

Evaluación de la capacidad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo ante la antracnosis en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

Evaluation of the antifungal capacity of ethanolic extracts of propolis against anthracnose in tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.)

Avaliação da capacidade antifúngica dos extractos etanólicos de propólis para tomate árvore antracnose (*Solanum betaceum* Cav.)

Yesenia Campo^{1*}, Yaneth Muñoz², Ana Lopez², Julio Contreras-Velásquez³, Moisés Martínez⁴, Valmore Bermúdez³

¹Grupo de Investigación en Ciencia, Tecnología e Innovación. Instituto Superior de Educación Rural (ISER), Pamplona, Colombia. Programa Tecnología Agroindustrial a distancia. Correos electrónicos: yesenia.campo.vera@gmail.com. ²Grupo de investigación Ambiente y Vida. Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia. Correos electrónicos: yanethamparomp@ufps.edu.co; 25tulipanes@gmail.com. ³Grupo de Investigación Altos Estudios de Frontera (ALEF), Universidad Simón Bolívar, Cúcuta, Colombia. Correos electrónicos: j.contrerasv@unisimonbolivar.edu.co; Valmore@gmail.com. ⁴Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: moisesenriquemartinezsoto@fa.luz.edu.ve.

Resumen

La antracnosis es una enfermedad fúngica que tienen una importante incidencia en los cultivos de tomate de árbol. La misma es ocasionada por los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) o su teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman). La presente investigación evaluó la capacidad antifúngica del propóleo, un derivado de los productos apícolas, obtenido en tres localidades diferentes de

Recibido el 30-11-2017 • Aceptado el 28-09-2018

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: yesenia.campo.vera@gmail.com.

Norte Santander (Oripaya, San Cayetano, Los Patios). Inicialmente, se realizó una caracterización de la resina mediante la identificación de sus propiedades fisicoquímicas, tales como: cenizas $3,56 \pm 0,64\%$; humedad $5,11 \pm 0,11\%$; material insoluble $5,11 \pm 0,11\%$; índice de oxidación $49 \pm 1\%$; puntos de fusión $80,90 \pm 3,21$; espectro de absorción UV en el rango de 270 a 350 nm tales como: cenizas, humedad, material insoluble, índice de oxidación, puntos de fusión, espectro de absorción UV y posteriormente, se verificó el porcentaje de inhibición de los microorganismos empleando la técnica de antibiograma con sensidiscos impregnados con tres concentraciones de extracto etanólico de propóleo EEP (10%, 20%, 30%). Se encontró que los propóleos cumplen con los estándares internacionales para los parámetros de cenizas, humedad, puntos de fusión y espectros de absorción de la radiación ultra violeta (UV), evidenciándose la calidad del propóleo y la presencia de flavonoides, además del mismo se halló que el propóleo de la localidad de Oripaya al 10% tiene mayor capacidad de inhibición frente a *C. gloeosporioides* (Penz.).

Palabras clave: Antibiograma, fitopatógenos, inhibición, productos apícolas, resina.

Abstract

Anthracnose is a very important fungal disease in tree-tomato crop. It is caused by the phytopathogens *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) or its teleomorph *Glomerella cingulata* (Stoneman). The present investigation evaluated the antifungal capacity of propolis, a derivative of apicultural products, obtained in three different locations of Norte Santander (Oripaya, San Cayetano, Los Patios). Initially, a characterization of the resin was carried out by identifying its physics and chemicals properties, such as ash, moisture, insoluble material, oxidation index, melting points and UV absorption spectrum and subsequently, the microorganism inhibition percent was verified using antibiotic disc for susceptibility test impregnated with three propolis ethanol extract (PEE) concentrations (10%, 20%, 30%). It was found that propolis conforms to international parameters of ash and moisture contents, melting points and UV absorption spectrum, showing propolis quality and the presence of flavonoids; also it was found that the propolis extract to 10% of the Oripaya locality had greater capacity of inhibition against *C. gloeosporioides* (Penz.).

Key words: susceptibility test, phytopathogens, inhibition, bee products, resin.

Resumo

A antracnose é uma doença fúngica que tem uma incidência importante em plantações de tomate. É causada pelos fitopatógenos *Colletotrichum*

gloeosporioides (Penz.) ou pelo seu teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman). A presente investigação avaliou a capacidade antifúngica da própolis, derivada de produtos apícolas, obtida em três locais diferentes do Norte Santander (Oripaya, San Cayetano, Los Pátios). Inicialmente, foi realizada uma caracterização da resina, identificando suas propriedades físico-químicas, tais como: cinza $3,56 \pm 0,64\%$; umidade $5,11 \pm 0,11\%$; material insolúvel $5,11 \pm 0,11\%$; índice de oxidação $49 \pm 1\%$; pontos de fusão $80,90 \pm 3,21$; Espectro de absorção de UV na gama de 270 a 350 nm, tais como cinza, humidade, o material insolúvel, a taxa de oxidação, pontos de fusão, espectro de absorção de UV e, em seguida, a percentagem de inibição de microrganismos foi verificado por meio da técnica de teste de sensibilidade antibiótica com três concentrações de extrato etanólico de própolis EEP (10%, 20%, 30%). Verificou-se que a própolis às normas internacionais de cinzas parâmetros, a humidade, os pontos de fusão e espectros de absorção de radiação ultra-violeta (UV), o que demonstra a qualidade de própolis e a presença de flavonóides, em adição a isso foi encontrado que a própolis da localidade de Oripaya a 10% possui maior capacidade de inibição contra *C. gloeosporioides* (Penz.).

Palavras-chave: Antibiograma, fitopatógenos, inibição, produtos apícolas, resina.

Introducción

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) es una planta que pertenece a la familia de las solanáceas y hace parte del grupo de los frutales de clima frío moderado, que se desarrolla muy bien en rangos de altura entre los 1.500 y 2.400 m.s.n.m. Es originaria de los Andes y en América Latina, es ampliamente cultivada en Colombia y Ecuador y en menor proporción en Perú, Chile, Argentina, Brasil, Venezuela, Costa Rica; los principales productores a nivel mundial Nueva Zelanda, Kenia, Sri Lanka, India, Colombia, Zambia y Zimbabwe (Ávila, 2015; Toloza, 2008).

En Colombia, es uno de los frutales de mayor importancia económica, según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2014), se cuenta con 8.414 ha, de las cuales

Introduction

The tree-tomato (*Solanum betaceum* Cav.) belongs to the solanaceae family and it is part of moderate cold climate fruit trees, which develop very well in height ranges between 1,500 and 2,400 m above sea level. It is native from Andes and widely cultivated in Colombia and Ecuador, while is lesser extent in Peru, Chile, Argentina, Brazil, Venezuela and Costa Rica; the worldwide main producers are New Zealand, Kenya, Sri Lanka, India, Colombia, Zambia and Zimbabwe (Ávila, 2015, Toloza, 2008).

In Colombia, it is one of the most economically important fruit trees, according to the National Administrative Department of Statistics (DANE, 2014), it has 8414 ha, which 4591 ha produced 71415

4.591 produjeron 71.415 toneladas con rendimientos promedio de 15,60 t.ha. Antioquia representa el principal departamento productor (82.390,80 t), seguido por Cundinamarca (42.120,20 t), Tolima (10.905 t), Boyacá (6.543,20 t) y Huila (4.307 t) (CCB, 2014).

Colletotrichum gloeosporoides (Penz.) o su teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman) es un microorganismo patógeno causante de la antracnosis que ocasiona daños significativos en el cultivo del tomate de árbol y sobre el cual, tradicionalmente se han hecho controles culturales y químicos (Saldarriaga *et al.*, 1997; Mondino, 2008). En el Norte de Santander, en predios con condiciones agroecológicas muy húmedas la incidencia de antracnosis en campo fue del 26% y en predios donde no se aplican prácticas culturales, la incidencia llegó hasta 80% (DANE, 2014).

Entre los fungicidas más usados para el control de ésta enfermedad están el sulfato de cobre y zinc, captan, clortalonil, de tipo preventivo, ingredientes activos como dimetomorf, carbendazim, difeconazole (Cárdenas *et al.*, 2005). Estos tienen actividad fungicida de amplio espectro, son aplicados a nivel foliar con diferentes modos de acción, a nivel sistémico, protector, curativo antiesporulante y preventivo, pero con un riesgo de generar resistencia; por esta razón, es necesario la proposición de nuevas alternativas que contribuyan a mejorar los procesos de producción y cosecha de frutas (Fantke y Juraske, 2013).

El propóleo es una resina cética de

tons with average yields of 15.60 t. ha. Antioquia represents the main producer department (82390.80 t), followed by Cundinamarca (42120.20 t), Tolima (10905 t), Boyacá (6543.20 t) and Huila (4307 t) (CCB, 2014).

Colletotrichum gloeosporoides (Penz.) or its teleomorph *Glomerella cingulata* (Stoneman) is a pathogenic microorganism that origins anthracnose which causes significant damage to tree-tomato crop; this disease has traditionally been controlled with agronomics practices and chemical controls (Saldarriaga *et al.*, 1997; Mondino, 2008). In Norte de Santander, the incidence of anthracnose was 26% in farms with very humid conditions, while the incidence reached up to 80% in farms where agronomics practices are not applied (DANE, 2014).

