

Efecto de la localización geográfica y el método de recolección en la producción de propóleo crudo de colmenas de *apis mellifera* sobre indicadores de calidad fisicoquímicos y microbiológicos, en la provincia del Sumapaz, Cundinamarca

Diego A. CASTILLO, Fabián J. CHIPATECUA

Universidad de Cundinamarca, Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Programa de Zootecnia, Fusagasugá, Colombia.

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo de tres diferentes métodos de recolección de propóleos crudos de abejas *Apis mellifera* (raspado, malla y colector adaptado) en tres diferentes ubicaciones geográficas en la provincia del Sumapaz Cundinamarca (1427; 1527; 2092 msnm en Fusagasugá y Pasca para el último valor), utilizando un arreglo factorial (3x3). Se evaluó la producción de propóleo, indicadores organolépticos, parámetros de calidad, y la bioactividad in-vitro. Los resultados obtenidos en la producción de propóleo por método de recolección arrojó valores entre 44,1g-600,9g en Guavio, 14,6-319g en Espinalito y 9,6-94,1g en Pasca; organolépticamente los propóleos crudos variaron entre la calidad media a baja; los parámetros fisicoquímicos de calidad como los sólidos solubles totales (SST) estuvieron entre 121 – 61 mg/ml y las muestras obtenidas presentaron concentraciones de fenoles totales entre 58,18-295,29 mg/g (miligramos de ácido gálico GAE/gramo de extracto etanólico de propóleo EEP). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los EEP sobre las bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922y *Salmonella* ATCC 14028 presento rangos entre 0,8 – 0,4 mg/ml.

Palabras clave: Propóleo, *Apis mellifera*, tipificación, Calidad, Bioactividad, Producción.

ABSTRACT

A comparative study of three different methods of collecting raw propolis of the *Apis mellifera* bees (scraping, mesh and an adapted collector) was done in three different geographical locations in the province of Sumapaz, Cundinamarca (1427; 1527; 2092 MAMSL. Fusagasugá and Pasca –last number), using a factorial arrangement (3x3). Propolis production was evaluated: organoleptic indicators, quality parameters, and in-vitro bioactivity. The results in this production of propolis by collection method were values between 44,1g – 600,9g in Guavio, 14,6 – 319g

in Espinalito and 9,6 – 94,1g in Pasca; organoleptically raw propolis ranged from mid to low quality; physiochemical quality parameters as total soluble solids (TSS or SST in Spanish) were between 121-61 mg / ml and the samples obtained showed concentrations of total phenolics between 58,18 - 295,29 mg/g (Milligrams of Gallic acid GAE/g of ethanol extract of propolis EEP). The minimum inhibitory concentration (MIC or CMI in Spanish) of the EPP on Escherichia coli bacteria ATCC 25922 and Salmonella ATCC 14028 present dranges between 0.8 to 0.4 mg / ml.

Keywords: Propolis, Apis mellifera, Categorization, Quality, Bioactivity, Production.

INTRODUCCIÓN

El origen del propóleo es principalmente vegetal, se trata de resinas o gomas viscosas e impermeables al agua que las abejas pecoreadoras van a recolectar en las yemas de los arboles; es utilizado por las abejas que lo recolectan y cubren el interior de su nido con el fin de reforzarlo y mantener la temperatura. Optimizan así la regulación del microclima de la colmena. Además posee una acción antimicrobiana que protege a la colmena de la entrada y desarrollo de patógenos, siendo esta su principal arma en la prevención de enfermedades (Prost, J. P. 2007).

La calidad del propóleo depende en gran medida del método de extracción que se use al momento de cosecharlo. Actualmente se usan varios modelos de extracción, como el raspado convencional, malla plástica y algunos sistemas patentados internacionalmente, sin embargo, en Colombia no existe ningún modelo de extracción estudiado que demuestre ser superior en cuanto a volumen y cantidad, ni tampoco la influencia que tenga el nicho ecológico de producción con respecto a los métodos mencionados.

Entre las diversas investigaciones que se han llevado a cabo sobre sus propiedades, se han realizado pocos informes sobre el uso de esta sustancia en la producción animal (Babińska, et al. 2011). La situación económica actual, como el aprovechamiento integral de la producción apícola, obliga a los productores a extraer de sus colmenas la mayor variedad de productos posibles, entre ellos el propóleo. La composición química de este es compleja, variando según las especies vegetales visitadas por las abejas y de factores climatológicos durante la recolección. Investigaciones científicas comprobaron que los diferentes compuestos fenólicos del propóleo tienen acciones farmacológicas, propiedades terapéuticas y estimulantes del sistema inmunológico entre otras (Lopez *et al.* 2003).

La actividad y espectro antimicrobiano de los propóleos ha sido reconocida y su rango de acción depende de su composición química la cual es influenciada por factores

como: región geográfica de donde son obtenidos, métodos de recolección y cobertura vegetal de donde las abejas obtienen el propóleo (Katircioglu H et al. 2006) siendo el propóleo, una alternativa ante el incremento de bacterias patógenas resistentes en la producción animal, resultado del uso desmedido de antibióticos promotores de crecimiento, lo cual evita, un problema de salud pública a largo plazo (Attia et al. 2014).

