

Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de *Quillaja saponaria*, especie endémica de Chile

Antibacterial and antifungic activity of the unifloral honeys of *Quillaja saponaria*, an endemic Chilean species

Montenegro G, F Salas, RC Peña, R Pizarro

Resumen. En mieles monoflorales de la especie chilena *Quillaja saponaria* se detectaron los compuestos fenólicos: ácido cumárico y ácido salicílico, la flavona naringenina y el flavonol kaempferol, utilizando cromatografía líquida de alta resolución. Estos extractos mostraron actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus typhi*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* tipo β , y *Vibrio cholerae*, y actividad antifúngica contra la levadura *Candida albicans*. En el extracto etanólico, adicionalmente, se identificaron algunos compuestos del aroma y de descomposición.

Palabras clave: miel, MIC, *Quillaja flavonoles*, "Manuka", flavonas, ácidos fenólicos, compuestos fenólicos.

Abstract. The detection of phenolics, flavonoids and related compounds by HPLC in extracts of unifloral honey of Quillay (*Quillaja saponaria*) showed phenolic compounds such as caffeic, coumaric and salicylic acids, the flavanone naringenin and the flavonol kaempferol. These extracts showed antibacterial activity against *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus typhi*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* type β , and *Vibrio cholerae*, and antifungal activity against *Candida albicans*. Additionally, some aroma and decomposition compounds were identified in the ethanol extract.

Key words: honey, MIC, *Quillaja saponaria*, "Manuka", flavonols, flavanone, phenolic compounds.

INTRODUCCIÓN

El quillay, *Quillaja saponaria* Molina, es un árbol endémico de Chile, presente entre los 32° Coquimbo y 40° Malleco de latitud sur (IV a IX Región), cuyas flores son muy atractivas para la abeja, *Apis mellifera* L. (Rougier et al., 1993; Ramírez y Montenegro, 2004). Sin embargo, la mayor probabilidad de encontrar mieles monoflorales de quillay está entre las regiones IV y VII (Montenegro et al., 2008). En dicha zona es posible encontrar poliflorales del tipo llamado mixto, con raps *Brassica*, *Rubus ulmifolius* Schott, y *Lotus uliginosus* Schuhr, entre otros (Montenegro et al., 2006).

La miel de quillay ha sido ampliamente estudiada debido, entre otras cualidades, a la presencia de saponinas en su corteza, compuestos con múltiples usos biotecnológicos: espumante para bebidas, nematocida y antifúngico (Montenegro et al., 2001; San Martín y Briones, 1999).

El uso de la miel de abeja se menciona desde civilizaciones antiguas, como un agente antiséptico, en curaciones y heridas. Varios autores atribuyen al peróxido de hidrógeno como el principal agente antimicrobiano (Wahdan, 1998), compuesto que va perdiendo actividad a medida que pasa el tiempo de almacenamiento de las mieles. Secundariamente, se atribuye dicha actividad a características físico-químicas inherentes a las mieles, como son: el alto contenido de azúcar (cerca del 80% w/w) y el pH ácido, entre 3 y 4,5 (Molan, 1992; Bogdanov et al., 1997). Por otra parte, White et al. (1963), atribuyen dicha actividad al ácido glucónico, derivado de la catálisis de la glucosa, cuya concentración varía marcadamente entre tipos de mieles. En las mieles de abeja también existen compuestos de tipo no peroxídicos que generan actividad antibacteriana; estos varían según las especies vegetales en que las abejas pecorean el néctar (Cooper, 2007).

Molan (2006) y Cooper (2007) coinciden en señalar que la desodorización rápida de las heridas es probable que ocurra por la acción antibacteriana de la miel.

El objetivo del presente estudio fue determinar la participación de extractos fenólicos de la miel de quillay en la actividad antibacteriana y antifúngica de ésta, comparativamente con la miel de *Leptospermum scoparium* J.R.Forst. et G. Forst. ("manuka").

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de mieles. Se utilizaron dos muestras de mieles monoflorales de quillay, la primera proveniente del Río Clarillo (Región Metropolitana), y la segunda de la cordillera de la costa de Curicó (VII Región); además, se analizó una miel monofloral de manuka, *Leptospermum scoparium*.