Among the fungicides most used for chemical control of this disease are copper and zinc sulfate, captan, clortalonil, preventive type, active ingredients such as dimetomorf, carbendazim, difeconazole (Cárdenas *et al.*, 2005). These fungicides have wide spectrum and they are used in foliar applications with systemic, protective, antispore and preventive action, but with a risk to generate resistance; for this reason, it is necessary to propose new alternatives for diseases control to improve fruit production and harvest (Fantke and Juraske, 2013).

Propolis is a waxy resin with complex composition and viscous consistency that bees elaborate and use in the construction, repair, isolation and protection of the hive.

composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena. Desde la Edad Media ha sido utilizado como antiséptico y cicatrizante en el tratamiento de heridas y como desinfectante bucal (Toreti *et al.*, 2013). Es un producto natural que las abejas toman de los árboles, cuyas propiedades antifúngicas pudiesen ser aprovechadas para el control de estos fitopatógenos (Sforcin y Bankova, 2011). En el interior de la colmena, el propóleo cumple la función de defensa contra microorganismos patógenos, propiedad que deriva de los componentes químicos de su estructura; el principio activo se encuentra en los fenoles y flavonoides, tales como: pinocebrina, galangina, pinobanksina (Manrique, 2006).

Samara-Ortega *et al.* (2011) señalan la actividad anti fúngica del extracto etanólico de propóleo (EEP) contra *G. cingulate*, donde se aplicaron concentraciones de EEP de 500 a 5.000 mg · L⁻¹ pudiendo evidenciar una reducción representativa en el crecimiento de las colonias del hongo con diámetros de sólo 2,41 cm y 1,84 cm; asimismo, el hongo es sensible al propóleo con un 39% de inhibición en el crecimiento radial a concentraciones entre los 1.000 y 5.000 ppm. En otro estudio, Pineda *et al.* (2010), evaluaron extractos de propóleo en concentraciones del 15, 20 y 30%, encontrando porcentajes de inhibición del mismo hongo del 27 al 30 %, valores que indican que tales extractos al ser aplicados sobre frutos cosechados e infectados, retardaron el desarrollo de la infección.

Since the Middle Ages, it has been used as an antiseptic, a disinfectant for the mouth and healing processes of wounds (Toreti *et al.*, 2013). It is a natural product taken from trees by the bees, whose antifungal properties could be used to diseases control (Sforcin and Bankova, 2011). Inside the hive, propolis accomplishes a defense function against pathogenic microorganisms, due to chemical components of its structure; the active ingredient is form a part of phenols and flavonoids, such as: pinocebrin, galangin, pinobanksin (Manrique, 2006).

Samara-Ortega *et al.* (2011) reported antifungal activity of the propolis ethanol extract (PEE) against *G. cingulate*, when PEE concentrations since 5,00 to 5,000 mg · L⁻¹ were applied, causing a significant reduction of the colonies growth between 2.41 and 1.84 cm of diameters. Likewise, fungus also showed susceptibility to propolis, since radial growth was inhibited of 39% at PEE concentrations between 1,000 and 5,000 ppm. In another study, Pineda *et al.* (2010) evaluated 15, 20 and 30% propolis extracts concentrations and they found inhibition from 27 to 30% for the same fungus; these values indicate that propolis extracts retarded fungus infection when they were applied on harvested infected fruits.

The diversity in chemical composition of this apicultural product and its widespread industry use, require to establish quality controls and standardization. To this end, methodologies have been developed by different international standards,

La diversidad en la composición química de este producto apícola y su empleo generalizado en la industria, ha traído como consecuencia la necesidad de su control de calidad y normalización. Con este fin, se han desarrollado metodologías de trabajo establecidas por diferentes normas internacionales, entre las que se incluyen la norma IRAM-INTA del Instituto Argentino de Normalización Subcomité (IRAM-INTA 2008), de productos agroalimentarios y el reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos del Ministerio de Agricultura de Brasil-Apacame (1999).

Con base en lo anterior, esta investigación tiene como objetivos caracterizar las propiedades físico-químicas de los extractos etanólicos de propóleo y evaluar la capacidad antifúngica del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol, para lo cual se determinará el porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos, empleando la técnica de antibiograma, a partir de la resina previamente caracterizada.

Materiales y métodos

Ubicación del estudio: La investigación se realizó con EPP proveniente de una población de apiarios ubicados en las localidades de La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) y El Amparo (Los Patios) del Departamento del Norte de Santander, en el Oriente de la República de Colombia (72°39' de longitud al oeste de Greenwich y a 7° y 23' de latitud norte).

such as IRAM-INTA norms of the Agrofood Products Subcommittee of the Standardization Institute of Argentina (IRAM-INTA 2008), and the technical regulation to certify propolis identity and quality of the Agriculture Ministry of Brazil-Apacame (1999).

Based on the above, the objective of this research is to characterize the physical and chemical properties of the propolis ethanol extracts and to evaluate its antifungal capacity to control anthracnose in tree-tomato crop, for which propolis extracts inhibition percent was determined, using antibiotic disc for susceptibility test.

Materials and methods

Location of the study

The research was conducted with PEE from apiaries located in La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) and El Amparo (Los Patios) towns of Norte de Santander Department, at west of the Republic of Colombia (72° 39' W and 7° 23' N).

This three locations were selected for presenting good conditions for beekeeping; climate and vegetation of this areas further encourage great apicultural potential in this region (Santamaría, 2009).

The region has temperature between 16 and 33 °C and altitudes among 320 and 2,250 m above sea level; the exploitation of natural resources such as coal and oil is the principal activity; agriculture is the basis of the economy with cotton, rice, tobacco, cocoa, sugar cane, coffee and wheat production (Alzate *et al.*, 2015).

Las tres localidades fueron seleccionadas por ser zonas que presentan condiciones muy aptas para el desarrollo de la apicultura; su clima y vegetación las proyectan como zonas con mayor potencial apícola en el departamento (Santamaría, 2009).

La región se caracteriza por ser una zona agroecológica con temperatura de oscila entre los 16 y los 33°C y presenta alturas sobre el nivel del mar comprendidas entre los 320 y los 2.250 m; la explotación de sus recursos naturales como el carbón y petróleo es eje, la agricultura es base de la economía con productos como el algodón, el arroz, el tabaco, el cacao, la caña de azúcar, el café y el trigo (Alzate *et al.* 2015).

Los apiarios seleccionados se caracterizaron por tener una producción aproximada de 10 kilos por colmena, una población de abejas de 35.000 abejas, la zona también presenta diversidad de especies *Melipona gr. fasciata* y *Melipona compressipes* de abejas del género *Melipona* con potencial para la obtención de miel. En el apiario La Taparita (Oripaya) se seleccionaron colmenas con abundante población de abejas, buena postura de las reina y dos alzas, sin embargo en los otros apiarios muestreados, El Amparo (Los Patios) y Santa Ana (San Cayetano), no contaban con las mismas condiciones del primero y el número de colmenas era reducido, tres en cada uno, por lo que fue necesario tomar de cada colmena para lograr reunir la cantidad de resina para el análisis, del apiario de San Cayetano se obtuvo los 30 g requeridos y de los Patios se

The selected apiaries were characterized by having an approximate production of 10 kilogram per hive with a population of 35,000 bees and species diversity of genus *Melipona*, *Melipona gr. fasciata* and *Melipona compressipes* with high honey production potential. In the La Taparita apiary (Oripaya) beehives presented abundant bee population, good posture of the queen and two honey-hives; while the other apiaries sampled (El Amparo, Los Patios and Santa Ana, San Cayetano) the number of honey-hives were reduced, three in each one, so it was necessary to take each hive to achieve adequate amount of resin for analysis. A total of 30 and 17 g of resin was obtained from San Cayetano and the Patios apiaries, respectively.

On the other hand, the population of tree-tomato was obtained from producing areas, located in the municipalities of Silos, Cucutilla and Diamante in Norte de Santander.

Sampling of propolis

The sampling of propolis was carried out randomly in different beehives to take a composite sample. The samples was taken using two methods of harvesting: Scraping (R) during one period: March-April 2015 (dry season) and photoperiod with 12 hours of light per day; in total, 18 samples were obtained (3x2x3). They were labeled according to their origin (Oripaya, Los Patios and San Cayetano). Once the material was collected, it was stored in amber bottles at -18 °C until analysis.

To collect samples of propolis the method of direct scraping with stainless steel lever was used (figure

obtuvo 17 g.

Asimismo, la población de frutos de tomate árbol fue obtenida de zonas productoras, ubicadas en los municipios de Silos, Cucutilla y Diamante en Norte de Santander.

Muestreo del propóleo

Se efectuó en forma aleatoria en diferentes colmenas hasta obtener una muestra compuesta. Se cosechó empleando dos métodos de recolección: raspado (R) durante un periodo: marzo-abril del 2015 (época de sequía) y un fotoperiodo de 12 horas de luz al día; en total se obtuvieron 18 muestras (3x2x3). Las mismas se rotularon de acuerdo a su procedencia (Oripaya, los Patios y San Cayetano). Una vez recolectado el material, se almacenó en frascos ámbar y se conservó a -18°C hasta su análisis.