El propósito del presente trabajo fue evaluar la producción de propóleo en tres (3) diferentes zonas geográficas y tres (3) diferentes métodos de producción y posteriormente evaluarlo fisicoquímicamente y microbiológicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se desarrolló en tres apiarios, dos ubicados en las veredas del sur del municipio de Fusagasugá y un apiario ubicado en el municipio de Pasca, provincia del Sumapaz del departamento de Cundinamarca. Los tres apiarios se encuentran ubicados en diferentes altitudes: Guavio 1527 msnm, Espinalito 1427 msnm y Guchipas 2092 msnm. Se empleó el Laboratorio de Investigaciones en Abejas Tropicales (LABINAT) ubicado en la granja agropecuaria de la Universidad de Cundinamarca y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Se realizó la investigación con abejas pertenecientes a la especie *Apis mellifera* híbrido africanizado. Los apiarios tienen una inclinación productiva y pedagógica, con

aproximadamente 15 colmenas cada uno, con enfoque de producción de polen los ubicados en Pasca y de miel los ubicados en Fusagasugá. Las colmenas dentro de la investigación fueron dedicadas exclusivamente a la recolección de propóleo y visitadas cada 20 días durante 3 meses, con el fin de hacer la recolección de propóleo y la alimentación suplementaria. Durante el mismo tiempo se realizó la alimentación artificial con jarabe compuesto de agua y azúcar en una proporción 1:1, suministrando a cada colmena 3 litros de la solución en cada visita. Se supervisó la presencia de hormigas u otros insectos para mantener un control adecuado con el fin de evitar alteraciones en los resultados finales. Se realizó un seguimiento de la condición de la colmena, como referente de fortaleza o vigorosidad. En cada apiario se homogenizaron las colmenas teniendo en cuenta su biomasa y el número de alzas, posteriormente se seleccionaron al azar 9 colmenas por apiario que fueron adecuadas dependiendo el método de recolección; 3 colmenas con malla plástica; 3 colmenas con colector adaptado de propóleo; 3 con el método tradicional de raspado. Se usaron un total de 27 colmenas en todo el trabajo de investigación.

Diseño experimental

El diseño empleado correspondió a un diseño completamente al azar con arreglo factorial tres por tres (3x3): tres localizaciones geográficas, con tres métodos de recolección de propóleos. Se realizaron tres replicas por tratamiento y se tomó como unidad experimental la colmena. El

modelo matemático que se empleó es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \lambda_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\lambda)_{ik} + (\beta\lambda)_{jk} + (\alpha\beta\lambda)_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variables respuesta evaluadas en el experimento.

μ = media poblacional.

α = Efecto de la zona 1, 2 y 3.

β = Efecto de la altura 1, 2 y 3.

λ = Efecto del método de recolección 1, 2 y 3.

$\alpha\beta$ = Efecto de la interacción de la zona y la altura.

$\alpha\lambda$ = Efecto de la interacción de la zona y el método de recolección de propóleos.

$\beta\lambda$ = Efecto de la interacción de la altura y el método de recolección de propóleos.

$\alpha\beta\lambda$ = Efecto de la interacción de la zona, la altura y el método de recolección de propóleos.

Las variables evaluadas en el experimento fueron de tres tipos: productivas, fisicoquímicas del propóleo y microbiológicas del propóleo.

Producción de propóleos

Se realizó una visita cada 20 días a cada apiario, colectando el propóleo de acuerdo a cada método de recolección. Las colmenas fueron manejadas con el modelo de producción de propóleo verde brasilero, en donde son únicamente alimentadas artificialmente con solución compuesta por agua y azúcar en proporción 1:1 y no se destinan a la obtención de ningún otro producto de la colmena (Miel, polen, etc.).

Evaluación organoléptica

Según la Tipificación de Calidad CEDIA para propóleos en bruto (Maidana *et al*, 2011) la evaluación organoléptica se realizó teniendo en cuenta una apreciación subjetiva, en la cual se midieron parámetros como presentación, aspecto, color, olor y sabor. La prueba de consistencia se realizó por medio de un análisis físico y visual de las muestras de propóleo.

Extracción etanólica de los propóleos

A las muestras de propóleo crudo se les retiraron las impurezas mecánicas, se trituró y se homogenizó separadamente. Cada muestra fue pesada y extraída en recipientes de vidrio cerrados, a una concentración de disolvente etanólico del 96% conservando una relación disolvente: soluto 80:20. Se procedió a obtener principios activos en la disolución, mediante agitaciones eventuales por 1 minuto de los extractos de propóleo crudo con etanol, durante 30 días, a temperatura promedio de 25°C y en la oscuridad con el fin de evitar alteraciones en los metabolitos secundarios. Posterior a los 30 días, la disolución se llevó a refrigeración a 4°C por 12 horas para separar las ceras que se precipitan en la mezcla de solventes de extracción. La mezcla se filtró al final del proceso para obtener el Extracto Etanólico de Propóleo "madre" (EEPm). (Talero, 2013).

