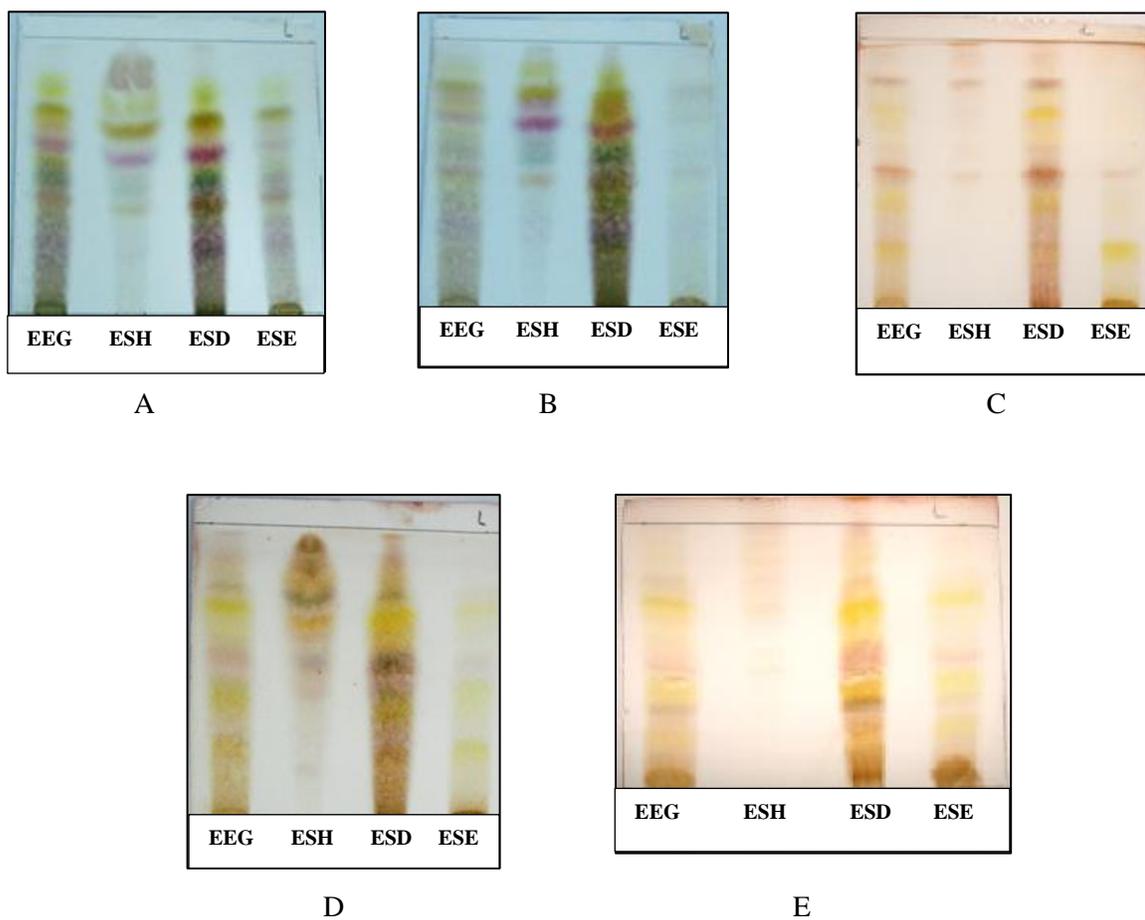


Figura 20: c.c.f. reveladas con el reactivo Liebermann-Burchard y observadas al visible, A. Propóleo Caleu; B. Propóleo Cajón del Maipo; C. Propóleo Curacaví; D. Propóleo Buin; E. Propóleo Pirque

EEG: Extracto etanólico global, ESH: Ext. Seriado de hexano, ESD: Ext. Seriado de diclorometano, ESE: Ext. Seriado de etanol

Algunos compuestos como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y esteroides se colorean de café oscuro y gris claro con este revelador (Wagner & Bladt, 1996). En las c.c.f. realizadas los colores más observados son café, rojos y amarillos, pudiendo existir compuestos que son parte de alguna de las familias mencionadas.

En la figura 20, los perfiles cromatográficos con mayores similitudes se observan entre los cromatogramas de los propóleos de Caleu (A) y Cajón del Maipo (B), ya sea al comparar los EEG o los extractos seriados. Por el contrario, los perfiles cromatográficos del resto de los propóleos: propóleo de Curacaví (C), propóleo de Buin (D) y propóleo de Pirque (E), son muy diferentes, tanto para los EEG, como para los extractos seriados.

2. c.c.f. reveladas con el reactivo Natural products y observadas a la luz UV-365 nm

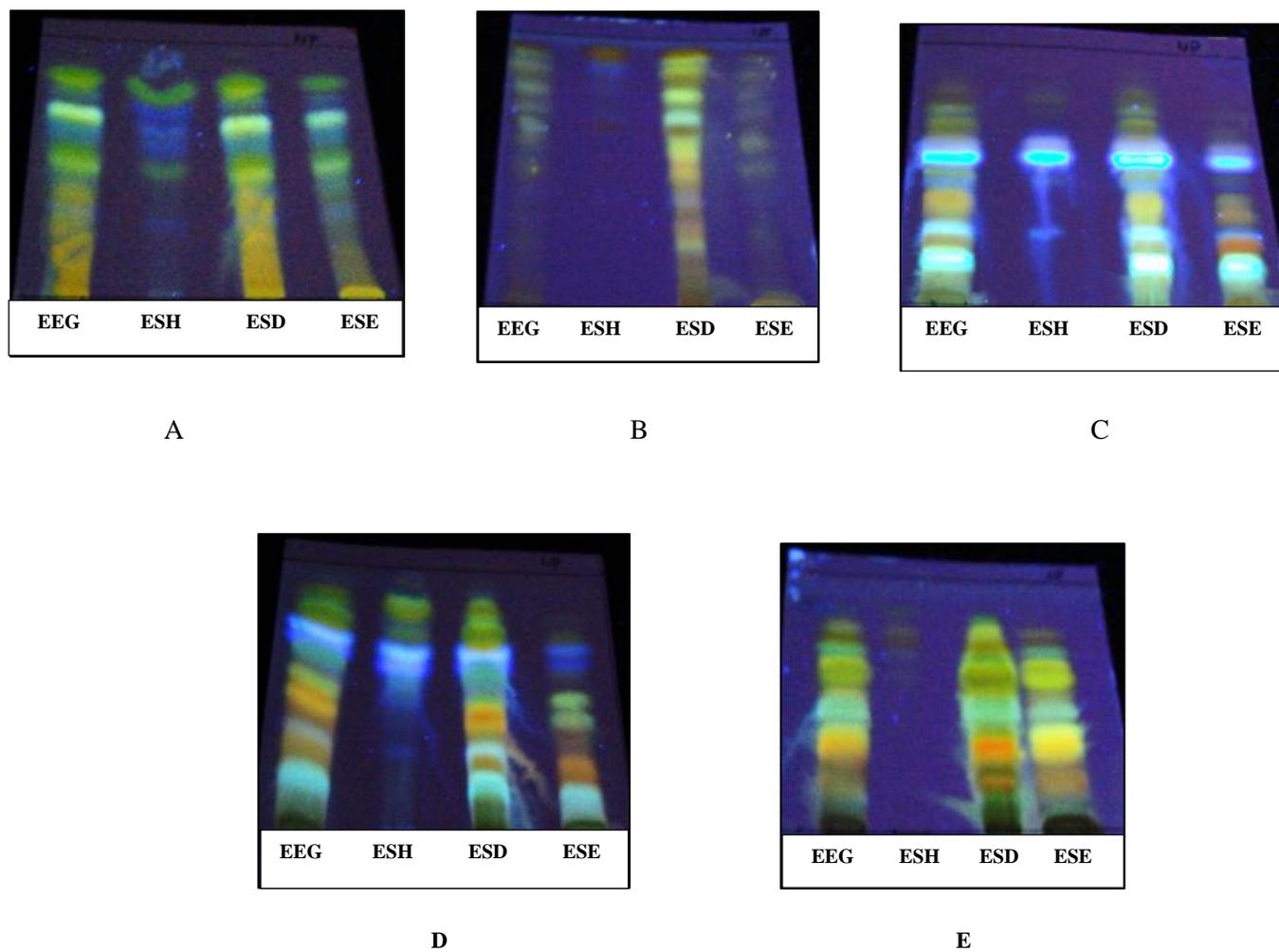


Figura 21: c.c.f. reveladas con el reactivo NP y observadas a la luz UV-365 nm, A. Propóleo Caleu; B. Propóleo Cajón del Maipo; C. Propóleo Curacaví; D. Propóleo Buin; E. Propóleo Pirque