Para hacer la recolección de muestras de propóleo se usó el método de raspado directo con palanca de acero inoxidable con las cuales se removió el propóleo (figura 1) (Chaillou *et al.*, 2004; Manrique, 2006; Palomino *et al.*, 2009).

Preparación de los extractos de propóleo: El proceso de extracción de las diferentes muestras de propóleos se realizó teniendo en cuenta el Código Alimentario Argentino y varios artículos científicos (Russo *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.*, 2004; Uzel *et al.*, 2005; Popova *et al.*, 2004; Popova *et al.*, 2005; Martínez, 2009) cuyos autores reportaron extracción etanólica de propóleos. El proceso estandarizado es el producto de la combinación de varias metodologías y la adecuación de éstas a nuestras condiciones de trabajo.

1) (Chaillou *et al.*, 2004; Manrique, 2006; Palomino *et al.*, 2009).

Preparation of propolis extracts

The process to extract propolis was carried out taking into account the Argentina Food Code and several scientific articles (Russo *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.*, 2004; Uzel *et al.*, 2005; Popova *et al.*, 2004; Popova *et al.*, 2005; Martínez, 2009) whose authors reported ethanol extraction of propolis. The standardized process resulted from combination and adaptation of several methodologies to this work.

In a mortar the resin was macerated until its granulometry was reduced, then 30 g were weighed and diluted in 100 mL of distilled ethanol at 96% (the alcohol addition was made in three parts of 30 mL + 10 mL) in containers wrapped with aluminum foil; it was shaken for 48 h at room temperature and centrifuged at 3000 rpm for 10 min; then, mixture was filtered by gravity and 10 mL of distilled water was added to the filtrate. It was left in refrigerator until all wax precipitated (12 h approximately), then filtration was done twice until no longer observe the presence of waxes (Popova *et al.*, 2005; Martínez, 2009).

Ethanol extract was dried in roto-evaporator at 40 °C; the resin obtained was packed in amber bottles which were kept refrigerated until analysis and susceptibility tests (Popova *et al.*, 2005; 2009).

Physical and chemical tests to the propolis ethanol extract

The following physical and chemical analyzes to the PEE were made:

a) Content of ash, moisture



Figura 1. Método de raspado directo con palanca de acero inoxidable para la recolección de muestras de propóleos provenientes de apiarios ubicados en las localidades de La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) y El Amparo (Los Patios) del Departamento del Norte de Santander, en el Oriente de la República de Colombia.

Figure 1. Method of direct scraping with lever of stainless steel to sample propolis from apiaries from La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) and El Amparo (Los Patios) localities of Norte de Santander Departement, at the East of the Republic of Colombia.

En un mortero se maceró la resina, hasta reducir su granulometría, después se pesaron 30 g y se diluyeron en 100 mL de etanol destilado al 96%, (la adición del alcohol se realizó por partes, $30 \times 3 + 10$ mL), luego se dejó en recipientes envueltos en papel aluminio sobre un agitador por 48 h a temperatura ambiente; la mezcla se centrifugó a 3000 rpm.10 min y se filtró por gravedad, al filtrado se le adicionó 10 mL de agua destilada y se dejó en refrigeración hasta que se precipito toda la cera, (12 h aproximadamente) se hizo filtración dos veces hasta ya no observar presencia de ceras (Popova *et al.*, 2005; Martínez, 2009).

El extracto etanólico resultante se sometió al rota-evaporador hasta

and insoluble material were made in triplicates and following the methodology proposed by international standards IRAM-INTA (2008).

b) Oxidation index was determined according to the time it takes to decolorize the potassium permanganate solution to demonstrate the presence of phenols; the procedure was carried out following the Russian RST-RSFSR-317-77 (1997) and some modifications made by Martínez (2009).

A 2,0 g sample of PEE were weighed in an amber bottle with a lid, then 3 mL of distilled ethanol at 96% were added and it was stirred at 25 °C for 48 hours; then, the solution

sequedad a una temperatura de 40°C, la resina obtenida se envasó en frascos color ámbar los cuales se mantuvieron refrigerados hasta el momento de usarlos para las pruebas (Popova *et al.*, 2005; Martínez, 2009).

Aplicación de pruebas fisicoquímicas al extracto etanólico de propóleo

Los análisis fisicoquímicos aplicados al EEP, fueron los siguientes:

a) Contenido de cenizas, humedad y material insoluble se hicieron por triplicados y siguiendo la metodología propuesta por las normas internacionales (IRAM-INTA, 2008).

b) Índice de oxidación: Para evidenciar la presencia de fenoles, se determina de acuerdo al tiempo que tarda en decolorarse la solución de permanganato de potasio, el procedimiento se realizó siguiendo la norma Rusa RST-RSFSR-317-77 (1997) y algunas modificaciones realizadas por Martínez (2009).

Para la realización de los mismos, se pesó 2 g de propóleo en un frasco color ámbar con tapa, a continuación se adicionaron 3 mL de etanol destilado al 96% y se dejó en agitación a 25°C por 48 horas, luego se filtró la solución empleando papel filtro y se midió el volumen del filtrado el cual fue ajustado hasta 3 mL con etanol destilado al 96%; después se tomó 1 mL del filtrado y se aforó con agua destilada hasta 25 mL en un balón, a continuación se depositaron 0,5 mL en un tubo de ensayo en el cual se adicionó 0,5 ml de agua destilada y 1 mL de H₂SO₄ al 20% se agitó durante un minuto, finalmente se adicionan 50 µL de solución de permanganato de

was filtered using filter paper and the volume of the filtrate was measured and adjusted to 3 mL with distillate ethanol at 96%. Afterward, 1 mL of the filtrate was taken and gauged with distilled water to 25 mL in a balloon; next, 0.5 mL was placed in a test tube and added 0.5 mL of distilled water and 1 mL of H₂SO₄ at 20%. The mixture was stirred for one minute, finally 50 µL of potassium permanganate (KMNO₄) solution was added and the decolorization time was measured with the stopwatch (Martínez *et al.*, 2012).

c) Fusion point: In order to relate the content of waxes and the texture of propolis, the technique of capillary tubes in glycerin bath was performed, using an Electrothermal brand electric fusimeter, which is adjusted to 60 °C; then, a small amount of resin was introduced inside three capillary tubes, which were introduced into a cell inside the fusimeter. The changes on the resin was observed through the lens; temperatures were recorded at the beginning and end of the bubbling, then both temperatures were averaged (Martínez, 2009).

d) UV absorption spectrum was determined using a solution of PEE at 0.05 % to obtain the spectrogram of absorption employing a spectrophotometer and to demonstrate the presence of flavonoids. The ethanol extract sample at 0.05 % was deposited in the cell and the equipment was programmed at a wavelength (λ 290 nm) and ethanol at 96% was used as the target (Palomino *et al.*, 2010). Readings were made at wavelengths from 250 nm to 410 nm. It must

potasio $KMNO_4$ y se midió el tiempo de decoloración con el cronómetro (Martínez *et al.*, 2012).

c) Punto de fusión: Con el fin de relacionar el contenido de ceras y la textura del propóleo, se realizó la técnica de tubos capilares en baño de glicerina, empleando un fusiómetro eléctrico marca Electrothermal, el cual se ajusta a 60°C, luego se introdujo una pequeña cantidad de resina en el interior de tres tubos capilares, éstos se introdujeron en una celda al interior del fusiómetro, observando a través del lente el cambio de estado de la resina, que comienza a burbujear y se registró la temperatura de inicio, al término del burbujeo se registró la temperatura final, luego se promediaron ambas temperaturas y se obtuvo el resultado (Martínez, 2009).

d) Espectro de absorción UV: Para evidenciar la presencia de flavonoides, se determinó empleando una solución de 0,05% del extracto etanólico para obtener el espectrograma de absorción de la muestra, utilizando un espectrofotómetro. Para ello se depositó en la celda la muestra de propóleo ajustada a la concentración dada, y se programó el equipo a una longitud de onda (λ 290 nm), como blanco se utilizó etanol al 96% (Palomino *et al.*, 2010). Se realizaron lecturas a longitudes de onda desde los 250 nm hasta los 410 nm. Debe presentar un pico de absorción entre 250 nm y 310 nm (Palomino *et al.*, 2010).

Aislamiento de las cepas del fitopatógeno

El hongo *C. gloeosporoides* fue aislado de frutos de tomate de árbol con sintomatología de antracnosis en post-cosecha, provenientes del invernadero

presentan un pico de absorción entre 250 nm and 310 nm (Palomino *et al.*, 2010).

Isolation of the phytopathogen strains

The fungus *C. gloeosporoides* was isolated from harvested fruits of tree-tomato crop with anthracnose symptoms; this fruits coming from greenhouse of the Higher Institute of Rural Education-ISER, Pamplona, Colombia. These fruits were transported to the Microbiology laboratory of the ISER.