Sólidos solubles totales

Para llevar a cabo este objetivo, el procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y

Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, en donde una muestra del propóleo fue secado en el medidor de humedad PRECISA® XM120 para establecer la concentración de trabajo mediante la técnica de dilución Agar (NCLSS 2001).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se emplearon cepas tales como *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* entérica ATCC 14028 subespecie entérica. Las bacterias se activaron en caldo BHI e incubaron durante 18h a 37°C. Inóculos bacterianos fueron preparados en Agar PlateCount rayando por agotamiento e incubando a 24h a 37°C; se observó el crecimiento bacterial como control de verificación de la idoneidad de la bacteria, posteriormente se tomó una colonia aislada para una segunda siembra en Agar PlateCount; tomando de allí una colonia media para ser ajustada al 0,5 del estándar de turbidez de McFarland (1 x 10⁸ UFC ml⁻¹) en 10 ml de solución salina. En una placa de microdilución de 96 pozos fueron colocados 100 µl de caldo Mueller-Hinton y de EEP obtenidos a partir de etanol al 96%, estos fueron llevados en un tubo a una concentración de 6,4 mg/ml y se adicionó 100 µl de cada uno a los primeros pozos, posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base dos hasta completar 6 diluciones (3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 mg/ml), utilizando los restantes pozos para la repetición de cada placa de microdilución. De esta manera se consiguieron las diluciones o concentraciones (mg/ml) de EEP, a probar. De la suspensión bacterial 10 µl fueron adicionados en

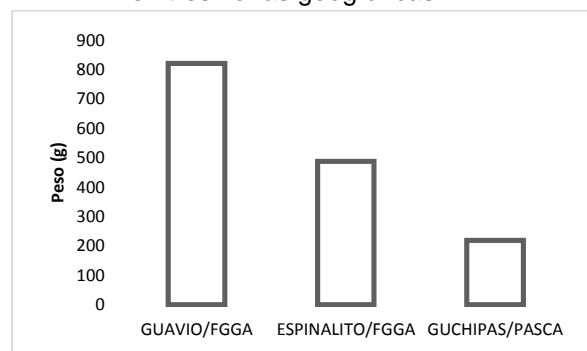
los pozos que contenían propóleo. Luego de este proceso, se incubó por 24 h a 37°C. Pasado este lapso de tiempo se realizó un subcultivo con asa calibrada de 1 µl en placa de Petri en Agar Mueller-Hinton y se llevó nuevamente a incubación bajo las mismas condiciones anteriores. Para este estudio se incluyó un control con alcohol etílico al 96% en el mismo volumen de cada EEP, un control de crecimiento libre de las bacterias y uno de esterilidad del caldo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Producción de propóleos

Las muestras variaron en producción de acuerdo al método de recolección establecido para cada tratamiento. La zona con los valores más altos de producción total de propóleo crudo fue Guavio con 819,8g, seguido de Espinalito con 487,1g y por último Pasca con 267,5g.

Figura 1. Producción total de propóleo (g) en tres zonas geográficas



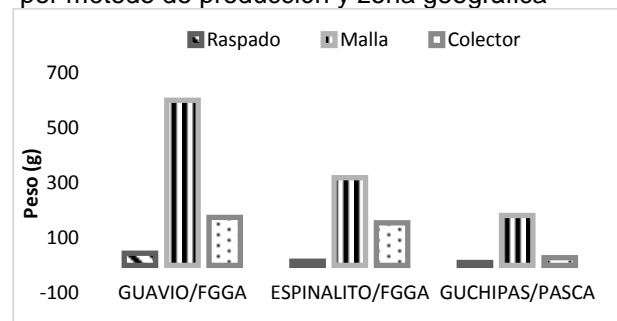
En la zona del Guavio el método de recolección por raspado tuvo los rendimientos más bajos en cuanto a producción, inicialmente se obtuvieron 22 g que fueron disminuyendo en cada cosecha, logrando un peso final de solo 44,1 g. Resultados similares se presentaron

en las zonas de Espinalito y Pasca los cuales registraron rendimientos más bajos con pesos de 14,6 g y 9,6 g respectivamente. La producción de propóleo mediante malla arrojó pesos de 609,9 g en Guavio, 319 g en Espinalito y 94,1 g en Pasca, manteniendo un rendimiento constante y ascendente en cada cosecha. Finalmente el método de colector adaptado logró una producción continua con pesos de 174,8 g en Guavio, 154 g en Espinalito y 72,2 g en Pasca. (Figura 2).

El origen de las impurezas es un factor que está incidiendo en forma progresiva en los mercados internacionales y que a corto plazo será excluyente. Las impurezas naturales pueden tener contaminantes pero es poco probable que contengan sustancias como trazas o derivados de insecticidas, acaricidas, metales pesados, etc. (Apiter, 2010). Con el propóleo de malla y de colector adaptado se busca minimizar las impurezas incorporadas por el productor cuando recolecta propóleo empleando el método convencional de raspado (restos de abejas, metales pesados, cera, etc.). En consecuencia de lo expuesto, con el método de producción de propóleos con malla y colector se descartan las impurezas incorporadas por raspado del alza y solo contiene las impurezas naturales. La diferencia que existe entre las cantidades de propóleos recolectados de los tres tratamientos se atribuye a que las abejas por instinto sellan la parte superior de los marcos de la colmena con propóleos o cera, por lo tanto, el haber orientado las mallas por encima de

los marcos, fue lo que estimuló a la abeja a depositar cera en los agujeros lo más rápido posible con el fin de proteger la colmena, por lo que la cera se mezcla con los propóleos disminuyendo su calidad. (Díaz, 2011). Lo anterior influyó directamente con el peso de propóleo recolectado, por que el producto está constituido mayoritariamente por otros elementos y no por los propóleos. (Figura 1 y 2).