EEG: Extracto etanólico global, **ESH:** Ext. Seriado de hexano, **ESD:** Ext. Seriado de diclorometano, **ESE:** Ext. Seriado de etanol

En las CCF realizadas, encontramos marcadas fluorescencias verdes, azules y anaranjadas. Según la literatura (Wagner & Bladt, 1996), los siguientes compuestos presentan fluorescencias al UV- 365 tras la revelación con NP, pudiendo estar presentes en los extractos evaluados:

Antronas y antranoles	:	Amarillos fluorescentes intensos
Glicósidos flavónicos	:	Naranja, verde y azules
Cumarinas y ácido fenol carboxílico	:	Azules intensos, azules verdosos
Ácidos fenólicos (ácido cafeico)	:	Azules
Flavonoles (quercetina, miricetina, camferol)	:	Amarillo anaranjado, amarillo verdoso
Flavonas (apigenina, luteolina)	:	Naranja, amarillo verdoso

En los cromatogramas de la figura 21, existe cierta similitud de los perfiles cromatográficos entre los EEG y los extractos seriados del propóleo de Curacaví (C) y el de Buin (D), por el contrario, hay grandes diferencias en los perfiles cromatográficos del resto de los propóleos: propóleo de Caleu (A), propóleo de Cajón del Maipo (B) y propóleos de Pirque (E), tanto para los EEG, como para los extractos seriados.

3. c.c.f. reveladas con el reactivo p-anisaldehído sulfúrico y observadas al visible

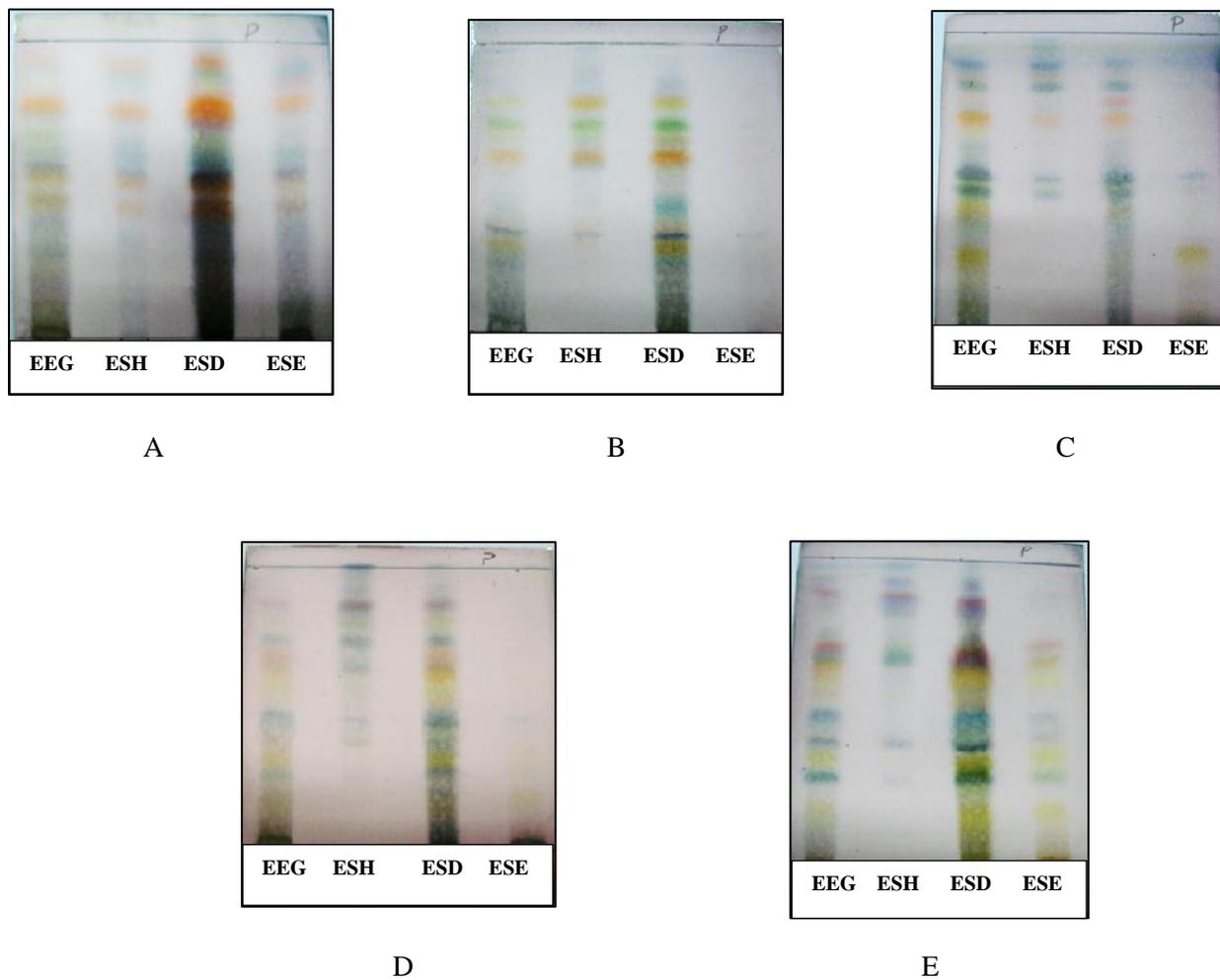


Figura 22: c.c.f. reveladas con el reactivo p-anisaldehído sulfúrico y observadas al visible, A. Propóleo Caleu; B. Propóleo Cajón del Maipo; C. Propóleo Curacaví; D. Propóleo Buin; E. Propóleo Pirque

EEG: Extracto etanólico global, ESH: Ext. Seriado de hexano, ESD: Ext. Seriado de diclorometano, ESE: Ext. Seriado de etanol

En los cromatogramas se destacan principalmente las coloraciones amarillas, naranjas, verdes y azules.

Según la literatura (Wagner & Bladt, 1996) los siguientes compuestos presentan coloraciones tras la revelación con ρ -anisaldehído sulfúrico, pudiendo estar presentes en los extractos evaluados:

Terpenos	:	Rojos violetas, café rojizo, azul verdoso, azul y grises
Aceites esenciales	:	Azul intenso, verde, rojos y café.
Saponinas	:	Azules, azules violetas, rojas, amarillos cafésos.
Triterpenos	:	Azul violeta, rojo violeta

En las cromatografías de la figura 22, se observa con mayor claridad las diferencias de los perfiles cromatográficos de los EEG y los distintos extractos seriados, de los diferentes propóleos, en comparación con los cromatogramas revelados con los reveladores Liebermann-Burchard y NP.

A continuación, en la tabla 10, se identifican las familias de compuestos que posiblemente están presentes en los propóleos evaluados, tras la observación de los distintos cromatogramas obtenidos por c.c.f.

Tabla 10: Posible perfil químico de los propóleos según c.c.f.