Determinación de fenoles y flavonoides. Para la obtención de los extractos fenólicos se filtró utilizando una resina de intercambio catiónico. Se disolvieron 50 g de miel en un volumen de 200 mililitros de ácido clorhídrico a pH 2, de manera

de llegar a cuantificar la capacidad antioxidante de las mieles. La solución fue eluida a través de la columna de la resina Amberlita XAD-2 (200 mm x 20 mm de diámetro). Posteriormente, la misma fue lavada con un volumen de 150 mililitros de ácido clorhídrico a pH 2, y 300 mililitros de agua destilada, permitiendo que la fracción fenólica quedara retenida en la columna y desechando la fracción enjuagada. Para recuperar los compuestos fenólicos se eluyó la columna con 300 mililitros de metanol (J. T. BAKER®, grado HPLC). Asimismo, el extracto metanólico fue evaporado hasta sequedad a presión reducida (40°C), redisoluto en metanol (2,0 mL) esterilizado por contrapresión en jeringuillas con un filtro de un diámetro de poro de 0,45µm (Orange® CA-PC Scientific, Gyro disc CA-PC).

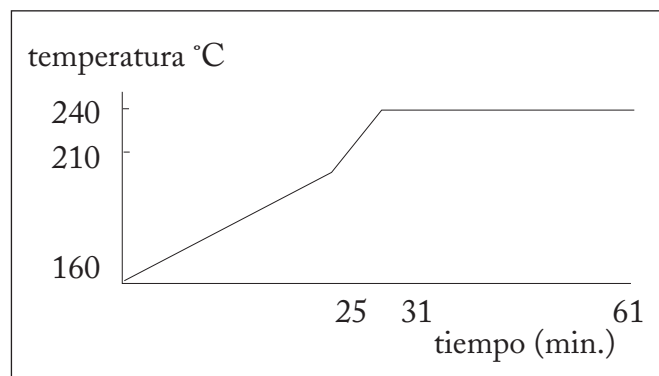
Determinación de los compuestos fenólicos. Se utilizó un equipo Hewlett Packard con columna de fase reversa Agilent (15.0 x 4 cm; tamaño de partículas: 5 µm), con detector de arreglo de diodos para determinar los compuestos fenólicos; los cromatogramas fueron registrados a 319 nm. Para la fase móvil de 20 minutos, se utilizaron dos solventes: A) Agua ácida pH 2.0, y B) acetonitrilo. Se efectuó un sistema de gradiente de elución: 0 a 12 minutos: solvente A a 84% y solvente B a 16%; 12 a 14 minutos: solvente A a 40% y solvente B a 60%; 14 a 20 minutos: solvente A a 84% y solvente B a 16% (Markham et al., 1970). Los diversos flavonoides de la miel se identificaron por comparaciones cromatográficas y sus espectros ultravioletas con respecto a los marcadores auténticos (comerciales o previamente aislados e identificados de mieles). Los flavonoides de la miel fueron cuantificados por la absorbancia de sus picos correspondientes en los cromatogramas. Las flavanonas (pinocembrina y pinobanksina) fueron medidas contra un estándar externo de pinocembrina detectado en 290nm; las flavonas con un anillo sin sustituir B (crisina, galangina y tectocrisina) contra crisina a 340nm, y el resto de los flavonoles y las flavonas (quercetina, kaempferol, 8-metoxikaempferol 8, etc.), contra la quercetina a 340nm. Los compuestos derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y afines) fueron cuantificados como ácido cafeico, y ácido elálgico con marcadores auténticos (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 340nm (Tomás-Barberán et al., 2001).

Determinación de los compuestos volátiles. El análisis GC/MS se efectuó en un cromatógrafo Agilent Technologies de modelos 7890A y 5975C, America, una columna capilar DB-1 (30m x 0.25mm) y se empleó una fase medio polar (Hewlett-Packard-5 *cross-linked* 5% fenil metil silicona). El régimen de temperaturas GC se programó como se muestra en la Fig. 1. Inyector 220°C; Detector 240°C; Columna Temp 0: 160°C; Temp 1: 210°C; Temp 2: 240°C; Tiempo 0: 0 minutos, Tiempo 1: 0 minutos, Tiempo 2: 30 minutos; Δ Temperatura 0→1: 2°C/min, Δ Temperatura 1→

2: 5°C/min. El rango de masas fue de 35 a 335 m/z con voltaje ionizante de 70eV y una corriente de ionización de 150µA. La velocidad de flujo de He fue 1mL/min. Se utilizó el *software* NIST 2005.