Figura 2. Producción total de propóleo (g) por método de producción y zona geográfica

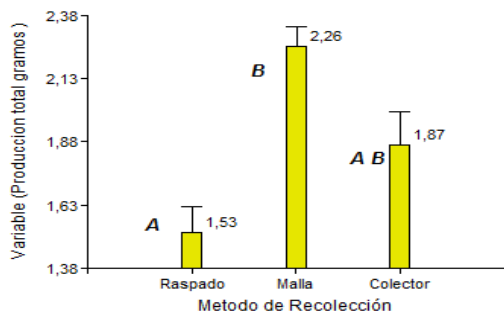


El test de comparaciones múltiples DUNCAN indica que los métodos de recolección raspado convencional y colector no tuvieron diferencias estadísticas ($P > 0,05$), en el cual la implementación de cualquiera de estos dos métodos no garantiza una producción alta de propóleo. Por el método de raspado, se obtuvo una producción mensual de propóleo por colmena de 4,9 g en Guavio, 1,6 g en Espinalito y 1 g en Pasca, lo cual sugiere una producción anual de propóleo de 58 g, 19,2 g y 12 g respectivamente. En cuanto al método de malla se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,05$) frente al método de raspado pero no frente al método de colector ($P > 0,05$), lo cual indica que la inclusión de este método, afecta en un alto porcentaje

la cantidad de propóleo producido por las abejas. Durante el estudio se presentaron pesos mensuales por colmena de 67,7 g en Guavio, 35,4 g en Espinalito y 10,1 g en Pasca, que sugiere una producción anual de propóleo de 812,4 g, 424 g y 121,2 g respectivamente, resultados que demuestran lo contrario a los reportados por López et al, (2003), donde los métodos de recolección de malla y raspado no presentan diferencias en rendimiento y superiores a los de Díaz, (2011), quien reportó pesos promedio por tratamiento con malla plástica de 27,68 g.

En cuanto al método de colector adaptado no se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) frente a los métodos de raspado y malla, que indica que la inclusión de este método puede ser una alternativa para los productores que deseen tener una producción de propóleos continua sin las desventajas de la recolección por raspado. El colector adaptado obtuvo pesos mensuales por colmena de 19,4 g en Guavio, 17,1 g en Espinalito y 8 g en Pasca, lo cual sugiere una producción anual de propóleo de 232,8 g, 205,2 g y 96 g respectivamente, resultados comparables con Inoue et al., (2007)

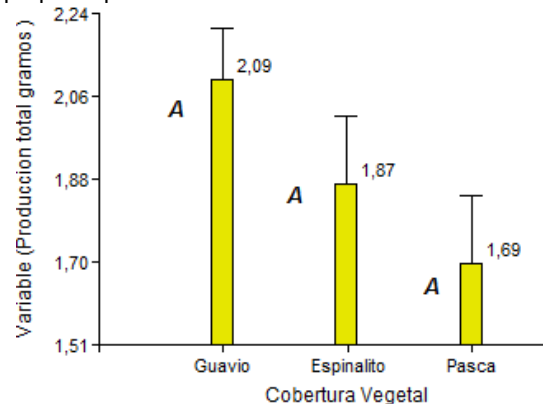
Figura 3. Comparación de la producción de propóleo por método



que sugiere una producción mensual con Colector de Propóleos Inteligente por colmena de 23 g y anual de 276 g por colmena.

Tampoco se presentan diferencias estadísticas entre la altura de los sitios experimentales, indicando que la producción de propóleos no varía entre los 1527 msnm y 2092 msnm. En cuanto a la zona no se reportan datos dentro del análisis de varianza, sin embargo, el test de comparación múltiple de Duncan indica que no se presentaron diferencias estadísticas y por lo tanto la cantidad total del propóleo producido no se vio influenciada por la ubicación de las colmenas

Figura 4. Comparación de la producción de propóleo por zona



Caracterización organoléptica

El 14,8% de las muestras de propóleo presentaron una coloración marrón oscuro con tintes rojos, provenientes de Guavio y Espinalito. Los porcentajes más altos obtenidos corresponden a las muestras de color marrón claro con tintes (37,03%). Estas muestras fueron obtenidas de Guavio, Espinalito y una de Pasca. Propóleos color marrón oscuro (40,7%) se registraron principalmente en Espinalito y Pasca y en menor

proporción en Guavio. Por último se presentaron en menor medida propóleos de color marrón oscuro con tintes (7,40%) los cuales se obtuvieron solamente en Pasca. En cuanto al olor se evidenciaron tres predominantes, resinoso (33,3%), aromático (44,4%) y resinoso agradable (22,2%).