Familia de compuestos vs. reveladores usados	Propóleo Caleu	Propóleo Cajón del Maipo	Propóleo Curacaví	Propóleo Buin	Propóleo Pirque
Terpenos con LB (café) y PS (rojo violeta)	+	+	+	++	++
Glicósidos flavónicos con NP (naranja, verde y azul)	++	+	+	++	++
Flavonoles con NP (amarillo anaranjado)	+				++
Flavonas con NP (naranja)				+	+
Ácidos fenólicos con NP (azules)			+++	++	
Cumarinas con NP (azul intenso)			+++	++	
Aceites esenciales con PS (azul intenso)		+	+	+	++

LB: reactivo Liebermann-Burchard; NP: reactivo Natural products; PS: reactivo p-anisaldehído sulfúrico

A modo general, las diferencias en los perfiles cromatográficos demuestran la diversidad en la composición química de cada uno de los propóleos, lo que puede ser explicado en gran parte, por las distintas vegetaciones circundantes a la colmena. Es importante mencionar que a pesar de que los propóleos analizados corresponden a un área geográfica relativamente pequeña, la composición química de los propóleos es diversa. Este hecho refleja la diversidad florística presente en las zonas de donde se recolectaron los propóleos.

iv. Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica *in vivo*

En la tabla 11 se detallan los resultados del efecto antiinflamatorio (EAI) de los EEG de los distintos propóleos y se comparan con los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de actividad antioxidante ORAC (Oxygen radical absorbance capacity), el cual se realizó en el marco de una tesis de doctorado en el mismo laboratorio (Actividad antioxidante, compuestos fenólicos y calidad de propóleos de la región metropolitana de Chile). Además se pretende relacionar ambos efectos terapéuticos con las concentraciones de flavonoides y compuestos fenólicos totales, obtenidas por las muestras.

Tabla 11: Actividad antiinflamatoria de los EEG vs. el contenido de flavonoides, fenoles totales y actividad antioxidante

Dosis oreja	Medio de dilución	AA	TPA	Conc. Flav. % p/p ± d.s.	Conc. Fenol. % p/p ± d.s.	Índice ORAC
		% EAI ± SEM	% EAI ± SEM			
EEG Curacaví 3mg/oreja	Etanol	57,8 ± 3,9 *	62,6 ± 3,7 *	0,89 ± 0,04	46,63 ± 2,26	2,7 ± 0,1
EEG Cajón Maipo 3mg/oreja	Etanol	21,5 ± 11,1*	51,2 ± 4,3 *	0,50 ± 0,04	30,50 ± 2,69	2,4 ± 0,1
EEG Buin 3mg/oreja	Etanol	58,7 ± 6,5 *	54,5 ± 4,5 *	3,75 ± 0,30	43,61 ± 3,40	3,3 ± 0,1
EEG Caleu 3mg/oreja	Etanol	8,1 ± 7,9	49,5 ± 3,2 *	0,32 ± 0,05	28,16 ± 2,20	3,5 ± 0,1
EEG Pirque 3mg/oreja	Etanol	33,2 ± 8,7 *	53,1 ± 5,8 *	0,85 ± 0,09	39,79 ± 2,62	2,9 ± 0,1
Nimesulida 1mg/oreja	Acetona	↑ 48,8 ± 4,0*				
Indometacina 0,5 mg/oreja	Acetona		↑ 92,9 ± 3,2*			

↑ : Máximo efecto; * Resultado significativo con un $p \leq 0,05$; AA: Ácido Araquidónico; TPA: 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol; EAI: Efecto antiinflamatorio; SEM: Error estándar de la media; % p/p: Porcentaje peso/peso; d.s.: Desviación estándar; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity; EEG: Ext. etanólico global.

Si observamos los resultados nos damos cuenta que todos los EEGs de los propóleos estudiados presentaron actividad antiinflamatoria significativa al utilizar TPA como agente inflamatorio, donde el resultado mayor fue para el propóleo de Curacaví ($62,6 \% \pm 3,7$), el menor fue para el propóleo de Caleu ($49,5 \% \pm 3,2$) y ninguno superó el efecto alcanzado por el fármaco de referencia indometacina. En cambio, para la inflamación causada por AA, cuatro de los cinco propóleos mostraron actividad antiinflamatoria significativa, donde el valor más alto fue para el propóleo de Buin ($58,7 \% \pm 6,5$) y lo sigue de forma muy cercana el propóleo de Curacaví ($57,8 \% \pm 3,9$); ambos mostraron un efecto muy superior al fármaco de referencia nimesulida.

De acuerdo a lo anterior podemos concluir que los EEGs de todos los propóleos presentaron actividad antiinflamatoria tópica *in vivo*, ya sea por la vía del TPA o por la vía del AA o por ambas. La utilización de dos agentes inflamatorios distintos fue muy relevante, ya que nos permitió dilucidar el posible mecanismo de acción de las muestras. Así, para aquellos extractos que presentaron actividad frente al AA podemos suponer que actuaron a nivel tanto de las COXs como de las LOXs, reduciendo principalmente la concentración de PGs, TXs y LTs. Además, como se sabe que la formación del edema es menor que con TPA y de corta duración, podemos suponer que este mecanismo es a través de las enzimas que se expresan constitutivamente en el organismo, como son la COX-1 (formadora de PGs), la LOX-5 (formadora de LTs) y la LOX-15 (formadora de lipoxinas). En cambio, el edema formado por el TPA es mayor, de duración más prolongada, y se observa un aumento considerable del TNF- α , esto nos permitiría suponer que el mecanismo es a través de las enzimas inducibles del proceso inflamatorio como son COX-2 y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). (Gómez *et al.*, 2011; Inoue *et al.*, 1989).

También podemos observar que las muestras que presentaron mayor efecto antiinflamatorio, ya sea vía AA o TPA, son los EEGs de los propóleos de Buin y Curacaví, siendo éstos los que presentaron mayor concentración de compuestos fenólicos (43,61% y 46,63%; respectivamente) y además, el propóleo de Buin fue el único que presentó un mayor contenido de flavonoides (3,75 %). Esto es un resultado esperado, ya que como se dijo anteriormente, estos compuestos son parte importante de las sustancias bioactivas del propóleo.

Se sabe que los flavonoides poseen una gran variedad de propiedades farmacológicas entre las que se destaca la actividad antiinflamatoria, donde se han reportado efectos sobre la actividad inhibitoria de TNF- α en macrófagos, de algunos compuestos como luteolina, quercetina y luteolina 7-glucósido (Gómez *et al.*, 2011). Además, se ha visto que la quercetina posee propiedades antioxidantes e inhibe el metabolismo del AA, evitando el incremento de PGE₂ y en menor medida el de LTB₄. (Fernández & Torres).

Compuestos fenólicos como el ácido cafeico, ácido cumárico y el ácido ferúlico, pueden reducir la formación de importantes mediadores de la inflamación como la COX-1 y COX-2, e inhibir a la LOX-5 y la formación de óxido nítrico (NO), observándose una reducción de los edemas inducidos por TPA (Fernández & Torres).

Uno de los componentes más estudiados del propóleo es el feniletil éster del ácido cafeico (CAPE), un potente inhibidor de la activación del factor nuclear kappa β (NF- κ B) (Shvarzbeyn & Huleihel, 2011). Estudios anteriores han reportados efectos antiinflamatorios de EEGs de propóleos, a través de la inhibición del gen de transcripción de la iNOS, producto de la inhibición del NF- κ B (Song *et al.*, 2002).

Por otro lado, se sabe que la actividad antioxidante está estrechamente relacionada con la actividad antiinflamatoria, ya que los radicales libres son ampliamente producidos cuando hay daño tisular, además de ser liberados al espacio extracelular por los leucocitos tras la exposición a agentes quimiotácticos, o por estimulación fagocitaria. También se ha comprobado que el incremento de las especies reactivas del oxígeno (EROs) está relacionado con la activación del FN- κ B, el cual es muy importante en la inflamación, ya que controla la transcripción de genes que codifican la expresión de IL-1, TNF- α , citoquinas, factores de crecimiento, y la expresión de COX-2, iNOS y de la FLA₂ (Fernández & Torres). De esta forma, uno de los EEG con mayor actividad antioxidante (mayor índice ORAC) fue el propóleo de Buin (3,3), el cual también demostró una gran actividad antiinflamatoria significativa frente a TPA y AA. Sin embargo, no siempre hubo una relación directa entre los resultados del ensayo ORAC y el EAI.