Fig. 1. Diagrama de programa de temperatura de la columna del cromatógrafo de gases.

Fig. 1. Plot of temperature programme of the chromatographic column.



SPME- Cromatografía gaseosa. Se vertió en un vial de 10 mL, 0,5 g sulfato de sodio anhidro y 25 µL de un estándar interno (solución de 4-nonanol 3568 mg/mL), por cada 10 g de miel. El vial se agitó durante 30 minutos a 70°C para pre-acondicionamiento. A la misma temperatura se pre-acondicionó durante 20 minutos una carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) dotada de una fibra SPME de 75 µm de diámetro, para luego transferirlo al inyector del GC/MS. Para los análisis cromatográficos, la temperatura tanto del inyector como del detector se mantuvieron a 250°C. A su vez, la columna se conservó a 40°C durante 5 minutos y luego se calentó a razón de 3°C por minuto hasta alcanzar 240°C, la cual se conservó durante 10 minutos (Fig. 1). El flujo de gas (helio) fue de 20 mL/min. Los compuestos se determinaron por cálculo de área de los picos y parcialmente identificados por correlación entre los tiempos de retención.

Actividad antibacteriana. Se utilizaron aislados puros de las bacterias proporcionados por el Instituto de Salud Pública de Chile, como: Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* STH 2370, *Vibrio cholerae* ISP, y bacterias Gram (+): *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pneumoniae* tipo β, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Adicionalmente, se probó la actividad antibacteriana en un aislado de la bacteria fitopatogena Gram (-) *Pectobacterium carotovorum* Jones emend. (Hauben et al., 1998) (sin. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), de la colección de Laboratorio de Patología de Cultivos, Facultad de Agronomía e Ingeniería forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Extracción de mieles para pruebas biológicas. El procedimiento utilizado fue el mismo protocolo descrito anteriormente hasta la concentración de compuestos fenólicos, sólo que el extracto fue disuelto en 2mL agua tridestilada, y además se esterilizó por contrapresión en jeringas, con filtro de un diámetro de poro de 0,45µm (Orange® CA-PC Scientific, Gyro disc CA-PC). Se aseguró la ausencia de microorganismos en el extracto, sembrando en forma de césped, 100µL del extracto en placas de Petri con Agar - Soya tripticasa. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 37°C en cámara de crecimiento.

Determinación de CIM. Para determinar la mínima concentración de extracto, definida como la concentración inhibitoria mínima (CIM) capaz de inhibir el desarrollo bacteriano y fúngico, se utilizó una placa de Elisa de 96 pocillos, con fondo plano, de 8 filas (A-H) y 12 columnas Orange Scientific®, utilizando el método de microdilución (Pontino et al., 2006). En todos los pocillos se colocan 150 µL de caldo de soya tripticasa (BBLTM Trypticase^{MR} Soy Broth); posteriormente, en filas con tratamientos, se colocaron 150 µL de extracto en la primera columna, que se diluyó a mitad de volumen dentro de la misma fila. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de solución bacteriana de 1,5 x 10⁶ ufc/mL en agua destilada equivalente a 75000 unidades formadoras de colonias por pocillo, ajustada con un patrón de unidades de turbidez Mc Farland 0,5 (Biomérieux, Chile) en todos los pocillos. La dilución final del extracto se expresó en µg/mL de solución. Las placas se incubaron en cámara de crecimiento a 37°C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se evaluó crecimiento o no en cada pocillo, observado la turbidez o transparencia de éste.