A disinfection protocol was performed with soap solution for 5 min, distilled water for 3 min, sodium hypochlorite at 10% for 5 min, three rinses in distilled water for 3 min each, a rinse in alcohol at 70% for 5 min and finally in distilled water for 3 min. At the end, samples were dried with sterile absorbent towel (Chacin *et al.*, 2013).

Sowing diseased tissue in potato-dextrose-agar culture medium (PDA)

Three sowings were made in PDA of the fruits explants and successive reseeded of microorganisms to isolate them and macroscopic and microscopic identification. Mycelium was taken from previous test and pulsed in PDA enriched with potato juice (200 g of potato per liter of agar), to evaluate antifungal capacity of the PEE (Chacin *et al.*, 2013).

Antibiotic disc technique for susceptibility test

To evaluate antifungal capacity of the PEE, antibiotic disc technique for susceptibility test impregnated with the extract of the determined concentrations (10%, 20%, 30%) was

del Instituto Superior de Educación Rural-ISER, Pamplona, Colombia. Estos frutos fueron trasladados al laboratorio de Microbiología del ISER.

Se realizó un protocolo de desinfección con solución jabonosa por 5 min, agua destilada por 3 min, hipoclorito de sodio al 10% por 5 min, tres enjuagues en agua destilada por 3 min cada uno, un enjuague en alcohol al 70% por 5 min y finalmente en agua destilada por 3 min para secar con toalla absorbente estéril (Chacin *et al.*, 2013).

Siembra de tejido con lecciones en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA)

Se realizaron 3 siembras en PDA de los explantes del fruto y resiembras sucesivas de los microorganismos para aislarlos, para la identificación macroscópica y microscópica. A partir de esta prueba se tomó micelio y se replicó en PDA enriquecido con zumo de papa (200 g de papa por litro de agar), para la evaluación de la capacidad antifúngica de los extractos (Chacin *et al.*, 2013).

Técnica de antibiograma con sensidiscos humedecidos

Para la evaluación de la capacidad antifúngica del extracto de propóleo, se aplicó la técnica de antibiograma con sensidiscos humedecidos con el extracto de las concentraciones determinadas (10%, 20%, 30%) de acuerdo a la metodología empleada por Pineda *et al.* (2010). Todos los ensayos se ejecutaron por triplicado. Las placas se incubaron durante 10 días a 25°C y se midió con regla milimetrada el diámetro de inhibición del micelio cada 24 h. El porcentaje de

applied, according to methodology used by Pineda *et al.* (2010). All trials were run in triplicate. The plates were incubated for 10 days at 25 ° C and the diameter of the mycelium inhibition was measured with millimeter rule every 24 h. The inhibition percentage was determined using Equation 1:

$$\%I = \left[\frac{PTto}{B} \right] \times 100 \quad (1)$$

Where: I is the percentage of inhibition (%), P is the average of the growth of each treatment (mm) and B is the average of the growth of the control treatment (without PEE) (mm). It was used ethanol at 96% as a control.

Data processing and statistical analysis

The data were recorded in a spreadsheet and treated statistically through analysis of variance ($\alpha = 0,05$) and the Least Significant Difference test was performed using statistical software package SPSS version 22.0.

Results and Discussion

The results of this research are about propolis samples physical and chemical properties determination and comparison, as well as the inhibition determination percentage and the most effective antifungal concentration of PEE obtained from the three localities.

1. Determination and comparison of the physicochemical properties of propolis samples

C. gloeosporoides: In figure 2, radial growth with concentric halos was observed, after four days of incubation; cottony and dense white

inhibición fue determinado empleando la Ecuación 1:

$$\%I = \left[\frac{PTto}{B} \right] \times 100 \quad (1)$$

Dónde: I es el porcentaje (%) de inhibición, P es el promedio del crecimiento en mm de cada tratamiento y B es el blanco absoluto (sin tratamiento). Se empleó como control etanol al 96%.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los datos obtenidos luego del proceso de observación y medición fueron registrados en una hoja de cálculo y tratados estadísticamente a través de análisis de varianza ($\alpha=0.05$) y con el fin de discernir mejor los resultados del ANOVA se utilizó la prueba post hoc de Diferencias Mínimas Significativas (DMS) del paquete de software estadístico SPSS versión 22.0.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos consisten en la determinación y comparación de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de propóleo, así como también en la determinación de los porcentajes de inhibición y la concentración antifúngica más efectiva de los extractos de propóleo de las tres localidades.

1. Determinación y comparación de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de propóleo

C. gloeosporoides: En la figura 2, se observó el crecimiento radial con

mycelium was formed, there were fat glomeruli of orange-salmon colored, corresponding to the presence of spores; microscopy observations showed hyaline spores with cylindrical shape, fusiform and rounded, pointed ends some with a slight curvature and mycelium is septate. This description corresponds to the asexual phase of *G. cingulata* (Agrios, 2008) and coincides with that presented by Chacin *et al.* (2013) and Parra (2008) for isolation process of *C. gloeosporoides*.

For determining and comparing physical and chemical properties of the propolis samples at the different localities, following variables were used: ash, humidity, insoluble material, ether extract, ethanol extract percent (%), oxidation index (s) and point of fusion (°C) (table 1).

Table 1 shows the significant differences ($p < 0.05$) in ash percentage between the Oripaya and San Cayetano propolis (3.56% and 3.57%) while the lowest values were found in the samples of Los Patios (2.42%); however ash content of propolis obtained at the three localities observes standards of the Ministry of Agriculture of Brazil (1999), since values were lower than 5%. The resin from San Cayetano presented more higher content of mineral matter (3.57%) than obtained from Los Patios (2.42%).

The ash content is especially important in the raw samples of propolis, because it is associated to therapeutic properties of this product and it may indicate the presence of minerals added to propolis by the bees, as clay and soil. This values

halos concéntricos, después de cuatro días de incubación, formó micelio blanco algodonoso y denso, formación de glomérulos de grasa color naranja salmón, que corresponde a la presencia de esporas; microscópicamente se observaron esporas de forma cilíndrica ahusada y redondeadas hialinas con extremos puntiagudos algunos con una leve curvatura, el micelio septado; esta descripción corresponde a la fase asexual de *G. cingulata* (Agris, 2008). Dicha descripción microscópica coincide con la expuesta por Chacin *et al.* (2013) y Parra (2008) en el proceso de aislamiento de *C. gloeosporoides*.

Para la determinación y comparación de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de propóleo de las distintas localidades se utilizaron las variables: cenizas, humedad, material insoluble, extracto etéreo, extracto etanólico en porcentaje (%), índice de oxidación (s) y punto de fusión (°C) (cuadro 1).

En el cuadro 1 se observa las diferencias significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de cenizas de los propóleos de Oripaya y San Cayetano (3,56% y 3,57%) y los valores más bajos se encontraron en las muestras de los Patios (2,42%), sin embargo todos cumplen con la norma del Ministerio de Agricultura de Brasil (1999), ya que los mismos valores inferiores al 5%, la resina proveniente de la localidad de San Cayetano presento mayor contenido de materia mineral (3,57%) y la de los Patios con menor contenido (2,42%).

La determinación de cenizas es especialmente importante para las muestras crudas de propóleo, debido a

were similar to those obtained in samples taken at different periods in Paraíba (Brazil) by Agra *et al.* (2006), with ash content below 3.0% and those obtained in samples at the Bajo Cauca region of Antioquia (Colombia) by Viloria *et al.* (2012), with an average content of 2.0%. In the other hand, ash content obtained in this research was lower than those reported in samples collected in Brazil for 12 months by Sousa *et al.* (2007), with values close to 10.9%.

This investigation reports humidity values below 10%, which is the maximum value required by the standard in force IRAM-INTA (2008); the propolis of Oripaya showed the highest humidity content (5.11%) while the samples from San Cayetano presented lowest percentage (3.49%). This parameter is important to determine propolis characteristics, since the humidity content is an index of resin microbiological stability, since the lower the percentage, the lower the risk of microbial contamination and the higher the concentration of the bioactive compounds (Chaillou and Nazareno, 2009; Martínez, 2009). Humidity excess in propolis increases development of some species of mildew and yeasts in the surface, appearing white and greenish layers; also fermentations can be produced generating unwanted products and harmful toxins for health (Jürgens, 2008, Palomino *et al.*, 2010).