El sabor obtuvo tres diferentes valores, picante (26%), insípido (26%) y resinoso (48%). La prueba de consistencia que se realizó a temperatura ambiente, mostró que el 81,4% de los propóleos son maleables, 14,81% propóleos rígidos y en menor proporción propóleos granulados con apenas 3,70%.

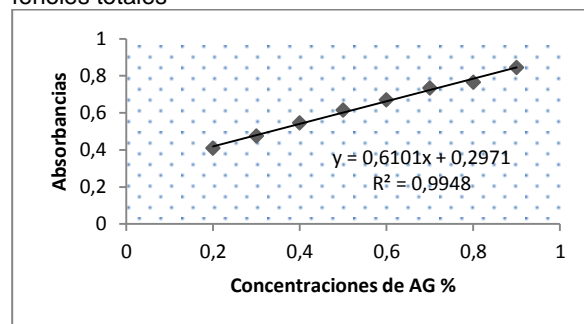
Por último el aspecto de trozos irregulares opacos prevaleció en el 81,4% de las muestras, mientras los trozos irregulares brillantes y los trozos uniformes opacos presentaron valores de 11,1% y 7,4% respectivamente.

Fenoles totales

Después de realizar los diferentes estándares y cada uno de los stocks se obtuvo la siguiente curva de calibración para luego ser analizadas sus absorbancias y posteriormente las muestras de propóleos. Resaltando que se realizaron tres réplicas de la curva de calibración buscando obtener el coeficiente de correlación con más significancia estadística.

En la figura 5 se muestran las diferentes absorbancias y concentraciones de AG, mostrando un R² con una alta significancia estadística. Ideal para poder medir los valores de las muestras de EEP.

Figura 5. Curva de calibración espectrofotométrica para la determinación de fenoles totales



El contenido de fenoles obtenido en este estudio varía ampliamente, en un intervalo de 57,90 a 297,50 mg/g tanto en la zona geográfica como en el método de recolección. Los valores más altos fueron encontrados en la zona de Pasca ($P < 0,05$), que indica una clara tendencia a encontrar propóleos con alto contenido de concentración de fenoles y demostrando que entre las zonas se presentan diferencias altamente significativas. El método de recolección no influyó la concentración de compuestos fenólicos ($F > 0,05$). Estos resultados de fenoles están dentro de los rangos anteriormente mencionados y realizados por diferentes autores. Dentro de los valores reportados por Kumazawa et al, (2004), se tiene que el propóleo de Brasil, con el que se podrían hacer comparaciones por ser originario de una zona tropical como la nuestra, tiene un contenido de fenoles de 120 mg/g, que está dentro de los rangos obtenidos dentro de las zonas geográficas estudiadas, estos resultados hacen evidente que nuestros propóleos difieren en su composición a los de otras zonas, lo que es de esperarse si se tienen en cuenta las diferencias en la vegetación de cada zona. Por otra

parte resultados obtenidos por (Miguel et al, 2010) reportan resultados de 3,92-8,60 mg/ml de contenidos fenólicos siendo nuestros resultados mucho más altos comparados con el anterior estudio desarrollado en Perú.

Por otra parte en cuanto a los valores más altos reportados en este estudio (144,84; 172,30 y 297,50 mg/g) se pueden comparar con los reportados por (Alencar et al, 2007) 232±22,3 mg/g de compuestos fenólicos en propóleo rojo, destacando un valor mayor reportado en este estudio. Los altos valores podrían deberse a la composición botánica del medio justificada por la coloración, hipótesis que podría comprobarse en estudios posteriores.

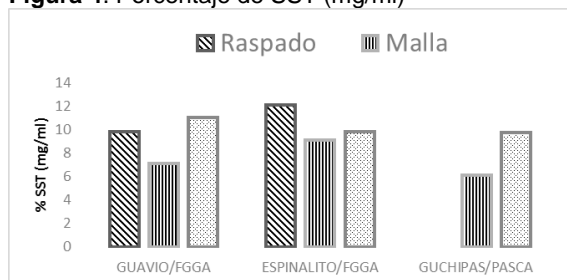
Finalmente se destaca que todas las muestras analizadas superan el requisito mínimo, establecido por la legislación brasilera (Ministerio de Agricultura, 2001) y argentina (Norma iram-inta. 2004) para la presencia de compuestos fenólicos, como determinante de la calidad. Siendo superado este parámetro se plantea la necesidad de realizar más estudios en busca del establecimiento de una normatividad en el país para la valoración y obtención de propóleo de calidad.