VI. CONCLUSIÓN

Los extractos seriados con mayor rendimiento fueron los ESD, mientras que los de menor rendimiento fueron los ESH.

Observando sólo las características organolépticas de los propóleos, ya es posible distinguir la influencia de la zona de recolección y por lo tanto, de la flora circundante, en la consistencia, aspecto, color, entre otros, de las muestras estudiadas.

Las diferencias en los perfiles cromatográficos demuestran la diversidad en la composición química de cada uno de los propóleos lo que puede ser explicado en gran parte por la flora circundante a la colmena.

Todos los propóleos evaluados, cumplen de forma muy prometedora la mayoría de los parámetros exigidos por la norma Argentina IRAM-INTA 15935-1 (2008).

Con respecto al EAI, se acepta la hipótesis planteada, ya que todos los propóleos evaluados obtuvieron efectos antiinflamatorios tópicos *in vivo* frente a TPA o frente a AA, de forma significativa.

El EAI de los EEGs de los propóleos fue directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos totales y en cierta medida, a la concentración de flavonoides.

La calidad de los propóleos chilenos es similar o incluso mejor que la de los propóleos colombianos, argentinos y brasileros. Esto es de gran importancia, ya que Argentina y Brasil son países cuya exportación de este producto apícola es elevada y reconocida internacionalmente.

Finalmente esta memoria contribuyó a demostrar las propiedades antiinflamatorias tópicas de propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile.

VII. REFERENCIAS

1. Referencias Bibliográficas

ALENCAR S., OLDONI T., CASTRO M., CABRAL I., COSTA-NETO C., CURY J., ROSALEN P., IKEGAKID M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. Journal of Ethnopharmacology 113: 278–283. Brasil, Junio 2007.

ASTUDILLO A., PÉREZ-CHACON G., BALBOA M., y BALSINDE J. Arachidonic acid mobilization by stimuli of the innate immune response. Inmunología Vol. 28 (4): 182-192. España, Diciembre 2009.

BEDASCARRASBURE E., MALDONADO L., ÁLVAREZ A. y RODRÍGUEZ E. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. Acta Farm. Bonaerense 23 (3): 369-72. Argentina, Abril 2004.

CASANOVA G. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Resultados y Lecciones en Desarrollo de Productos a Base de Propóleos. Proyecto de Innovación en la IX Región de La Araucanía. Fundación para la Innovación Agraria. [en línea]. Chile, 2009. González G. [consulta: 26 septiembre 2012]

CICCO N., LANORTE M., PARAGGIO M., VIGGIANO M., LATTANZIO V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal 91: 107–110. Italia, 2009.

CONE J. Inflammation. The American Journal of Surgery 182: 558–562. U.S.A. Septiembre 2011.

DIAS L., PEREIRA A., ESTEVINHO L. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. Food and Chemical Toxicology 50: 4246–4253. Brasil, 2012.

FERNÁNDEZ F. & TORRES M. Inflamación y Plantas medicinales. [en línea], [s.a]. [consulta: 13 agosto 2012]

FRANCO L., OSPINA L., MATIZ G., GAITAN R. Utilización del modelo de edema auricular inducido por TPA en la evaluación farmacológica de los cálices de *physalis peruviana l.* Scientia et Technica Año XIII, No 33: 0122-1701. Marzo 2007.

GARCÍA P. Inflamación. IX Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. Vol. 102, (1): 91-159. España, 2008.

- GÓMEZ H., GONZÁLEZ K. y MEDINA J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas vol. 10 (3): 182-217. Chile, Mayo 2011.
- HERRERA C., ALVEAR M., BARRIENTOS L., MONTENEGRO G., y SALAZAR L. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida spp.* Cien. Inv. Agr. 37(1):75-84. Chile, 2010.
- INOUE H., MORI T., SHIBATA S. y KOSHIHARA Y. Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. Br. J. Pharmacology. 96:204-210. Japón, 1989.
- KALOGEROPOULOS N., KONTELES S., TROULLIDOU E., MOURTZINOS I., KARATHANOS V. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food Chemistry 116: 452 – 461. Grecia, Febrero 2009.
- KOSALEC I., BAKMAZ M., PEPELJNJAK S. Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. Acta Pharm. 53: 275–285. Croacia, Octubre 2003.
- LEE E., UHM K., LEE Y., HAN M., LEE M., PARK J., SUH P., PARK S., KIM H. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 361: 854–858. Korea, Julio 2007.
- LLORET S. & MORENO J. Effect of an anti-inflammatory peptide (Antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoylphorbol dermal application. Biochemical Pharmacology, Vol. 50 (3): 347-353. España, Marzo, 1995.
- MEDZHITOV R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Leading Edge. [en línea]. [consulta: 8 Noviembre 2012]
- MOHAMMADZADEH S., SHARRIATPANAHI M., HAMEDI M., AMANZADEH Y, SADAT S., NASSER S. Antioxidant power of Iranian propolis extract. Food Chemistry 103: 729 – 733. Iran, 2007a.
- MOHAMMADZADEH S., SHARIATPANAHI M., HAMEDI M., AHMADKHANIHA R., SAMADI N., NASSER S. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. Food Chemistry 103: 1097–1103. 2007b.
- MURAKAWA M., YAMAOKA K., TANAKA Y., FUKUDA Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. Biochemical pharmacology 71: 1331– 1336. Japón 2006.

Norma Argentina, IRAM-INTA 15935-1 [en línea], primera edición 2008-06-20. Productos del Noroeste Argentino, Propóleos. Parte 1, Propóleos en bruto.

ORSOLIC N. & BASIC I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. Journal of Ethnopharmacology 102: 37–45. Croacia, Mayo 2005.

PACHECO A., DALEPRANE J., FREITAS V., FERDERBAR S., HIRABARA S., CUEVAS A., SAAVEDRA N., CURI R., ABDALLA D. y SALAZAR L. Efecto del Propóleos Chileno sobre el Metabolismo de Glucosa en Ratones Diabéticos. Int. J. Morphol., 29(3):754-761. Chile, 2011.

PALOMINO G., LADY R.; GARCÍA P., CARLOS M.; GIL G., JESÚS H.; ROJANO, BENJAMÍN A.; DURANGO R., DIEGO L. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Vitae, Vol. 16 (3): 388-395. Colombia, 2009.

PALOMINO R., MARTÍNEZ J., GARCÍA C., GIL J. y DURANGO D. Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de la Unión (Antioquia, Colombia). Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín vol. 63 (1): 5373-5383. Colombia 2010.

PEÑA R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Cien. Inv. Agr. 35(1): 17-26. Chile 2008.

PUIGNERO V., TURULL A., & QUERALT J. Arachidonic Acid (AA) and Tetradecanoylphorbol Acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. Inflammation, Vol. 22 (3). España, 1998.

ROSSI A., LONGOB R., RUSSOC A., BORRELLIA F., SAUTEBINA L. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. Fitoterapia 73 (1): 30–37. Italia, 2002.

RUSSOA A., CARDILEB V., SANCHEZC F., TRONCOSOC N., VANELLAA A., GARBARINO J. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. Life Sciences 76: 545–558. Julio, 2004.

SALAMANCA G., CORREA I. y PRINCIPAL J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. Zootecnia Trop., 25(2): 95-102. Colombia, Marzo 2007.

SHVARZBEYN J., HULEIHEL M. Effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on NF-KB activation by HTLV-1 Tax. Antiviral Research 90: 108–115, 2011.

SONG Y., PARK E., HUR G., RYU Y., KIM Y., JIN C. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. Journal of Ethnopharmacology 80: 155 - 161. U.S.A. Enero, 2002.

TOSI E., CIAPPINI M., CAZZOLLI, A., TAPIZ, L. Physicochemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). Apiacta 41: 110-120. Argentina 2006.