In most of the resin samples, the insoluble material exceed the standard limit established by the Ministry of Agriculture of Brazil (1999), since values were higher than

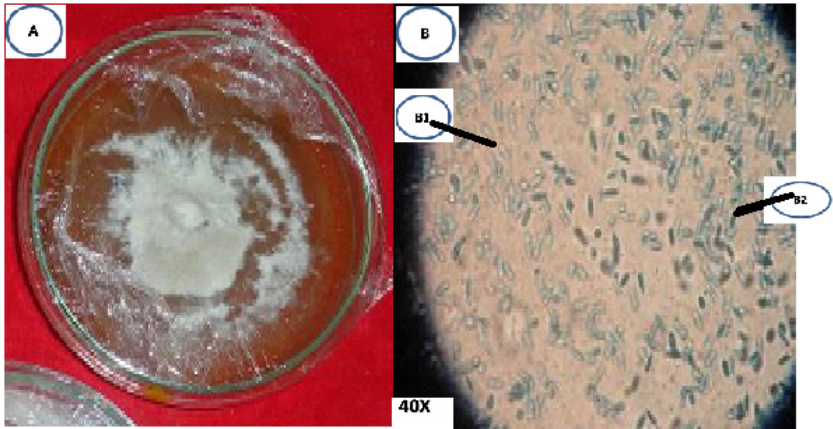


Figura 2. Caracterización morfológica de *Colletotrichum gloeosporoides*. A: Crecimiento macroscópico en medio de cultivo PDA en forma radial, micelio blanco algodonoso y denso. B: Microscópicamente (40X). B1: esporas de forma cilíndrica ahusada y redondeadas hialinas con extremos puntiagudos. B2: esporas con una leve curvatura.

Figure 2. Morphological description of *Colletotrichum gloeosporoides*. A: Macroscopic growth in radial PDA culture medium, cottony and dense white mycelium. B: Microscopic (40X). B1: hyaline spores with cylindrical shape, fusiform and rounded with pointed ends. B2: spores with a slight curvature.

que está asociado con las propiedades terapéuticas del producto y puede indicar la presencia de minerales originados desde sustancias agregadas al propóleo por la abeja, como arcilla y tierra. Los valores obtenidos son similares a los presentados por Agra *et al.* (2006); con porcentajes por debajo de 3,0% para muestras de Paraíba (Brasil) evaluadas en diferentes periodos de colección y Viloría *et al.* (2012) con contenido promedio de 2,0 %, muestras de la región del Bajo Cauca Antioqueño (Colombia); e inferiores a los reportados por Sousa

40%. A high content of waxes in raw samples of propolis is negative because in this fraction there is not phenolic compounds, which are secondary metabolites associated to biological activity (Ministry of Agriculture of Brazil, 1999).

The Ministry of Agriculture of Brazil (1999) establishes a maximum content of 40% of extracts in ether for high quality propolis; the results showed that extracts in ether reached 42.63% in propolis samples from Oripaya, 59.01% in samples from San Cayetano and 65.97% in propolis from

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de propóleos provenientes de apiarios ubicados en las localidades de La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) y El Amparo (Los Patios) del Departamento del Norte de Santander, en el Oriente de la República de Colombia.

Table 1. Physical and chemical properties of propolis from apiaries located at La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) and El Amparo (Los Patios) towns of the Norte de Santander Department, at the East of the Republic of Colombia.

PARAMETRO	ORIPAYA	SAN CAYETANO	LOS PATIOS	REQUISITOS DE CALIDAD INTERNACIONAL
% Cenizas	3.56±0.64 ^a	3.57±0.52 ^a	2.42±0.32 ^b	Max. 5%**
%Humedad	5.11±0.11 ^a	3.49±0.23 ^b	3.86±0.12 ^b	Max. 10%+
%Material Insoluble	80.44±11.45 ^a	32.07±5.32 ^b	68.04±7.89 ^c	Max. 40%**
%Extracto etéreo	42.63±6.30 ^a	59.01±8.56 ^b	65.97±5.69 ^b	Max. 40%**
%Extracto etanólico	18.95±1.01 ^a	56.66±4.85 ^b	51.22±3.45 ^b	Min. 30%**
Índice de Oxidación (s)	49± 1 ^a	41± 1 ^b	19± 1 ^c	22s**.
Punto de Fusión (°C)	80.90±3.21 ^a	95.90±4.89 ^b	65.75±3.56 ^c	--

±Desviación estándar, letras diferentes en filas indican que los valores son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

**Ministerio de Agricultura de Brasil (1999).

+IRAM-INTA (2008). Instituto Argentino de Normalización-Subcomité de productos agroalimentarios.

et al. (2007), cercanos al 10,9% para muestras colectadas en Brasil durante 12 meses.

Los resultados de humedad en esta investigación reportan valores por debajo del 10% que es el valor máximo exigido por la norma vigente (IRAM-INTA, 2008), siendo el propóleo de la localidad de Oripaya el de mayor contenido (5,11%) y el de menor contenido (3,49%) San Cayetano. Este parámetro es importante en la caracterización del propóleo ya que el contenido de esta evidenció la estabilidad microbiológica de la resina,

Los Patios, this one being the highest value. The percentage of extracts in ether is an index of the wax content in the sample, affecting propolis quality (yield of bioactive compounds); high waxes concentration is not desirable because of these one do not allow biological activity and diminish the propolis purity (Arrate, 2008; Martínez, 2009). Sampling period or troubles in product manipulation by the beekeeper, who eventually mixes the propolis with wax from the hive during the harvest, could be explain the high waxes contents in propolis evaluated.

pues a menor porcentaje, menor es el riesgo de contaminación microbiana y mayor es la concentración de los compuestos bioactivos (Chaillou y Nazareno, 2009; Martínez, 2009). La humedad excesiva en el propóleo favorece el desarrollo de algunas especies de mohos y levaduras en la superficie del mismo, lo que se manifiesta por la presencia de capas blancas y verdosas; además de que se pueden producir fermentaciones que a su vez generan productos no deseados, se pueden generar toxinas perjudiciales para la salud (Jürgens, 2008; Palomino *et al.*, 2010).

El contenido de material insoluble en una muestra de resina en la mayoría de las muestras superó el límite establecido por la norma del Ministerio de Agricultura de Brasil (1999), que acepta un valor máximo de 40%. Un alto contenido de ceras, en muestras de propóleos crudo, es desfavorable porque en esta fracción no se encuentran presentes los compuestos fenólicos, que son los metabolitos secundarios a los cuales se asocia la actividad biológica (Ministerio de Agricultura de Brasil, 1999).

Los extractos en éter, el Ministerio de Agricultura de Brasil, 1999 establece un 40% máximo para propóleo de buena calidad, los resultados obtenidos son todos superiores, 42,63% para la localidad de Oripaya, 59,01% para San Cayetano y 65,97% para los Patios siendo este el más elevado. El porcentaje de extracto etéreo es un indicativo de la cantidad de cera que hay en la muestra, desde el punto de vista de calidad (rendimiento

The average of the waxes content in the propolis obtained by scraping was 55.87%; frequently, an increase in waxes concentration could be associated with a low quality of the dye, because of the substances obtained in this fraction are non-polar compounds without biological activity; however, several studies (Custodio *et al.*, 2003; Palomino *et al.*, 2010; Meneses *et al.*, 2009) have reported bioactive compounds in this fraction, especially triterpene alcohols, including α -amyrin, β -amyrin, lupeol and their respective acetates with antimicrobial properties (Custodio *et al.*, 2003). Particularly, it has been reported lipophilic compounds in some propolis from Colombia (Palomino *et al.*, 2010, Meneses *et al.*, 2009); it is possible that propolis from Norte de Santander presents similarities in the chemical profile with propolis from other regions, such as Antioquia, which propolis present aliphatic compounds prevalence, probably triterpene (Lozina *et al.*, 2010, Vilorio *et al.*, 2012).

The average wax content observed in this study is similar to those presented by Palomino *et al.* (2010) and Chaillou *et al.* (2004), who reported values of 72.34% and 30.04%, respectively, when they used n-hexane as a solvent for the extraction of waxes. Also, Agra *et al.* (2006) reported percentages between 8.5 and 23.0% for propolis harvested in summer; The authors indicated that the high wax content in the summer season was due to the scarcity of resin sources and the increase in wax production by bees in that period. Similarly, sampling of

de compuestos bioactivos) un alto contenido de ceras no es favorable porque éstas no presentan actividad biológica y resta pureza al propóleo (Arrate, 2008; Martínez, 2009); este resultado puede ser debido la época del año en que se recolectó el propóleo o de una mala manipulación del producto por parte del apicultor, quien eventualmente mezcla el propóleo con cera de la colmena durante la recolección.

La media del porcentaje de ceras en el propóleo extraído mediante raspado (55,87%), usualmente, un aumento del contenido de ceras podría ser asociado a una baja calidad de la tintura, debido a que las sustancias que se obtienen en esta fracción corresponden a compuestos de naturaleza no polar, a los cuales no se les ha atribuido una actividad biológica; sin embargo, diversos estudios (Custodio *et al.*, 2003; Palomino *et al.*, 2010; Meneses *et al.*, 2009) han reportado la presencia de compuestos bioactivos en esta fracción, especialmente alcoholes triterpénicos, incluyendo α -amirina, β -amirina, lupeol y sus respectivos acetatos; a los cuales se ha asociado propiedades antimicrobianas (Custodio *et al.*, 2003). Particularmente en algunos propóleos caracterizados en Colombia, se ha reportado la presencia de compuestos de esta naturaleza lipofílica (Palomino *et al.*, 2010; Meneses *et al.*, 2009). Es posible que el propóleo del Norte de Santander presente similitudes en el perfil químico con los propóleos de otras regiones como Antiquia en los que predominan compuestos alifáticos, probablemente tipo triterpenos (Lozina *et al.*, 2010; Viloría *et al.*,

propolis for this study was also done in summer causing high wax contents.