RESULTADOS

En las muestras analizadas de extractos de miel de quillay, fue posible determinar que ambos extractos inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus* β hemolítico. Estos últimos fueron inhibidos con una menor concentración de extracto. La bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Candida albicans* no fueron inhibidas por los extractos (Tabla 1). La actividad antibacteriana de los extractos de miel de quillay, se pueden explicar por la determinación de compuestos fenólicos por HPLC. En las muestras analizadas de miel de quillay fue posible determinar ácido clorogénico (Fig. 2a), aesculetina, ácido cafeico (Fig. 2b), ácido siringico, rutina, escopoletina, ácido *p*-cumárico (Fig. 2c), ácido vanílico, ácido salicílico (Fig. 2d), quercetina y naringerina. La presencia de los compuestos anteriores, corresponde al primer informe obtenido de miel de *Quillaja*. Los compuestos, ácidos cumárico, ferúlico y salicílico se detectaron también en mieles de ulmo (Montenegro, 2007), encontrados también en mieles de quillay, con lo que hace conjeturar que los compuestos bioactivos antibacteriales son el resultado de un sinergismo entre flavonoides y compuestos fenólicos o entre estos y terpenos (Fontana et al., 2000).

Los compuestos volátiles detectados fueron ácido abscísico (Fig. 2e), 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H piran-4-ona (damasco), 4-hidroxi-3,5,6-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)-2-ciclohexen-1-ona, β -ionona-5,6-epóxido (tipo *trans*), 4-metoxibenzaldehído, 4-hidroxifeniletanol, 2-(4-metoxi-fenil)-etanol (= *p*-metoxifenil alcohol), (E)-4-[(1S,4R,6R)-4-hidroxi-2,2,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-1-il]but-3-en-2-ona o tabanona. Estos compuestos pueden servir de marcadores de la flora acompañante a la miel de Quillay, por ejemplo β ionona es indicador de *Eucryphia* y megastigma, -5, 7, 9-trienona de *Quillaja* respectivamente (Montenegro et al., 2008).

Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria mínima de extractos fenólicos de mieles Chilenas expresadas en mg/mL, y diluciones (%) capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de diferentes especies bacterianas patógenas de humano.

Table 1. MIC values of the phenolic extracts in Chilean honeys expressed as mg/mL, and dilutions able to inhibit the *in vitro* growth of different bacterial species which are pathogens to humans.

Quillaja extractos	M337	M338
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	1,26 (50)	1,35 (50)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,32 (12.5)	0,68 (25)
<i>Escherichia coli</i>	SA	SA
<i>Candida albicans</i>	SA	SA
<i>Salmonella typhi</i>	1,26 (50)	1,35 (50)
<i>Vibrio cholerae</i>	SA	1,35 (50)
<i>Streptococcus</i> Grupo B	1,26 (50)	0,34 (12.5)

SA= sin actividad.

Tabla 2. Compuestos estudiados en mieles Chilenas.

Table 2. Assayed compounds from Chilean honeys.

Compuestos	M337 ¹	M33B	MK
Ácido clorogénico	1,84	1,54	4,85
Aesculetina	2,91	1,45	16,11
Ácido cafeico	4,20	3,23	30,17
Ácido siríngico	0,91	0	0
Rutina	0,04	0	0
Escopoletina	0,08	0,06	0,6
Ácido <i>p</i> cumárico	4,37	2,65	13,53
Ácido vanílico	6,45	0,00	0
Ácido salicílico	6,20	12,91	63,1
Quercitina	0,05	0,03	0,5
Naringenina	0,02	0	0

¹ M337: Clarillo; M338 (Fig. 3): Curico; MK: Manuka honey. Una muestra de 25 mg de miel sin refinar. Concentraciones de compuestos expresados en μ g/mL.

Fig. 2. Estructuras compuestos bioactivos: a) ácido clorogénico, b) ácido cafeico, c) ácido cumárico, d) ácido salicílico, e) Beta ionona, f) ácido abscísico, g) feniletilalcohol, h) tabanona o (E)-4-[(1S,4R,6R)-4-hidroxi-2,2,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-1-il]but-3-en-2-ona.

Fig. 2. Bioactive compounds structures: a) Chlorogenic acid, b) caffeic acid, c) coumaric acid, d) salicylic acid, e) Beta ionone, f) absicic acid, g) phenylethyl alcohol, h) tabanone.