Wagner H. y Bladt S. PLANT DRUG ANALYSIS, A Thin Layer Chromatography Atlas. Segunda Edición. Springer, 1996.

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

WU J., OMENE C., KARKOSZKA J., BOSLAND M., ECKARD J., KLEIN C., FRENKEL K. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. Cancer Letters 308:43–53. U.S.A., 2011.

SILVER J., MORRISON I., REES L. A Mössbauer spectroscopic study of frozen solutions of FeCl₃-phenols. Inorganic and Nuclear Chemistry Letters Vol. 15: 433-436. 1979.

2. Anexos

Anexo 1: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por TPA: PROPÓLEO CALEU extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 27-04-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0155	0,0082	0,0073	65,4	89,0	1,0	0,0276	0,0101	0,0175	173,3	9,0
2	0,0182	0,0098	0,0084	60,2	85,7	2,0	0,0284	0,0102	0,0182	178,4	10,0
3	0,0161	0,0070	0,0091	56,9	130,0	3,0	0,0290	0,0104	0,0186	178,8	11,0
4	0,0180	0,0077	0,0103	51,2	133,8	4,0	0,0283	0,0092	0,0191	207,6	12,0
5	0,0190	0,0080	0,0110	47,9	137,5	5,5	0,0278	0,0079	0,0199	251,9	13,5
6	0,0198	0,0088	0,0110	47,9	125,0	5,5	0,0270	0,0071	0,0199	280,3	13,5
7	0,0184	0,0067	0,0117	44,5	174,6	7,0	0,0301	0,0098	0,0203	207,1	15,0
8	0,0203	0,0070	0,0133	37,0	190,0	8,0	0,0283	0,0075	0,0208	277,3	16,0
9							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
10							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
11							0,0300	0,0084	0,0216	257,1	19,0
12							0,0293	0,0073	0,0220	301,4	20,0
13							0,0299	0,0074	0,0225	304,1	21,0
14							0,0299	0,0070	0,0229	327,1	22,0
15							0,0318	0,0080	0,0238	297,5	23,0
16							0,0399	0,0102	0,0297	291,2	24,0
n	8	8	8	8			16	16	16		
promedio	0,0182	0,0079	0,0103	51,4			0,0300	0,0088	0,0212		
mediana	0,0183	0,0079	0,0107	49,5			0,0296	0,0088	0,0211		
Desv. Std	0,0017	0,0010	0,0019	9,1			0,0030	0,0013	0,0029		
Error Std	0,0006	0,0004	0,0007	3,2			0,0007	0,0003	0,0007		
W						36,0					

% E con promedio	51,6
% E CON MEDIANA	49,5
mediana de controles	0,0211
mediana de muestra	0,0107
% E FINAL CON MEDIAN	49,5

z =	-3,92
p =	4,44247E-05

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 2: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por TPA: PROPÓLEO CAJÓN MAIPO extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 14-06-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0146	0,0088	0,0058	72,5	65,9	1,0	0,0276	0,0101	0,0175	173,3	9,0
2	0,0170	0,0095	0,0075	64,5	78,9	2,0	0,0284	0,0102	0,0182	178,4	10,0
3	0,0188	0,0099	0,0089	57,8	89,9	3,0	0,0290	0,0104	0,0186	178,8	11,0
4	0,0201	0,0102	0,0099	53,1	97,1	4,0	0,0283	0,0092	0,0191	207,6	12,0
5	0,0206	0,0099	0,0107	49,3	108,1	5,0	0,0278	0,0079	0,0199	251,9	13,5
6	0,0206	0,0094	0,0112	46,9	119,1	6,5	0,0270	0,0071	0,0199	280,3	13,5
7	0,0221	0,0109	0,0112	46,9	102,8	6,5	0,0301	0,0098	0,0203	207,1	15,0
8	0,0240	0,0098	0,0142	32,7	144,9	8,0	0,0283	0,0075	0,0208	277,3	16,0
9							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
10							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
11							0,0300	0,0084	0,0216	257,1	19,0
12							0,0293	0,0073	0,0220	301,4	20,0
13							0,0299	0,0074	0,0225	304,1	21,0
14							0,0299	0,0070	0,0229	327,1	22,0
15							0,0318	0,0080	0,0238	297,5	23,0
16							0,0399	0,0102	0,0297	291,2	24,0

n	8	8	8	8		16	16	16
promedio	0,0197	0,0098	0,0099	53,0		0,0300	0,0088	0,0212
mediana	0,0204	0,0099	0,0103	51,2		0,0296	0,0088	0,0211
Desv. Std	0,0029	0,0006	0,0026	12,2		0,0030	0,0013	0,0029
Error Std	0,0010	0,0002	0,0009	4,3		0,0007	0,0003	0,0007

W **36,0**

% E con promedio	53,2
% E CON MEDIANA	51,2
mediana de controles	0,0211
mediana de muestra	0,0103
% E FINAL CON MEDIANA	51,2

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

z =	-3,92
p =	4,442E-05

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 3: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por TPA: PROPÓLEO CURACAVÍ extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 14-06-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0127	0,0094	0,0033	84,4	35,1	1,0	0,0276	0,0101	0,0175	173,3	9,0
2	0,0167	0,0099	0,0068	67,8	68,7	2,0	0,0284	0,0102	0,0182	178,4	10,0
3	0,0153	0,0080	0,0073	65,4	91,3	3,0	0,0290	0,0104	0,0186	178,8	11,0
4	0,0176	0,0098	0,0078	63,0	79,6	4,0	0,0283	0,0092	0,0191	207,6	12,0
5	0,0170	0,0090	0,0080	62,1	88,9	5,0	0,0278	0,0079	0,0199	251,9	13,5
6	0,0180	0,0083	0,0097	54,0	116,9	6,0	0,0270	0,0071	0,0199	280,3	13,5
7	0,0200	0,0102	0,0098	53,6	96,1	7,0	0,0301	0,0098	0,0203	207,1	15,0
8	0,0199	0,0099	0,0100	52,6	101,0	8,0	0,0283	0,0075	0,0208	277,3	16,0
9							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
10							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
11							0,0300	0,0084	0,0216	257,1	19,0
12							0,0293	0,0073	0,0220	301,4	20,0
13							0,0299	0,0074	0,0225	304,1	21,0
14							0,0299	0,0070	0,0229	327,1	22,0
15							0,0318	0,0080	0,0238	297,5	23,0
16							0,0399	0,0102	0,0297	291,2	24,0

n	8	8	8	8	16	16	16
promedio	0,0172	0,0093	0,0078	62,9	0,0300	0,0088	0,0212
mediana	0,0173	0,0096	0,0079	62,6	0,0296	0,0088	0,0211
Dev. Std	0,0024	0,0008	0,0022	10,4	0,0030	0,0013	0,0029
Error Std	0,0008	0,0003	0,0008	3,7	0,0007	0,0003	0,0007

W **36,0**

% E con promedio	63,1
% E CON MEDIANA	62,6
mediana de controles	0,0211
mediana de muestra	0,0079
% E FINAL CON MEDIAN	62,6

$$Z = w \cdot [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m \cdot n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

z =	-3,92
p =	4,4425E-05

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 4: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por TPA: PROPÓLEO DE BUIN