The soluble resins in ethanol is another important feature affecting quality of the propolis, because of it is an index of the performance of bioactive compounds (phenols, flavonoids and terpenes) soluble in ethanol (Chaillou and Nazareno, 2009). In this way, the higher the value of this fraction, the higher the propolis quality (Palomino *et al.*, 2009). The Ministry of Agriculture of Brazil (1999) establishes a minimum concentration of 30% for soluble resins in ethanol. In this study, only the propolis from Oripaya had a value below established standard with 18.95%, while the propolis from San Cayetano and Los Patios showed the highest values with 56.66% and 51.22%, respectively. However, a low percentage of the ethanol extract is not an indication that biological activity is low, since this parameter does not refer to the chemical composition of the extract (Martínez, 2009). In this way, the propolis from San Cayetano and Los Patios are conform to international standards. It is likely that the low content of soluble resins in ethanol observed in propolis from Oripaya could be associated with the collection method, since during scraping, propolis is mixed with wax and impurities.

Studies conducted by Viloría *et al.* (2012) observed lower content of soluble resins in ethanol than in this investigation, reporting an average of 16.85% for samples from Bajo Cauca region of Antioquia (Colombia). In the other hand, Cunha *et al.* (2004)

2012).

El promedio del contenido de ceras obtenido en este estudio, es similar a los presentados por Palomino *et al.* (2010) y Chaillou *et al.* (2004), quienes reportaron valores de 72,34% y 30,04%, respectivamente, cuando emplearon el solvente n-hexano para la extracción de ceras. Asimismo, Agra *et al.* (2006) reportaron porcentajes entre el 8,5 - 23,0% para las cosechadas en época de verano; los autores indicaron que el alto contenido de ceras en las época de verano se dio por la escasez de fuentes de resinas y las abejas aumentaron la producción de ceras en el propóleo colectado en ese periodo. En concordancia con estos resultados, en el presente estudio las ceras se colectaron en verano.

El contenido de resina soluble en etanol es otra característica importante en la calidad del propóleo por que relaciona el rendimiento de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides y terpenos) los cuales son solubles en este alcohol (Chaillou y Nazareno, 2009). De esta manera cuanto mayor sea el valor de esta fracción, mayor será la calidad el propóleo (Palomino *et al.*, 2009). El Ministerio de Agricultura de Brasil (1999) establece un mínimo del 30%, en los resultados obtenidos, sólo el propóleo de Oripaya está por debajo del contenido mínimo establecido con un 18,95% en tanto que San Cayetano y Los Patios tienen los valores más altos 56,66% y 51,22% respectivamente; sin embargo, un bajo porcentaje de extracto etanólico no es un indicativo de que la actividad biológica sea baja, ya que este parámetro no hace

found similar values to this research, indicating content of soluble resins in ethanol of 57.6% for samples from the Southeast region of Brazil. The high content of resins is probably associated to low content in resins and balsams from plants species surrounding the hives (Chaillou *et al.*, 2004).

The oxidation index is a parameter to measure phenolic compounds, which exerting biological activity against the microorganisms; the higher the concentration of these compounds in a sample, smaller is the time of discoloration of permanganate and the better is the propolis quality (Martínez *et al.*, 2012).

Only the propolis from Los Patios had a oxidation index value of 19s, which is in according to standards established by the Ministry of Agriculture of Brazil (1999) to define identity and quality of propolis, with a maximum value of 22s; propolis at the others localities showed indexes of 49 and 41. These results indicated that the propolis from Los Patios has a higher content of phenolic compounds, while propolis from Oripaya and San Cayetano probably had a higher content of non-phenolic unsaturated acids and unsaturated fatty acids with open chain (waxes), coming from the bee metabolism (Maidana, 2000). These values (49s and 41s) are similar to those presented in other propolis from the Colombian municipalities of Cerinza, Santa Rosa and Belén (Boyacá) and Tame (Arauca) (Salamanca *et al.*, 2007).

From information above, it could be deduced that the evaluated

referencia a la composición química del extracto (Martínez, 2009). De este modo los propóleos de San Cayetano y Los Patios son los que cumplen con la normatividad. Es probable que el bajo contenido de extractables en etanol en la resina de Oripaya este asociado al método de recolección, ya que, durante el raspado, el propóleo se mezcla con cera e impurezas mecánicas inherentes al proceso.

Estudios realizados por Vilorio *et al.* (2012) presentan porcentajes de resinas inferiores con contenido promedio de 16,85% para muestras de la región del Bajo Cauca Antioqueño (Colombia) y muy similares a los reportados por Cunha *et al.* (2004), quienes indicaron valores del 57,6% para muestras colectadas en la región Sureste de Brasil. El alto contenido de resinas, probablemente se encuentre asociado a que las especies vegetales circundantes a la colmena no son abundantes en resinas y bálsamos (Chaillou *et al.*, 2004).

El índice de oxidación es un parámetro que evidencia o no la presencia de compuestos fenólicos, los principales encargados de ejercer actividad biológica contra microorganismos, cuanto mayor es la concentración de estos compuestos en una muestra menor es el tiempo de decoloración del permanganato y mejor es la calidad del propóleo (Martínez *et al.*, 2012).

De las tres muestras solo el propóleo de los Patios tiene un índice de oxidación de 19s fue inferior al valor máximo establecido para la fijación de identidad y calidad de propóleos del Ministerio de Agricultura de

propolis presents a good quantity of oxidizable compounds. The higher the concentration of this type of compound, the shorter the discoloration time and therefore better product quality (Palomino *et al.*, 2010).

In spite of the fact that propolis has a low percentage of substances that can be extracted with ethanol, it presents a rapid discoloration of the permanganate solution, indicating that possibly phenolic compounds are present or compounds with oxidizable functional groups (hydroxyls, instaurations among others), which can exhibit biological activity (Palomino *et al.*, 2010).

The melting point is related to the content of waxes and the texture of the raw material, propolis with low melting points have a more malleable texture than those with high values (Martínez, 2009). The melting temperatures for each resin type were within the range of 60 to 100 °C like cited in the literature (Chaillou *et al.*, 2004).

The results of the UV absorption spectrum analysis can be observed in figure 3; propolis frequently absorbs UV light in the range of 270 to 350 nm, indicating an important presence of flavonoids with a significant biological value (Yoong, 2004).

Likewise, the maximum absorption peak was observed at 310 nm for all the samples analyzed (figure 3), indicating all the propolis evaluated have phenols and flavonoids with a comparable composition, probably because the flora at the three localities is very similar. In addition, samples from San Cayetano and Los Patios presented equivalent

Brasil (1999) de 22s; los otros tienen índices de 49 y 41s lo cual indicó que el propóleo de los Patios es el que tiene un mayor contenido de compuestos fenólicos, probablemente el resultado para Oripaya y San Cayetano se debe a que hay un mayor contenido de ácidos no fenólicos insaturados, junto con los ácidos grasos insaturados de cadena abierta (ceras), provenientes del metabolismo de la abeja (Maidana, 2000).

Estos valores (49 y 41s) son similares a los presentados en otros propóleos colombianos provenientes de los municipios de Cerinza, Santa Rosa y Belén (Boyacá), y de Tame (Arauca) (Salamanca *et al.*, 2007). A partir de la información referente a este parámetro, se puede deducir que el propóleo evaluado presenta una buena cantidad de compuestos oxidables. A mayor concentración de este tipo de compuestos menor tiempo de decoloración y por lo tanto mejor calidad del producto (Palomino *et al.*, 2010).

A pesar de que el propóleo tiene bajo porcentaje de sustancias extractables con etanol éste presenta una rápida decoloración de la solución de permanganato, indicando que posiblemente están presentes compuestos de naturaleza fenólica, o con grupos funcionales oxidables (hidroxilos, insaturaciones entre otras), los cuales pueden exhibir actividad biológica (Palomino *et al.*, 2010).

El punto de fusión está relacionado con el contenido de ceras y con la textura del material crudo, los

absorption profiles with wavelength bands between 290 and 330 nm

2. Determination of the inhibition percentage and the most effective concentration of propolis, against *Colletotrichum gloeosporoides*

The highest inhibition of mycelial growth was observed with PEE at 10% from Oripaya (18.82%), followed by PEE at 20 % from Los Patios with 13.01% of inhibition, as can be seen in figure 4. The PEE from San Cayetano had no effect on the growth of the fungus, since the antibiotic discs were covered by the mycelium of *Colletotrichum gloeosporoides*.

The different biological activities observed in this work, in comparison with other propolis, are probably due to variability in the chemical composition of the samples, depending on their geographical and botanical origin (Bankova *et al.*, 2000), suggesting that PEE may present other classes of chemical compounds responsible for this activity.

The antimicrobial activity of propolis is closely related to its chemical composition (Aga *et al.*, 1994), being attributed to the presence of flavonoids, phenolic acids and esters, as well as phenolic aldehydes and ketones (Marcucci, 1996; Castaldo and Capasso, 2002; Martínez *et al.*, 2012), through inhibition of the enzyme RNA polymerase (Bosio *et al.*, 2000) or the activity on the cell wall chemical structure (Marcucci *et al.*, 2001).