Sólidos solubles totales

En promedio se obtuvieron valores de 93 mg/ml de sólidos solubles totales para todas las muestras a una concentración de 96% de etanol. Espinalito raspado y Guavio colector arrojaron resultados de 121 y 110 mg/ml respectivamente, seguido por Guavio raspado y Espinalito colector (98 mg/ml), Pasca colector (97

mg/ml), Espinalito malla (91 mg/ml), Guavio malla (71 mg/ml) y Pasca malla (61 mg/ml). Los datos demostraron que Espinalito raspado y Guavio colector fueron las zonas y métodos que mejores valores obtuvieron con 12,1% y 11% respectivamente, ajustándose a la norma internacional de Brasil que exige un mínimo de 11% y de Argentina con un mínimo de 10%. El propóleo depositado en las paredes internas de la colmena, laterales y cabezales de los cuadros posee una mayor concentración de resinas y si bien se encuentra más protegido, es mucho más escaso. (Vazques, 2010). Además, las abejas instintivamente propolizan la superficie de los marcos con el fin de resguardar su alimento, lo cual incrementa el porcentaje de propóleo crudo. A una mayor concentración de resinas, mayor concentración de fenoles y flavonoides, lo cual explica una concentración de sólidos solubles totales superiores por medio del método de raspado. Para el resto de las muestras se obtuvieron porcentajes de 9,8% para Guavio Raspado y Espinalito colector, 9,7% para Pasca colector, 9,1% para Espinalito malla, 7% para Guavio malla y 6,1% para Pasca malla, resultados inferiores a los reportados por Talero (2014) el cual obtuvo valores sólidos entre 154,4 – 187,4 mg/ml usando como solvente etanol al 96% (Et. 96%) y de propóleos de Chile (propóleo de producción especializada) con 186mg/ml (Et. 96%).

Figura 4. Porcentaje de SST (mg/ml)



Porcentaje de SST (mg/ml)

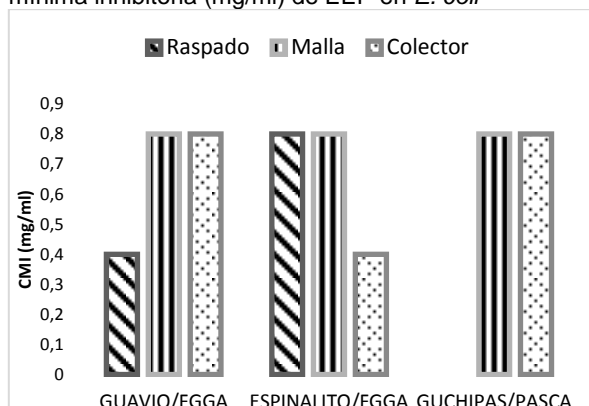
El porcentaje de sólidos solubles totales también está influenciado por la cantidad de cera mezclada con propóleos que usa la abeja para sellar los agujeros en la parte superior de la colmena, que en su afán de sellar el paso de aire y luz, utilizan la cera para acelerar este proceso. (Díaz, 2011), lo cual explica el rendimiento en peso que obtuvo el método de malla frente a los demás métodos evaluados y su bajo rendimiento en cuanto a sólidos solubles totales. Bastos *et al.* (2011) también mencionan que las altas desviaciones estándar de la materia seca de EEP están influidas por su ubicación geográfica, el origen botánico, el clima y la composición del suelo, que se refleja en este parámetro fisicoquímico. En cuanto a las muestras de propóleo que no cumplieron con la norma internacional, se puede explicar por la variedad de factores que interactúan en la extracción y proceso del propóleo crudo, como el porcentaje de impurezas y la combinación con cera con el producto final. No hay datos para Pasca raspado puesto que la muestra se evaporó antes de ser analizada.

Actividad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria encontrada para *E. coli* fue de 0,8

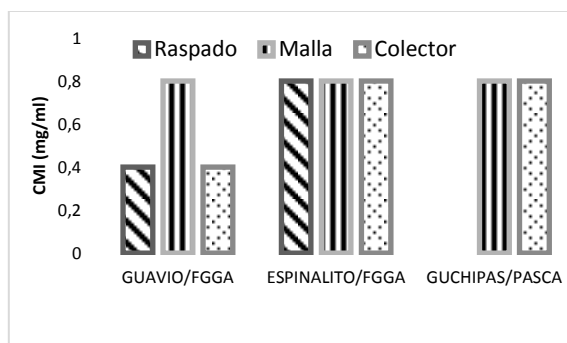
mg/ml en la mayoría de muestras excepto por Guavio raspado y Espinalito colector, en las cuales hubo inhibición con 0,4 mg/ml. La concentración mínima inhibitoria encontrada para *E. coli* fue de 0,8 mg/ml en la mayoría de muestras excepto por Guavio raspado y Espinalito colector, en las cuales hubo inhibición con 0,4 mg/ml. Resultados similares fueron encontrados por Martínez *et al.*, (2012) los cuales reportaron inhibición de *E. coli* a una concentración de 1 mg/ml y con los encontrados por Palomino *et al.*, (2010), quienes reportan una acción antibacteriana contra bacterias Gram negativas, siendo necesaria una dosis más elevada de propóleo en comparación con bacterias Gram Positivas. Estos resultados también son comparables con los de Ortega *et al.* (2001) en donde se reporta una mayor sensibilidad de bacterias Gram positivas que de Gram negativas al propóleo, lo cual puede explicarse al tener presente que las bacterias Gram negativas poseen una pared celular más compleja y con varias capas lipídicas, lo cual puede estar involucrado a la mayor resistencia a los extractos. Además, es conocido que bacterias Gram negativas como *E. coli*, poseen una membrana adicional denominada "Estructura OM" la cual les confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos. Urzúa *et al.* (1998).