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 08-11-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0158	0,0100	0,0058	72,5	58,0	1,0	0,0276	0,0101	0,0175	173,3	9,0
2	0,0172	0,0110	0,0062	70,6	56,4	2,0	0,0284	0,0102	0,0182	178,4	10,0
3	0,0172	0,0095	0,0077	63,5	81,1	3,0	0,0290	0,0104	0,0186	178,8	11,0
4	0,0180	0,0090	0,0090	57,3	100,0	4,0	0,0283	0,0092	0,0191	207,6	12,0
5	0,0193	0,0091	0,0102	51,7	112,1	5,0	0,0278	0,0079	0,0199	251,9	13,5
6	0,0203	0,0090	0,0113	46,4	125,6	6,0	0,0270	0,0071	0,0199	280,3	13,5
7	0,0220	0,0095	0,0125	40,8	131,6	7,0	0,0301	0,0098	0,0203	207,1	15,0
8	0,0220	0,0094	0,0126	40,3	134,0	8,0	0,0283	0,0075	0,0208	277,3	16,0
9							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
10							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
11							0,0300	0,0084	0,0216	257,1	19,0
12							0,0293	0,0073	0,0220	301,4	20,0
13							0,0299	0,0074	0,0225	304,1	21,0
14							0,0299	0,0070	0,0229	327,1	22,0
15							0,0318	0,0080	0,0238	297,5	23,0
16							0,0399	0,0102	0,0297	291,2	24,0
n	8	8	8	8			16	16	16		
promedio	0,0190	0,0096	0,0094	55,4			0,0300	0,0088	0,0212		
mediana	0,0187	0,0095	0,0096	54,5			0,0296	0,0088	0,0211		
Desv. Std	0,0023	0,0007	0,0027	12,7			0,0030	0,0013	0,0029		
Error Std	0,0008	0,0002	0,0009	4,5			0,0007	0,0003	0,0007		
W						36,0					

% E con promedio	55,7
% E CON MEDIANA	54,5
mediana de controles	0,0211
mediana de muestra	0,0096
% E FINAL CON MEDIAN	54,5

z =	-3,92
p =	4,44247E-05

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 5: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por TPA: PROPÓLEO PIRQUE extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 14-06-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0147	0,0108	0,0039	81,5	36,1	1,0	0,0276	0,0101	0,0175	173,3	9,0
2	0,0178	0,0100	0,0078	63,0	78,0	2,0	0,0284	0,0102	0,0182	178,4	10,0
3	0,0203	0,0122	0,0081	61,6	66,4	3,0	0,0290	0,0104	0,0186	178,8	11,0
4	0,0209	0,0113	0,0096	54,5	85,0	4,0	0,0283	0,0092	0,0191	207,6	12,0
5	0,0194	0,0092	0,0102	51,7	110,9	5,0	0,0278	0,0079	0,0199	251,9	13,5
6	0,0202	0,0099	0,0103	51,2	104,0	6,0	0,0270	0,0071	0,0199	280,3	13,5
7	0,0203	0,0095	0,0108	48,8	113,7	7,0	0,0301	0,0098	0,0203	207,1	15,0
8	0,0267	0,0106	0,0161	23,7	151,9	8,0	0,0283	0,0075	0,0208	277,3	16,0
9							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
10							0,0312	0,0098	0,0214	218,4	17,5
11							0,0300	0,0084	0,0216	257,1	19,0
12							0,0293	0,0073	0,0220	301,4	20,0
13							0,0299	0,0074	0,0225	304,1	21,0
14							0,0299	0,0070	0,0229	327,1	22,0
15							0,0318	0,0080	0,0238	297,5	23,0
16							0,0399	0,0102	0,0297	291,2	24,0

n	8	8	8	8	16	16	16
promedio	0,0200	0,0104	0,0096	54,5	0,0300	0,0088	0,0212
mediana	0,0203	0,0103	0,0099	53,1	0,0296	0,0088	0,0211
Dev. Std	0,0034	0,0010	0,0034	16,3	0,0030	0,0013	0,0029
Error Std	0,0012	0,0004	0,0012	5,8	0,0007	0,0003	0,0007

36,0

% E con promedio	54,8
% E CON MEDIANA	53,1
mediana de controles	0,0211
mediana de muestra	0,0099
% E FINAL CON MEDIANA	53,1

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

z =	-3,92
p =	4,44247E-05

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 6: Test de Kruskal-Wallis ANOVA para datos no paramétricos e independientes

Comparación de los EAI de los EEG de los distintos propóleos utilizados en ensayo de TPA

	N	Min	Q1	Median % EAI	Q3	Max
TPA EEG CA	8	36,96682	45,37915	49,52607	59,36019	65,40284
TPA EEG CM	8	32,70142	46,91943	51,18483	62,79621	72,51185
TPA EEG CV	8	52,60664	53,67299	62,55924	67,18009	84,36019
TPA EEG B	8	40,28436	42,18009	54,50237	68,83886	72,51185
TPA EEG P	8	23,69668	49,40758	53,08057	62,67773	81,51659

	N	Mean Rank	Sum Rank
TPA EEG CA	8	15,875	127
TPA EEG CM	8	18,1875	145,5
TPA EEG CV	8	28,125	225
TPA EEG B	8	20,125	161
TPA EEG P	8	20,1875	161,5

Chi-Square	DF	Prob>Chi-Square
4,98528	4	0,28881

Hipótesis nula: Todas las muestras poseen EAI iguales

Hipótesis Alternativa: Las muestras poseen EAI distintos

A un nivel de 0.05 NO hay motivos para rechazar la hipótesis nula

NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EAI DE LOS DISTINTOS PROPÓLEOS

Anexo 7: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por AA: PROPÓLEO CALEU extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 27-04-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0188	0,0133	0,0055	50,7	41,4	1,0	0,0168	0,0076	0,0092	121,1	4,0
2	0,0163	0,0105	0,0058	48,0	55,2	2,0	0,0230	0,0088	0,0093	161,4	5,0
3	0,0169	0,0081	0,0088	21,1	108,6	3,0	0,0182	0,0083	0,0099	119,3	6,0
4	0,0196	0,0096	0,0100	10,3	104,2	8,0	0,0187	0,0087	0,01	114,9	8,0
5	0,0212	0,0107	0,0105	5,8	98,1	10,5	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	8,0
6	0,0203	0,0089	0,0114	-2,2	128,1	15,0	0,0184	0,0079	0,0105	132,9	10,5
7	0,0214	0,0099	0,0115	-3,1	116,2	16,0	0,0186	0,0075	0,0111	148,0	12,5
8	0,0207	0,009	0,0117	-4,9	130,0	18,0	0,0206	0,0095	0,0111	116,8	12,5
9							0,0197	0,0085	0,0112	131,8	14,0
10							0,0189	0,0073	0,0116	158,9	17,0
11							0,0220	0,0100	0,0120	120,0	19,0
12							0,0220	0,0090	0,0130	144,4	20,0
13							0,0212	0,0080	0,0132	165,0	21,0
14							0,0230	0,0091	0,0139	152,7	23,0
15							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0
16							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0

n	8	8	8	8	16	16	16
promedio	0,0194	0,0100	0,0094	15,7	0,0202	0,0084	0,0115
mediana	0,0200	0,0098	0,0103	8,1	0,0202	0,0084	0,0112
Dev. Std	0,0019	0,0016	0,0025	22,4	0,0019	0,0008	0,0017
Error Std	0,0007	0,0006	0,0009	7,9	0,0005	0,0002	0,0004