Similar results were obtained by Palomino *et al.* (2010) who observed greater inhibition of the *C. acutatum* mycelial growth higher than 34%

propóleos con puntos de fusión bajo tienen textura más maleable que los que tiene valores altos (Martínez, 2009). Las temperaturas de fusión para cada tipo de resina se encuentran dentro de los rangos encontrados en la bibliografía, entre 60 y 100 °C (Chaillou *et al.*, 2004).

Los resultados del análisis de espectro de absorción UV en esta investigación se pueden observar en la figura 3, el propóleo absorbe frecuentemente la luz UV en el rango de 270 a 350 nm y esto indicó una presencia importante de flavonoides de significativo valor biológico (Yoong, 2004).

Asimismo, en la figura 3 se ilustra que el pico máximo de absorción fue a los 310 nm para todas las muestras analizadas, infiriendo que todos los propóleos evaluados tienen una composición de fenoles y flavonoides similar, probablemente debido a que la flora de las tres localidades de muestreo es muy similar. Además, las muestras de la localidad de San Cayetano y Los Patios registran perfiles de absorción semejantes con bandas de longitud de onda amplia entre los 290 y 330 nm.

2. Determinación de los porcentajes de inhibición y la concentración más efectiva de los extractos de propóleo de cada localidad, frente a *Colletotrichum gloeosporoides*

La mayor inhibición del crecimiento micelial del hongo se observó con el EEP al 10% de la localidad de Oripaya (18,82%), seguida del EEP de los Patios (20%) con el 13,01% como se puede observar en la figura 4. El EEP de la localidad de San Cayetano no presentó efecto frente al crecimiento del hongo, los sensidiscos fueron cubiertos por el micelio de *C. gloeosporoides*.

for the concentrations of 500 and 1000 mg·L⁻¹ of the propolis extract, after 4 days of incubation; in these same conditions, mycelial growth was reduced for the species *C. gloeosporoides* and *Penicillium* spp. between 20 and 30%.

Results reported by González *et al.* (2016) who claim that the extract prepared at 10% is effective to inhibit *C. gloeosporoides* causal agent of anthracnose in cultivated plants (*Syngonium podofilium*, *Aglaonema* spp. *Anthurium* spp.). Chaillou *et al.* (2004) verified antibacterial activity of propolis at 10% against *Staphylococcus aureus*.

The PEE from Oripaya, San Cayetano and Los Patios presented higher concentrations of bioactive compounds such as: Triterpene alcohols, including α -amyrin, β -amyrin, lupeol and their respective acetates, to which antimicrobial properties are associated (Custodio *et al.*, 2003, Vilorio *et al.*, 2012).

Conclusions

The propolis ethanol extracts from Oripaya, San Cayetano and Los Patios (Norte de Santander, Colombia) were described through their physical and chemical properties, being within the values established in international standards, except for the content of waxes and ethereal extract.

The PEE showed antifungal capacity against anthracnose in tree-tomato crop, being the most effective extract at low concentrations (10%). The highest extract concentration (30%) extracts did not show inhibition against *C. gloeosporoides* in the three localities.

This research represents an important contribution to the local apiculture, through the physical and

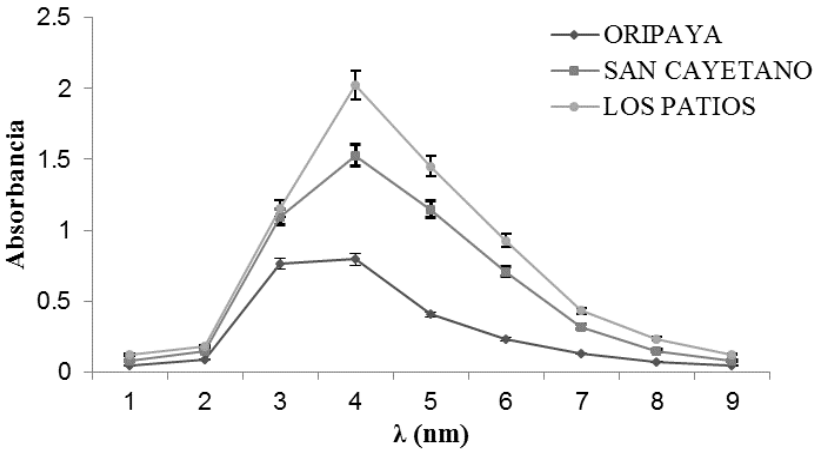


Figura 3. Espectros de absorción UV de los extractos de propóleo provenientes de apiarios ubicados en las localidades de La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) y El Amparo (Los Patios) del Departamento del Norte de Santander, en el Oriente de la República de Colombia.

Figure 3. Spectra of UV absorption of propolis extracts from apiaries located at La Taparita (Oripaya), Santa Ana (San Cayetano) and El Amparo (Los Patios) towns of the Norte de Santander Departement, at the East of the Republic of Colombia.

Las diferentes actividades biológicas observadas en este trabajo, en comparación con otros propóleos, probablemente se deban a variabilidad en la composición química de las muestras, en función de su origen geográfico y botánico (Bankova *et al.*, 2000), sugiriendo que los EEP evaluados pueden presentar otras clases de compuestos químicos responsables por la actividad demostrada.

La actividad antimicrobiana del propóleo está íntimamente relacionada a los compuestos químicos que lo constituyen (Aga *et al.*, 1994), siendo atribuida a la presencia de

chemical parameters and biological activity description of the propolis obtained from different areas of Norte de Santander, Colombia, suggesting a new use for this products in the agro-productive local chain, using prime matter generated *in situ*.

It is recommended to expand the population and sample of the study, as well as to improve the extraction technique of propolis. Also, evaluate its antifungal capacity of propolis in other crops and diseases of local and national importance.

End of English version

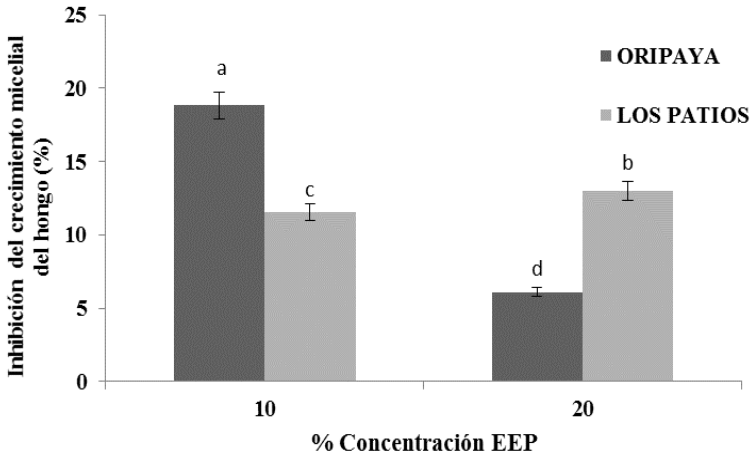


Figura 4. Efecto de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) provenientes de apiarios ubicados en las localidades de La Taparita (Oripaya) y El Amparo (Los Patios) del Departamento del Norte de Santander, en el Oriente de la República de Colombia, en sus dos concentraciones 10 y 20% frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Figure 4. Effect of two concentrations of propolis ethanol extracts (PEE) against *Colletotrichum gloeosporioides*.

flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, así como aldehídos fenólicos y cetonas (Marcucci, 1996; Castaldo y Capasso, 2002; Martínez *et al.*, 2012), a través de inhibición de la enzima RNA polimerasa (Bosio *et al.*, 2000) o actividad sobre la estructura química de la pared celular (Marcucci *et al.*, 2001).

Resultados similares obtuvo Palomino *et al.* (2010) quienes observaron mayor inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *C. acutatum* superior al 34% para las concentraciones de 500 y 1000 mg L⁻¹ del extracto de propóleo, luego de 4 días de incubación; en estas

mismas condiciones, el crecimiento micelial fue reducido para las especies *C. gloeosporioides* y *Penicillium* spp. entre 20 y 30 %.

Resultados reportado por González *et al.* (2016) quienes afirman que el extracto preparado al 10% es efectivo para inhibir a *C. gloeosporioides* agente causal de antracnosis en plantas cultivadas (*Syngonium podofilium*, *Aglaonema* spp. *Anthurium* spp.). Chaillou *et al.* (2004) verificaron actividad antibacteriana del propóleo a 10% contra *Staphylococcus aureus*.

Los EEP de las localidades de Oripaya, San Cayetano y Los Patios, tienen mayores concentración de

compuestos bioactivos como: alcoholes triterpénicos, incluyendo α -amirina, β -amirina, lupeol y sus respectivos acetatos; a los cuales se les asocia propiedades antimicrobianas (Custodio *et al.*, 2003; Vilorio *et al.*, 2012).

Conclusiones

Los extractos etanólicos de propóleo proveniente las localidades de Oripaya, San Cayetano y Los Patios (Norte de Santander, Colombia), fueron caracterizados a través de sus propiedades físico-químicas, encontrándose dentro de los valores establecidos en normas internacionales, a excepción del contenido de ceras y el extracto etéreo.