Figura 5. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (mg/ml) de EEP en *E. coli*



En cuanto a *Salmonella*, la concentración mínima inhibitoria encontrada fue de 0,8 mg/ml para la mayoría de las muestras, excepto por Guavio Raspado y Guavio Malla, de los cuales se obtuvieron resultados de 0,4 mg/ml. (Figura 6).

Figura 6. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (mg/ml) de EEP en *Salmonella*



Al igual que *E. coli*, *Salmonella* también es una bacteria Gram negativa, por lo cual los resultados fueron similares. El propóleo depositado en las paredes internas de la colmena, laterales y cabezales de los cuadros posee una mayor concentración de resinas y si bien se encuentra más protegido, es mucho más escaso. (Vazques, 2010), lo cual explica por qué el propóleo

recogido por el método de raspado resultó ser el más efectivo en ambas cepas, teniendo en cuenta que este método de recolección no garantiza un propóleo libre de impurezas.

La cantidad de propóleo crudo recolectada para la muestra de Pasca Raspado fue de apenas 5,7 g y su extracto se evaporó antes de ser analizado, por lo cual fue excluido en esta parte del procedimiento.

CONCLUSIONES

El método de recolección causó un gran impacto en la cantidad de propóleo obtenido al final del experimento, ($P < 0,01$), demostrando estadísticamente que la inclusión de un modelo alternativo de producción afecta significativamente la cantidad de propóleo obtenido en el apiario

El test de comparación múltiple de Duncan indicó que entre zonas no se presentan diferencias estadísticas y por lo tanto, la cantidad total de propóleo producido no se vio influenciado por la cobertura vegetal que rodeaba las colmenas.

Durante este estudio no se presentaron diferencias estadísticas entre la altura de los sitios experimentales, indicando que la producción de propóleos no se vea afectada entre los 1527 msnm y 2092 msnm.

En cuanto a contenido de fenoles se destaca que todas las muestras analizadas superan el requisito mínimo, establecido por la legislación brasilera (Ministerio de Agricultura, 2001) y argentina (Norma iram-inta. 2004) como determinante de la calidad.

El contenido de fenoles totales esta intrínsecamente relacionado con la flora vegetal circundante a las abejas, condiciones medioambientales de la zona como temperatura y altitud, lo que indica que la vegetación alrededor de las colmenas ubicadas en Pasca es mejor, presentando diferencias altamente significativas comparada con las de Espinalito y Guavio.

Como parámetro fisicoquímico obtenido en este trabajo (fenoles totales), de las zonas de estudio, todas las muestras analizadas cumplen con normas internacionales como la Brasileira y la Argentina.

La actividad antibacteriana de los propóleos frente a *E. coli* y *Salmonella* se evidenciaron en todas las muestras evaluadas, resultados que aportan evidencias científicas sobre la efectividad de los propóleos de la zona y en la cual se abre la posibilidad de usar el propóleo como una alternativa frente a antibióticos convencionales, no obstante se necesitan más estudios relacionados para lograr una estandarización de los propóleos producidos en el país.

Colombia ha presentado un avance en cuanto a los métodos de recolección de propóleo que permiten incrementar la producción y que posiblemente en algún momento pueda generar mayor interés en los productores logrando mejorar las cifras en cuanto a producción de propóleo se refiere.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alves et al, E. (2010). Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: apidae) de la región andina colombiana. *Acta biol. Colomb*, 175 - 184.
2. Alencar et al, S. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 278-283.
3. Apiter. (2010). Empleo de mallas plasticas para la produccion y cosecha de propoleos. Recuperado el 30 de Marzo de 2016, de http://www.apiter.com/apicultor/productos.php?block=97&familia=apicultor&linea=apicultor_rejilla&imgTit=tit_apicultor_rejilla.jpg
4. Asís, M. (1993): *Apiterapia para todos*, Editorial Científico-Técnica, La Habana, 178-183.
5. Attia, Y. et al (2014). Productive performance, biochemical and hematological traits of broiler chickens supplemented with propolis, bee pollen, and mannan oligosaccharides continuously or intermittently. *Livestock Science*, 87-95.
6. Adil, et al (2011) S., Alternative strategies to antibiotic growth promoters, *VetScan*, 6, article 76.
7. Babinska et al, I. (2011). Effect of Feed Supplementation with Propolis on Liver and Kidney Morphology in Broiler Chickens . *Pakistan Veterinary Journal*, 1-4.