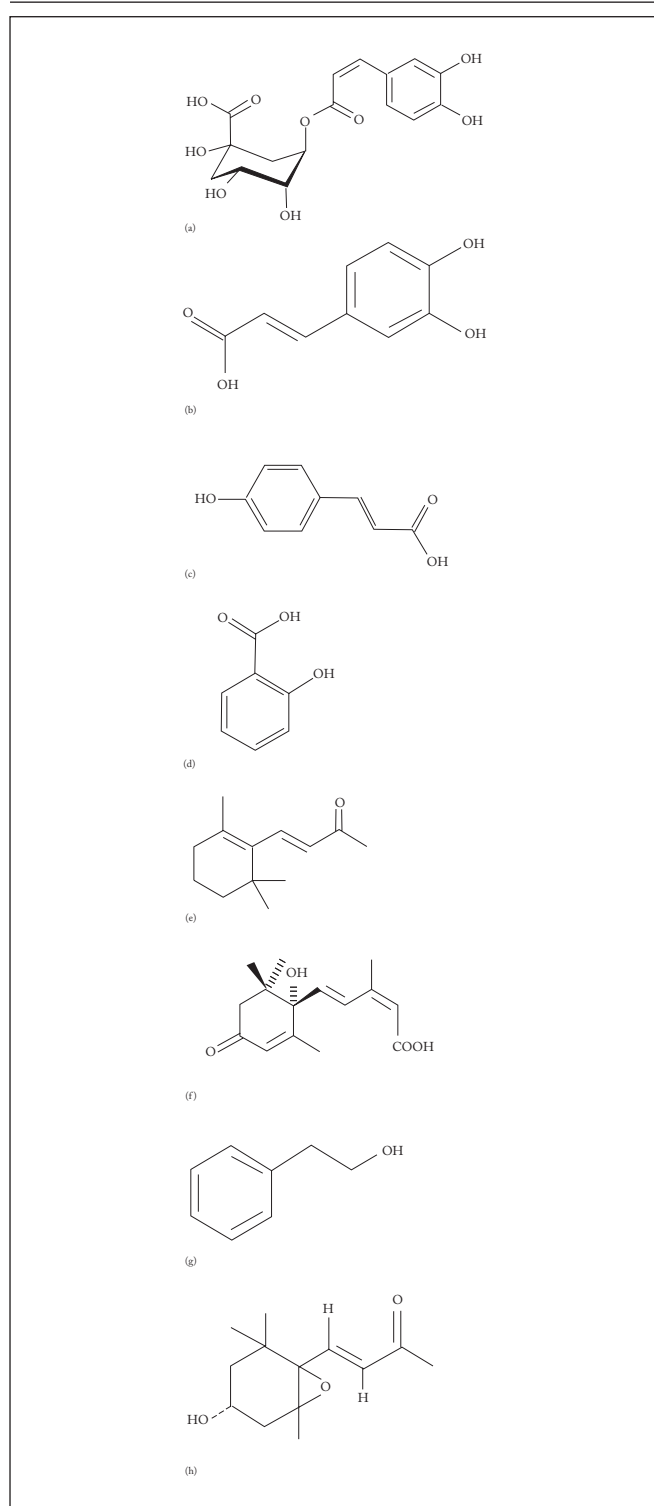
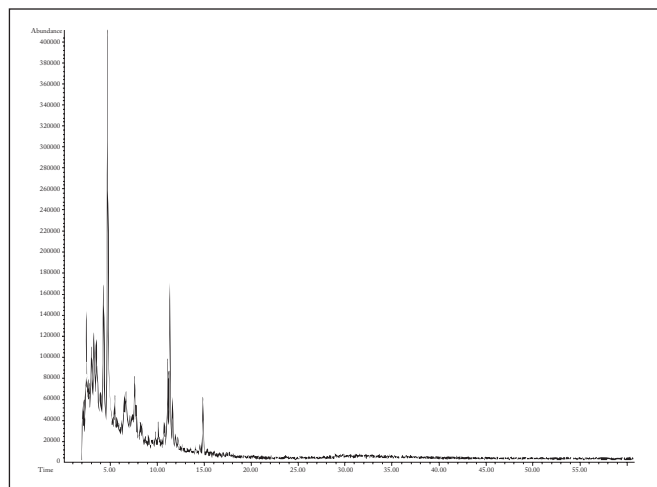


Fig. 3. Cromatograma de compuestos volátiles. Análisis de GC/MS de la muestra de miel 337.

Fig. 3. Chromatogram of the volatile compounds. GC/MS of the honey sample 337.