73,5

% E con promedio	18,2
% E CON MEDIANA	8,1
mediana de controles	0,0112
mediana de muestra	0,0103
% E FINAL CON MEDIANA	8,1

$$Z = \frac{w - [n(m+n+1)/2]}{\text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]}$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 NO hay motivos para rechazar hipótesis nula

z =	-1,62
p =	0,052317

NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 8: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por AA: PROPÓLEO CAJÓN DEL MAIPO extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 31-05-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0136	0,0085	0,0051	54,3	60,0	1,0	0,0168	0,0076	0,0092	121,1	6,0
2	0,0188	0,0111	0,0077	30,9	69,4	2,0	0,0230	0,0088	0,0093	161,4	7,0
3	0,019	0,0111	0,0079	29,1	71,2	3,0	0,0182	0,0083	0,0099	119,3	8,0
4	0,0174	0,0088	0,0086	22,9	97,7	4,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	10,0
5	0,0175	0,0086	0,0089	20,2	103,5	5,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	10,0
6	0,019	0,009	0,0100	10,3	111,1	10,0	0,0184	0,0079	0,0105	132,9	12,0
7	0,0238	0,0089	0,0149	-33,6	167,4	23,0	0,0186	0,0075	0,0111	148,0	13,5
8	0,0243	0,0093	0,0150	-34,5	161,3	24,0	0,0206	0,0095	0,0111	116,8	13,5
9							0,0197	0,0085	0,0112	131,8	15,0
10							0,0189	0,0073	0,0116	158,9	16,0
11							0,0220	0,0100	0,0120	120,0	17,0
12							0,0220	0,0090	0,0130	144,4	18,0
13							0,0212	0,0080	0,0132	165,0	19,0
14							0,0230	0,0091	0,0139	152,7	21,0
15							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	21,0
16							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	21,0

n	8	8	8	8	16	16	16
promedio	0,0192	0,0094	0,0098	12,4	0,0202	0,0084	0,0115
mediana	0,0189	0,0090	0,0088	21,5	0,0202	0,0084	0,0112
Desv. Std	0,0035	0,0011	0,0035	31,3	0,0019	0,0008	0,0017
Error Std	0,0012	0,0004	0,0012	11,1	0,0005	0,0002	0,0004

72,0

% E con promedio	15,0
% E CON MEDIANA	21,5
mediana de controles	0,0112
mediana de muestra	0,0088
% E FINAL CON MEDIANA	21,5

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

z =	-1,71
p =	0,043205

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 9: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por AA: PROPÓLEO CURACAVÍ extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 31-05-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,013	0,009	0,0040	64,1	44,4	1,0	0,0168	0,0076	0,0092	121,1	9,0
2	0,0143	0,0102	0,0041	63,2	40,2	2,0	0,0230	0,0088	0,0093	161,4	10,0
3	0,0157	0,0112	0,0045	59,6	40,2	3,0	0,0182	0,0083	0,0099	119,3	11,0
4	0,0139	0,0093	0,0046	58,7	49,5	4,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	12,5
5	0,0145	0,0097	0,0048	57,0	49,5	5,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	12,5
6	0,0135	0,0086	0,0049	56,1	57,0	6,0	0,0184	0,0079	0,0105	132,9	14,0
7	0,0167	0,0097	0,0070	37,2	72,2	7,0	0,0186	0,0075	0,0111	148,0	15,5
8	0,0162	0,0091	0,0071	36,3	78,0	8,0	0,0206	0,0095	0,0111	116,8	15,5
9							0,0197	0,0085	0,0112	131,8	17,0
10							0,0189	0,0073	0,0116	158,9	18,0
11							0,0220	0,0100	0,0120	120,0	19,0
12							0,0220	0,0090	0,0130	144,4	20,0
13							0,0212	0,0080	0,0132	165,0	21,0
14							0,0230	0,0091	0,0139	152,7	23,0
15							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0
16							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0

n	8	8	8	8		16	16	16
promedio	0,0147	0,0096	0,0051	54,0		0,0202	0,0084	0,0115
mediana	0,0144	0,0095	0,0047	57,8	36,0	0,0202	0,0084	0,0112
Desv. Std	0,0013	0,0008	0,0012	11,0		0,0019	0,0008	0,0017
Error Std	0,0005	0,0003	0,0004	3,9		0,0005	0,0002	0,0004
W								

% E con promedio	55,4
% E CON MEDIANA	57,8
mediana de controles	0,0112
mediana de muestra	0,0047
% E FINAL CON MEDIANA	57,8

z =	-3,92
p =	4,442E-05

$$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 10: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por AA: PROPÓLEO BUIN extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 31-05-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0112	0,0094	0,0018	83,9	19,1	1,0	0,0168	0,0076	0,0092	121,1	9,0
2	0,0118	0,0085	0,0033	70,4	38,8	2,0	0,0230	0,0088	0,0093	161,4	10,0
3	0,0139	0,01	0,0039	65,0	39,0	3,0	0,0182	0,0083	0,0099	119,3	11,0
4	0,0141	0,0096	0,0045	59,6	46,9	4,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	12,5
5	0,0139	0,0092	0,0047	57,8	51,1	5,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	12,5
6	0,0141	0,0083	0,0058	48,0	69,9	6,0	0,0184	0,0079	0,0105	132,9	14,0
7	0,0146	0,0084	0,0062	44,4	73,8	7,0	0,0186	0,0075	0,0111	148,0	15,5
8	0,0173	0,0087	0,0086	22,9	98,9	8,0	0,0206	0,0095	0,0111	116,8	15,5
9							0,0197	0,0085	0,0112	131,8	17,0
10							0,0189	0,0073	0,0116	158,9	18,0
11							0,0220	0,0100	0,0120	120,0	19,0
12							0,0220	0,0090	0,0130	144,4	20,0
13							0,0212	0,0080	0,0132	165,0	21,0
14							0,0230	0,0091	0,0139	152,7	23,0
15							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0
16							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0

n	8	8	8	8	16	16	16
promedio	0,0139	0,0090	0,0049	56,5	0,0202	0,0084	0,0115
mediana	0,0140	0,0090	0,0046	58,7	0,0202	0,0084	0,0112
Desv. Std	0,0018	0,0006	0,0021	18,4	0,0019	0,0008	0,0017
Error Std	0,0007	0,0002	0,0007	6,5	0,0005	0,0002	0,0004

36,0

% E con promedio	57,8
% E CON MEDIANA	58,7
mediana de controles	0,0112
mediana de muestra	0,0046
% E FINAL CON MEDIANA	58,7

$$Z = w \cdot [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m \cdot n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

z =	-3,92
p =	4,442E-05

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 11: Test de Mann-Whitney para datos no paramétricos e independientes

Inflamación tópica inducida por AA: PROPÓLEO PIRQUE extracto etanólico global en etanol

Dosis: 3 mg/ 20 uL/ oreja

Fecha: 18-10-2012

Ratón	MUESTRA						CONTROLES				
	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% EAI	% INF	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0140	0,0089	0,0051	54,3	57,3	1,0	0,0168	0,0076	0,0092	121,1	7,0
2	0,0148	0,0090	0,0058	48,0	64,4	2,0	0,0230	0,0088	0,0093	161,4	8,0
3	0,0155	0,0092	0,0063	43,5	68,5	3,0	0,0182	0,0083	0,0099	119,3	9,0
4	0,0166	0,0096	0,0070	37,2	72,9	4,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	10,5
5	0,0164	0,0085	0,0079	29,1	92,9	5,0	0,0187	0,0087	0,0100	114,9	10,5
6	0,0171	0,0090	0,0081	27,4	90,0	6,0	0,0184	0,0079	0,0105	132,9	12,0
7	0,0187	0,0080	0,0107	4,0	133,8	13,0	0,0186	0,0075	0,0111	148,0	14,5
8	0,0219	0,0086	0,0133	-19,3	154,7	21,0	0,0206	0,0095	0,0111	116,8	14,5
9							0,0197	0,0085	0,0112	131,8	16,0
10							0,0189	0,0073	0,0116	158,9	17,0
11							0,0220	0,0100	0,0120	120,0	18,0
12							0,0220	0,0090	0,0130	144,4	19,0
13							0,0212	0,0080	0,0132	165,0	20,0
14							0,0230	0,0091	0,0139	152,7	23,0
15							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0
16							0,0215	0,0076	0,0139	182,9	23,0

n	8	8	8	8		16	16	16
promedio	0,0169	0,0089	0,0080	28,0		0,0202	0,0084	0,0115
mediana	0,0165	0,0090	0,0075	33,2		0,0202	0,0084	0,0112
Desv. Std	0,0025	0,0005	0,0027	24,6		0,0019	0,0008	0,0017
Error Std	0,0009	0,0002	0,0010	8,7		0,0005	0,0002	0,0004

55,0

% E con promedio	30,1
% E CON MEDIANA	33,2
mediana de controles	0,0112
mediana de muestra	0,0075
% E FINAL CON MEDIANA	33,2

$$Z = w \cdot [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m \cdot n(m+n+1)/12]$$