8. Bastos et al, (2011) E. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli* / Physico-chemical indicators and antibacterial activity of brown propolis against *Escherichia coli*. *Arq. bras. med. vet. zootec*, 63(5):1255-1259.
9. Bedascarrasbure et al, E. (2004). Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino. *Acta Farm. Bonaerense*, 69-72.
10. Castro, S. (2001) «Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee- product.» *Biomedical Science*, 3: 49-83.
11. Comision Nacional de Alimentos. (2008). Resolucion conjunta SPRI N° 94 y SAGPA N° 357. Argentina.
12. Chaillou et al, L. (2004). Estudio del propoleos de santiago del estereo, argentina. *Ciencia, Tecnologia*, 11-15.
13. Chem et al. (2005) «Antibacterial activity of propolis against *staphylococcus*.» *Internacional journal of food* , 102: 213-220.
14. Choi et al. (2006). Antioxidant and antimicorbial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 756-761
15. CPAA. (2014). Estado Actual de la Apicultura en Colombia. Seminario Polinización Entomófila en Cultivos comerciales.
16. Diaz, M. d. (2011). "Evaluación de tres técnicas para la cosecha de propóleos en la colmena tipo langstroth en el municipio de Coatepeque, departamento de quetzaltenango. Guatemala.
17. Fao. (1996). Value-added products from beekeeping. Recuperado el 22 de abril de 2014, de <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e14.htm>
18. Galán. J. (2009). Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño, Tesis de maestría.
19. Google earth. (s.f.).2014. Fusagasugá Colombia.
20. Gómez et al (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived form bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1220-1234.
21. Graca et al, M. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 3418–3423.
22. Ibrahim (2011). Phytochemical Composition of Iraqi Propolis and its effect on some Microorganism A. M. Al-Anbar *J. Vet. Sci.*, Vol.: 4 No. (2), ISSN: 1999-6527
23. Inoue et al, H. (2007). Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* , 65-69.

24. Japan Council of Propolis. (2010). Propolis voluntary food standards. Japan.
25. Kačániová et al, K. (2012). In vitro and In vivo antimicrobial activity of propolis on the microbiota from gastrointestinal tract of chickens. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 1665–1671.
26. Katircioglu H et al. 2006 «Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions.»: 5: 1151-1153.
27. Kujumgiev et al. 1998 «Antibacterial activity of propolis some of its components and their analogs.»: 48: 785-786.
28. Kumazawa et al. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 329-339.
29. Liviu. (2011). Quality criteria for propolis Standardization. *Animal science and Biotechnologies*.
30. Londoño et al. 2008 «Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propoleo de la abeja apis mellifera proveniente del estado de Mexico.» *Tecnología en marcha*: 1: 49-55.
31. Lopez et al, A. (2003). Métodos de recolección de propoleos: su incidencia en rendimiento y calidad. *Agrotecnia*, 10-14.
32. Lozina et al, (2010). Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 102-110.
33. Maidana et al. (2011). Tipificación de Calidad CEDIA Para propóleos en bruto. Santiago del Estero: *Apicultura Revista y Portal*.
34. Martinez, T. (2011). Diagnostico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. Recuperado el 20 de marzo de 2015, de ministerio de agricultura y desarrollo rural : <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/diagnostico-de-la-actividad-apicola-y-de-la-crianza-de-abejas-en-colombia.pdf>
35. Martínez, J. (2009). Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño . Tesis de Maestría . Medellín, Antioquia, Colombia. P. 19
36. Martinez et al, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Rev.MVZ Córdoba*, 2861-2869.
37. Manrique, (2006) A. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. *Efecto de la variación estacional Zootecnia Tropical*. Vol. 24 No. 1.
38. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. (2001). Anexo VII: Regulamento de Identidade e Qualidade de Extracto de Própolis.

39. Moises, A. (2007). Apiterapia 101 para todos. 3ed. Miami Florida, Rodesprinting. p. 145-150
40. Moreira et al. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. Food and Chemical Toxicology, 3482-3485.
41. Mossad, S. (Agosto de 2013). Upper Respiratory Tract Infections. Recuperado el Septiembre de 2015, de <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/upper-respiratory-tract-infection/>
42. Norma iram-inta. (2004). Instituto argentino de normalización-subcomité de productos agroalimentarios del noa. Norma 15935-1 . Buenos Aires, Argentina.
43. Ortega et al, N. (2011). Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propoleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. Artículos de Investigación Científica y Tecnológica , 8-16.
44. Palomino et al, s. (2010). Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). Facultad Nacional agrícola de Medellín, 5373-5383.
45. Palomino et al, L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Revista de la facultad de química farmacéutica, 388-395.
46. Park, et al. (2002). J. Agr. Food Chem.
47. Peña, R.(2008) Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Ciencia e investigación agraria, Vol. 35, 17-26.
48. Pepeljnjak et al, S. (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. And Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiology, 111-116.
49. Prost, J.(2007). Apicultura: conocimiento de la colmena. Manejo de la colmena. En Apicultura: conocimiento de la colmena. Manejo de la colmena (págs. 508-510). España: Mundi-Prensa.
50. Ryeon-Mok et al, A. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Science Direct, 1383-1392.
51. Rodríguez et al, Y. (2012). Caracterización físicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propoleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. U.d.c.a. Actualidad y Divulgación Científica, 303-311.
52. Soto, M. (2015). Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. In Crescendo. Institucional, 37-47.

53. Talero, C. A. (2013). Actividad antimicrobiana de abeja *Apis mellifera* de cuatro regiones de Colombia como aporte para la denominación de origen de la región. (págs. 20-26).

54. Urzua et al, M. (1998). Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). . *Journal of Ethnopharmacology*, 251-254.

55. Vazques, J. (2010). Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola i -cuena del salado, pcia. De buenos aires. Recuperado el 17 de Noviembre de 2015, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12264/tesisUPV3345.pdf?sequence=1>

56. Vilorio et al, J. (2012). Caracterización físico-química del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (antioquia, colombia). *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 77 - 86.

57. Yoong .M. (2014). Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya. Honduras.