DISCUSIÓN

Los extractos de miel de quillay tienen una mejor actividad *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β hemolítico, ambas bacterias que afectan a la piel. El desarrollo de las infecciones en las heridas puede llevar a las interrupciones del proceso curativo, costos de tratamiento incrementados en términos de antibióticos, de preparaciones y de tiempo de personal (Cooper et al., 2002). Esto se puede explicar según los compuestos detectados por HPLC. En este estudio se detectaron las cumarinas aesculetina, escopoletina, los ácidos fenólicos ácido sirín-gico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, y los flavonoides rutina, y naringerina. Al respecto, no existe a la fecha literatura que mencione un efecto biológico de estos compuestos. Sin embargo, hay dos peticiones de patentes químicas para los extractos fenólicos de la miel, que contienen los siguientes compuestos: ácido gálico, ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido salicílico y flavonol kaempferol, y flavanona naringenina (Montenegro 2007a, 2008). En el caso de la miel de manuka de este estudio se detectaron el ácido salicílico, ácido cafeico y ácido vanílico como compuestos principales. *Letospermum scoporium* es la fuente de miel, conocida como manuka, muy reputada en el mercado por su actividad antibacteriana atribuida al compuesto siringato metílico, que sería el principio activo de dicho recurso (Inoue et al., 2005; Henriques et al., 2006). Esta miel conserva actividad antimicrobiana por bastante tiempo, atribuida a compuestos de tipo no peroxídicos (Gehldof et al., 2002).

Diversos trabajos científicos, han atribuido propiedades antibacterianas a compuestos fenólicos, un ejemplo es la galanginina, cuyo mecanismo de acción incluye la inhibición de la girasa de DNA de células bacterianas (Cushnie y Lamb, 2005). La galanginina además inhibiría la enzima topoisomerasa IV

(Cushnie y Lamb, 2005); también se ha observado una actividad anti beta lactamasa del mismo compuesto (Denny et al., 2002). La hesperidina es un agente antioxidante (Kelly et al., 2005; Ferreres et al., 1996). Se ha informado recientemente que dimetil cafeato, galangina, quercetina, pinobanksina y pinocembrina son antioxidantes, inclusive en concentraciones inferiores a las muestras examinadas en el presente estudio (Muñoz et al., 2007). Las flavanonas actúan generalmente como fitoalexinas, compuestos que estimulan la respuesta sistémica adquirida de las plantas (SAR), protegiendo a las plantas contra el ataque de microorganismos, de insectos y herbívoros. Un ejemplo es el ácido salicílico, un inductor débil de SAR, en presencia de patógenos (Kawano et al., 2004).

CONCLUSIÓN

Los compuestos aislados no explican efectivamente la actividad microbiológica de la miel. Una interacción de los compuestos flavonoides, terpenos y ácidos fenólicos es la mejor explicación de los resultados microbiológicos. Por su parte los compuestos volátiles detectados podrían servir como marcadores de esta miel, complementando la identificación actual de las mieles (Montenegro et al., 2006) a través de la determinación del origen botánico de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1060535, y CORFO INNOVA 06CN12IAD-01 a Gloria Montenegro.

REFERENCIAS

- Bogdanov, S., C. Peter Martin, R. Lüllmann. y R. Borneck (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. 59 pags.
- Cooper, R.A., P.C. Molan y K.G. Harding (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology* 93: 857-863.
- Cooper, R. (2007). Honey in wound care: antibacterial properties Medizinischer Honig in der Wundbehandlung: antibakterielle Eigenschaften. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2: 1-3.
- Cushnie, T.P.T. y A.J. Lamb (2005a). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356.
- Denny, B.J., P.A. Lambert y P.W. West (2002). The flavonoid galangin inhibits the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* 208: 21-24.
- Ferreres, F., P. Andradre, M.I. Gil y F.A. Thomas Barberán (1996). Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 2002: 40-44.