Con relación a la capacidad antifúngica de los EEP ante el agente causal de antracnosis en tomate de árbol, se concluyó que si la tiene, siendo el extracto más efectivo a bajas concentraciones (10%). Los extractos de las tres localidades no registraron inhibición frente a *C. gloeosporoides* en la mayor concentración evaluada (30%).

Esta investigación representa un aporte importante a la cadena apícola local, mediante la caracterización desde el punto de vista físico-químico y de actividad biológica del propóleo proveniente de las diferentes zonas del Norte de Santander, Colombia, sugiriendo un nuevo uso para sus productos en la cadena agroproductiva local, con insumos generados en la zona en temas de relevancia como lo representa la sanidad de los cultivos, a través de la generación de bioinsumos *in situ*.

Se recomienda ampliar la población y muestra del estudio, así como mejorar la técnica de extracción del propóleo. Asimismo, evaluar su capacidad antifúngica de propóleo en otros cultivos y enfermedades de importancia local y nacional.

Literatura citada

- Aga, H., T. Shibuya, T. Sugimoto, M. Kurimoto y S. Nakajima. 1994. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. and Biochem.* 58(5): 945-946.
- Agra, R., E. Rodrigues, M. Marcucci, A. Ramalho, N. Domingues y W. Esfrain. 2006. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural.* 36: 1842-1848.
- Agrios, N. 2008. *Fitopatología.* 2ª Edición. Editorial Limusa. México. 277-340 p.
- Alzate, D. Rojas, E. Mosquera, J. y Ramón J. 2015. Cambio climático y variabilidad climática para el periodo 1981-2010 en las cuencas de los ríos Zulia y Pamplonita, Norte de Santander-Colombia. *Revista Luna Azul.* 40:127-153.
- Arrate, L. 2008. Propoleo, el "antibiótico" natural de la colmena. *Sustrai: Revista Agropesquera.* 85: 56-61.
- Ávila, E. 2015. Manual de manejo de cosecha y pos cosecha del tomate de árbol. Cámara de Comercio. Bogotá. 1-50.
- Bankova, V. S., S. L. de Castro y M. C. Marcucci. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31(1): 3-15.
- Cámara de Comercio de Bogotá (CCB). 2014. Especial de gulupa, tomate de árbol y lulo. Disponible: <http://ccb.org.co/contenido/contenido.aspx?catID=944&conID=14464>.
- Cárdenas, O., E. Silva, L. Morales y J. Ortiz. 2005. Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas

- organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica*. 25(2):170-180.
- Castaldo, S. y F. Capasso. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73(1):S1-S6.
- Chacin, C., M. Blanco y S. Sánchez. 2013. Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de *Colletotrichum* sp. agente causal de antracnosis en el cultivo de tomate de árbol. *Innovaciencia*. 1(1): 30-35.
- Chaillou, L., H. A. Herrera y J. Maidana. 2004. Estudio del propóleo de Santiago del Estero, Argentina. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 24(1): 11-15.
- Chaillou, L. y M. Nazareno. 2009. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina related to their chemical composition. *LWT. Cien. Tecnol. Aliment*. 42(8):1422-1427.
- Cunha, I., A. Saway, F. Caetano, M. Shimizu, M. Marcucci, F. Drezza, G. Povia, y P. Carvalho. 2004. Factors that Influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem. Soc*. 15(6): 964-970.
- Custodio, A., M. Ferreirab, G. Negri y A. Salatino. 2003. Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. *J. Braz. Chem. Soc*. 14(3): 354-357.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). 2014. Antracnosis, importancia y manejo integrado del cultivo de tomate de árbol (Cyphomandrabaceae) prevención, la mejor alternativa. *Boletín Núm. 19. Colombia*. p. 1-5.
- Fantke, P. y R. Juraske. 2013. Variability of pesticide dissipation half-lives in plants. *Environ. Sci. Technol*. 47(8): 3548-3562.
- González, S. I., O. L. Báez, S. E. Zaragoza y A.W. Villarreal. 2016. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*. 7(8): 1879-1891.
- RAM-INTA. 2008. Instituto Argentino de Normalización-Subcomité de Productos Agroalimentarios del NOA. Norma 15935-1 Scheme 1. Buenos Aires, Argentina.
- Jürgens, C. 2008. Factores que influyen en la producción y almacenamiento del propóleo. En: *Vida Apícola*, Disponible: <http://www.vidaapicola.com/tecnicamanejo/almacenado.html>.5p.
- Kumazawa, S., T. Hamasaka y T. Nakayama, 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. 84: 329-339.
- Lozina, L., M. Peichoto, O. Acosta y G. Granero. 2010. Estandarización y caracterización organoléptica y fisicoquímica de 15 propóleos argentinos. *Lat. Am. J. Pharm*. 29: 102-110.
- Maidana, F. 2000. Influencia de los compuestos fenólicos del propóleo sobre el índice de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Tucumán. Argentina. 180 p.
- Manrique, A. 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. *Zoot. Trop*. 24(1): 43-53.
- Marcucci M. C. 1996. Propiedades biológicas e terapéuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim. Nova*. 19(5):529-535.
- Marcucci, M. C., F. Ferreres, C. Garcia-Viguera, V. S. Bankova, S. L. De Castro, A. P. Dantas. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol*. 74(2): 105-112.
- Martínez, J. 2009. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad anti fúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Colombia. p. 49-81.
- Martínez, J., C. Garcia, R. Durango y J. Gil. 2012. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *J. MVZ Córdoba*. 17(1): 2861-2869.

- Meneses, E. A., D. Durango y C. M. García. 2009. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. *Quím. Nova.* 32: 2011-2017.
- Ministerio de Agricultura de Brasil. 1999. Reglamento técnico para fijar la identidad y calidad de propóleos. *J. Men. Doc.* 52: 10 p.
- Mondino, P. 2008. Manejo integrado de las principales enfermedades del duraznero. Curso de protección vegetal frutícola. Uruguay. p. 5-14.
- Norma Rusa (RST-RSFSR-317-77). 1997. Propóleos. Métodos analíticos para el control de calidad. 15 p.
- Palomino, L., J. Martínez, C. García, J. Gil y D. Durango. 2010. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev. Fac. Agric. Medellín.* 63(1): 5373- 5383.
- Palomino, L., C. García, J. Gil, B. Rojano y D. Durango. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae.* 16(3):388-395.
- Parra, L. 2008. Relación entre infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango *Magnifera indica* variedad hilacha. Trabajo de grado. Facultad Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 112 p.
- Pineda, J., J. Principal, C. Barrios, D. Milla, Y. Solano y E. Gil. 2010. Propiedad fungistática *in vitro* de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Zoot. Trop.* 28(1): 83-91.
- Popova, M., V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A. G. Sabatini, G. L. Marazzan y S. Bogdanov. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.* 15: 235-240.
- Popova, M., S. Silici, O. Kaftanoglu y V. Bankova. 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine.* 12: 221-228.
- Russo, A., V. Cardile, F. Sánchez, N. Troncoso, A. Vanella y J. A. Garbarino. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci.* 76: 545-558.
- Salamanca, G., I. L. Correa y J. Principal. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zoot. Trop.* 25(2): 95-102.
- Saldarriaga, A., J. Bernal y M. Tamayo. 1997. Enfermedades del cultivo del tomate de árbol en Antioquia: Guía de reconocimiento y control. Centro de Investigación "La Selva" Rio Negro, Antioquia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá. Colombia. p. 6-23.
- Samara-Ortega, N., N. Benítez-Campo y F. A. Cabezas-Fajardo. 2011. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Biotec. Sec. Agrop. Agroind.* 9 (1): 8-16.
- Santamaría, A. 2009. Diagnóstico productivo y comercial de la cadena apícola de los programas para la sustitución de cultivos ilícitos y desarrollo alternativo de acción social y UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito UNODC. Agencia presidencial para la acción social y la cooperación internacional-acción social. Colombia. 138 p.
- Sforzin, J. M. y V. Bankova. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *Phys. Rev.* 133(2): 253-260.
- Sousa, V., M. Driessnack y I. Costa. 2007. Revisión de diseños de investigación resaltantes para enfermería. Parte 1: diseños de investigación cuantitativa. *Rev Lat. Am. Enferm* 15(3): 1-6.
- Toloza, A. 2008. El cultivo de tomate de árbol. Recuperado de <http://www.corpoica.org.co>. Fecha de consulta 31/08/2018.

Toreti, V. C., H. H. Sato, G. M. Pastore y Y. K. Park. 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 13 p.

Uzel, A., K. Sorkun, Ö. Önçag, D. Çogulu, Ö. Gençay y B. Salih. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol. Res.* 160: 189-195.

Viloria, J., J. Gil, D. Durango y C. García. 2012. Caracterización físicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotech. Sec. Agrop. Agroind.* 10: 76-85.

Yoong, A. 2004. Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya. Tesis para optar el grado de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Zamorano. Honduras. 50 p.