Hipótesis nula: mediana de las muestras es igual o superior a la mediana de los controles

Hipótesis alternativa: mediana de las muestras es menor a la mediana de los controles

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

z =	-2,76
p =	0,0029285

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EDEMAS DE LAS MUESTRAS Y LOS EDEMAS DE LOS CONTROLES

Anexo 12: Test de Kruskal-Wallis ANOVA para datos no paramétricos e independientes

Comparación de los EAI de los EEG de los distintos propóleos utilizados en ensayo de AA

	N	Min	Q1	Median % EAI	Q3	Max
AA EEG CA	8	-4,93274	-2,9148	8,07175	41,25561	50,67265
AA EEG CM	8	-34,52915	-22,64574	21,52466	30,49327	54,26009
AA EEG CV	8	36,32287	41,92825	57,84753	62,33184	64,12556
AA EEG B	8	22,86996	45,29148	58,74439	69,0583	83,8565
AA EEG P	8	-19,28251	9,86547	33,18386	46,86099	54,26009

	N	Mean Rank	Sum Rank
AA EEG CA	8	12,125	97
AA EEG CM	8	12,5	100
AA EEG CV	8	30,125	241
AA EEG B	8	30,6875	245,5
AA EEG P	8	17,0625	136,5

Chi-Square	DF	Prob>Chi-Square
20,05509	4	4,87E-04

Hipótesis nula: Todas las muestras poseen EAI iguales

Hipótesis Alternativa: Las muestras poseen EAI distintos

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS EAI DE LOS DISTINTOS PROPÓLEOS

Anexo 13: Test de Mann Whitney para los EAI de dos grupos de propóleos

BUIN V.S. CURACAVÍ

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI B	8	22,86996	45,29148	58,74439	69,0583	83,8565
EAI CV	8	36,32287	41,92825	57,84753	62,33184	64,12556

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI B	8	9,1875	73,5
EAI CV	8	7,8125	62,5

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
37,5	0,52549	0,59285	0,59924

Hipótesis Nula: EAI de Buin es igual al de Curacaví

Hipótesis Nula: EAI de Buin es distinto al de Curacaví

A un nivel de 0.05 no hay motivos para rechazar la hipótesis nula

NO hay diferencia significativa entre el EAI de Buin y el de Curacaví

BUIN V.S. PIRQUE

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI B	8	22,86996	45,29148	58,74439	69,0583	83,8565
EAI P	8	-19,28251	9,86547	33,18386	46,86099	54,26009

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI B	8	11,375	91
EAI P	8	5,625	45

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
55	2,36297	0,01476	0,01813

Hipótesis Nula: EAI de Buin es igual al de Pirque

Hipótesis Nula: EAI de Buin es distinto al de Pirque

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

Hay diferencias significativas entre los EAI de Buin y Pirque

BUIN V.S. CAJÓN MAIPO

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI B	8	22,86996	45,29148	58,74439	69,0583	83,8565
EAI CM	8	-34,52915	-22,64574	21,52466	30,49327	54,26009

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI B	8	11,8125	94,5
EAI CM	8	5,1875	41,5

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
58,5	2,73256	0,00326	0,00628

Hipótesis Nula: EAI de Buin es igual al de Cajón del Maipo

Hipótesis Nula: EAI de Buin es distinto al de Cajón del Maipo

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

Hay diferencias significativas entre los EAI de Buin y Cajón del Maipo

Anexo 14: Test de Mann Whitney para los EAI de dos grupos de propóleos

BUIN V.S. CALEU

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI B	8	22,86996	45,29148	58,74439	69,0583	83,8565
EAI CA	8	-4,93274	-2,9148	8,07175	41,25561	50,67265

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI B	8	11,8125	94,5
EAI CA	8	5,1875	41,5

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
58,5	2,73256	0,00326	0,00628

Hipótesis Nula: EAI de Buin es igual al de Caleu

Hipótesis Nula: EAI de Buin es distinto al de Caleu

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

Hay diferencias significativas entre los EAI de Buin y Caleu

PIRQUE V.S. CURACAVI

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI P	8	-19,28251	9,86547	33,18386	46,86099	54,26009
EAI CV	8	36,32287	41,92825	57,84753	62,33184	64,12556

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI P	8	5,4375	43,5
EAI CV	8	11,5625	92,5

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
7,5	-2,52236	0,00761	0,01166

Hipótesis Nula: EAI de Pirque es igual al de Curacaví

Hipótesis Nula: EAI de Pirque es distinto al de Curacaví

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

Hay diferencias significativas entre los EAI de Pirque y Curacaví

PIRQUE V.S. CAJÓN MAIPO

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI P	8	-19,28251	9,86547	33,18386	46,86099	54,26009
EAI CM	8	-34,52915	-22,64574	21,52466	30,49327	54,26009

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI P	8	9,875	79
EAI CM	8	7,125	57

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
43	1,10435	0,26651	0,26944

Hipótesis Nula: EAI de Pirque es igual al de Cajón del Maipo

Hipótesis Alternativa: EAI de Pirque es distinto al de Cajón Maipo

A un nivel de 0.05 no hay motivos para rechazar la hipótesis nula

NO hay diferencia significativa entre el EAI de Pirque y Cajón del Maipo

Anexo 15: Test de Mann Whitney para los EAI de dos grupos de propóleos

CURACAVI V.S. CAJON MAIPO

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI CV	8	36,32287	41,92825	57,84753	62,33184	64,12556
EAI CM	8	-34,52915	-22,64574	21,52466	30,49327	54,26009

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI CV	8	12,25	98
EAI CM	8	4,75	38

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
62	3,09812	6,22E-04	0,00195

Hipótesis Nula: EAI de Curacaví es igual al de Cajón del Maipo

Hipótesis Nula: EAI de Curacaví es distinto al de Cajón del Maipo

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

Hay diferencias significativas entre los EAI de Curacaví y Cajón del Maipo

CURACAVI V.S. CALEU

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI CV	8	36,32287	41,92825	57,84753	62,33184	64,12556
EAI CA	8	-4,93274	-2,9148	8,07175	41,25561	50,67265

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI CV	8	12	96
EAI CA	8	5	40

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
60	2,88808	0,00186	0,00388

Hipótesis Nula: EAI de Curacaví es igual al de Caleu

Hipótesis Nula: EAI de Curacaví es distinto al de Caleu

A un nivel de 0.05 se rechaza la hipótesis nula

Hay diferencias significativas entre los EAI de Curacaví y Caleu

CAJÓN MAIPO V.S. CALEU

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI CM	8	-34,52915	-22,64574	21,52466	30,49327	54,26009
EAI CA	8	-4,93274	-2,9148	8,07175	41,25561	50,67265

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI CM	8	8,9375	71,5
EAI CA	8	8,0625	64,5

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
35,5	0,31529	0,7411	0,75254

Hipótesis Nula: EAI de Cajón del Maipo es igual al de Caleu

Hipótesis Nula: EAI de Cajón del Maipo es distinta al de Caleu

A un nivel de 0.05 no hay motivos para rechazar la hipótesis nula

NO hay diferencia significativa entre el EAI de Cajón del Maipo y Caleu

Anexo 16: Test de Mann Whitney para los EAI de dos grupos de propóleos

PIRQUE V.S. CALEU

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
EAI P	8	-19,28251	9,86547	33,18386	46,86099	54,26009
EAI CA	8	-4,93274	-2,9148	8,07175	41,25561	50,67265

	N	Mean Rank	Sum Rank
EAI P	8	9,625	77
EAI CA	8	7,375	59

U	Z	Exact Prob> U	Asymp. Prob> U
41	0,89268	0,38228	0,37203

Hipótesis Nula: EAI de Pirque es igual al de Caleu

Hipótesis Nula: EAI de Pirque es distinta al de Caleu

A un nivel de 0.05 no hay motivos para rechazar la hipótesis nula

NO hay diferencia significativa entre el EAI de Pirque y el de Caleu