- Fontana, J.D., M. Passos, M.H.R. dos Santos, C.K. Fontana, B.H. Oliveira y L. Schause (2000). Profiling Propolis Flavonoids by Means of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, Capillary Gas Chromatography, and Bactericidal Action. *Chromatographia* 52: 147-151.
- Gheldof, N., X.H. Wang y N.J. Engeseth (2002). Identification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50: 5870-5877.
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biol. Med.* 13: 435-448.
- Hauben, L., E.R.B. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck y J. Swings (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 384-397.
- Henriques, A., S. Jackson, R. Cooper y N. Burton (2006). Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 773-777.
- Inoue, K., S. Murayama, F. Seshimo, K. Takeba, Y. Yoshimura y H. Nakazawa (2005). Identification of phenolic compounds in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *Journal of Science of Food and Agriculture* 85: 872-878.
- Kawano, T., S. Tanaka, T. Kadono y S. Muto (2004). Salicylic Acid Glucoside Acts as a Slow Inducer of Oxidative Burst in Tobacco Suspension Culture *Z. Naturforsch* 59c: 684-692.
- Kelly, P., D. Santa Spada y M. Salvador (2005). Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of Agriculture and food chemistry* 53: 4757-4761.
- Markham, K. T.J. Mabry y M.B. Thomas (1970). The systematic identification of flavonoid. Springer Verlag.
- Molan, P.C. (1992). The antibacterial activity of honey. *Bee World* 73: 5-28.
- Molan, P.C. (2006). The Evidence Supporting the Use of Honey as a Wound Dressing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 5: 40. <http://ijl.sagepub.com/cgi/reprint/5/1/40>
- Montenegro, G., R.C. Peña y B.N. Timmerman (2001). La corteza de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.), un recurso de la farmacopea internacional. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat.* 25: 420-427.
- Montenegro, G., R. Pizarro, M. Gómez y R.C. Peña (2006). Comentario a la modificación de la norma sobre calidad de mieles chilenas. *Boletín Lawen* 3: 25-55. <http://www.lawen.cl/> recuperado 23 de Octubre de 2008.
- Montenegro, G. (2007a). Natural composition based on Chilean monofloral honey extract from native vegetable species for bacterial infection control in vegetable at all. Patent US 2007/0275087 A1 November 29, 2007 Available at <http://www.freepatentsonline.com/20070275087.pdf> Accessed on 2 June 2008.
- Montenegro, G. (2007b). Natural composition based on Chilean monofloral honey extract from native vegetable species for bacterial infection control in vegetables and flowers. Available at <http://www.freepatentsonline.com/EP1852017.html> EP1852017. Accessed on 2 June 2008.
- Montenegro, G. (2008). Composición natural en base a extracto de mieles monoflorales chilenas provenientes de especies vegetales nativas para el control de infecciones bacterianas en vegetales en general Chilean Patent 000546.2007, leído en Febrero 6, 2008.
- Montenegro, G., M. Gómez, R. Pizarro, G. Casaubon y R.C. Peña (2008). Implementación de un panel sensorial para mieles chilenas. *Ciencia e Investigación Agraria* 35: 51-58.
- Montenegro, G., M. Gómez, J. Díaz-Forestier y R. Pizarro (2008b). Aplicación de la Norma Chilena Oficial de denominación de origen botánico de la miel para la caracterización de la producción apícola. *Ciencia e Investigación Agraria* 35: 181-190.
- Muñoz, O., S. Copaja, H. Speisky, R.C. Peña y G. Montenegro (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova* 39: 848-851.
- Pontino, M.V., B. Di Giulio, C. Fernández, B. Imperiale, A. Bodon y N. Morcillo (2006). Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Argent. Microbiol.* 38: 145-151.
- Ramírez, R. y G. Montenegro (2004). Certificación del Origen Botánico de Miel y Polen Corbicular Pertenecientes a la Comuna de Lituèche, VI Región de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 31: 197-211.
- Rougier, D, B.N. Timmermann, E. Fuentes, L. Yates, F. Bas y G. Pasinato (1993). Relación entre la selectividad de la abeja melífera (*Apis mellifera*) y el contenido de proteína cruda del grano de polen. Diagnóstico en la flora nativa de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 21: 47-52.
- San Martín, R. y R. Briones (1999). Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* saponins. *Economic Botany* 53: 302-311.
- Tomás-Barberán, F.A., I. Martos, F. Ferreres, B.S. Radovic y E. Anklam (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J. Sci. Food Agric* 81: 485-496 <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/76510683/PDFSTART>, accessed on December 23, 2008.
- Wahdan, H.A.L. (1998). Causes of the Antimicrobial Activity of Honey. *Infection* 26: 26-31.
- White, J.W.Jr., M.H. Subers y A.I. Schepartz (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochem. Biophys. Acta* 73: 57-70.