

**EFFECTO 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 ALEJANDRO CASTILLO CORREDOR
CÓDIGO: 150211116**

**FABIAN JADIR CHIPATECUA ZARATE
CÓDIGO: 150211117**

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ**

2016

**EFFECTO 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**

Trabajo de grado opción investigación,
como requisito parcial para la obtención
del título de Zootecnista

**DIEGO ALEJANDRO CASTILLO CORREDOR
CÓDIGO: 150211116**

**FABIAN JADIR CHIPATECUA ZARATE
CÓDIGO: 150211117**

Director

**Cesar Augusto Talero Urrego
Zootecnista M.Sc. Producción animal UNAL**

Codirector

**Andrés Orlando Garzón Ayala
Zootecnista Esp.**

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ**

2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Luis Miguel Acosta Urrego

Docente Jurado

Jairo Enrique Granados

Docente Jurado

Dedicamos este documento de tesis a nuestras familias y a nuestro director de tesis, M.Sc. Cesar Augusto Talero.

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor de tesis por su paciencia y compartir su experiencia académica e intelectual en nuestra formación profesional.

A Andrés Garzón por su invaluable aporte a la realización de este trabajo.

Al Docente Jairo Enrique Granados por compartir sus amplios conocimientos y aportar para el desarrollo de este trabajo de grado

A nuestras familias por su apoyo constante.

A la Universidad de Cundinamarca por acogernos durante este tiempo de formación académica, a todos y cada uno de los docentes que nos brindaron sus conocimientos y experiencias.

A los compañeros que aportaron positivamente y que nos aconsejaron en este largo camino.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ANEXOS	22
RESUMEN	24
ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN	26
1. JUSTIFICACIÓN	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo General	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. REVISIÓN DE LITERATURA	31
3.1. Conceptos generales sobre el propóleo	31
3.2. Composición del propóleo	32
3.3. Métodos de recolección de propóleos	32
3.4. Caracteres organolépticos	37
3.5. Fenoles totales en propóleos	38
3.6. Acción antimicrobiana	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1. Ubicación y Características agroclimatológicas	44
4.1.1. Métodos de recolección	47
4.2. Tratamientos	49
4.3. Diseño experimental.	50
4.4. Análisis estadístico	53
4.5. Producción de propóleos	53
4.5.1. En campo	53
.....	53
.....	54
.....	54
4.5.2. En laboratorio	54

.....	54
.....	54
4.6. Evaluación organoléptica.....	55
4.7. Extracción etanólica de los propóleos.....	55
4.8. Sólidos solubles totales	56
4.9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	56
4.10. Técnicas analíticas	58
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	60
5.1. Producción de propóleos	60
.....	66
5.2. Caracterización organoléptica	67
5.2.1 Color.....	70
5.2.2 Olor	71
5.2.3 Sabor.....	71
5.2.4. Consistencia.....	71
5.2.5. Aspecto	72
5.3. Fenoles totales	72
5.4. Sólidos solubles totales	76
5.5. Actividad antimicrobiana.....	79
6. CONCLUSIONES.....	83
6.1 . RECOMENDACIONES	85
7. BIBLIOGRAFÍA	87
8. ANEXOS	95

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de propóleos	35
Tabla 2. Fenoles totales en diferentes países.	40
Tabla 3. Descripción de sitios experimentales.....	44
Tabla 4. Descripción de los tratamientos.....	50
Tabla 5. Cuadro de distribución de tratamientos y réplicas	52
Tabla 6. Variables evaluadas en el experimento	52
Tabla 7. Técnicas analíticas de cada variable	59
Tabla 8. Análisis de varianza de la producción de propóleo.....	63
Tabla 9. Test Duncan x Método.....	64
Tabla 10. Test DUNCAN x Altura	65
Tabla11. Test DUNCAN x Zona	65
Tabla 12. Resumen estadístico	67
Tabla 13. Características organolépticas de tres diferentes zonas geográficas ...	69
Tabla 14. Absorbancias y concentración de las muestras de propóleo por triplicado	74
Tabla 15. Actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i>	79
Tabla 16. Actividad antimicrobiana contra <i>Salmonella</i>	81
Tabla 17. Estándares de ácido gálico.....	98
Tabla 18. Curva de calibración de Ácido Gálico	99
Tabla 19. Soluciones para lectura de muestras	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción total de propóleo (g) en tres zonas geográficas	60
Figura 2. Producción total de propóleo (g) por método de producción y zona geográfica.	62
Figura 3. Comparación de la producción de propóleo por método.....	66
Figura 4. Comparación de la producción de propóleo por zona.....	66
Figura 5. Curva de calibración espectrofotométrica para la determinación de fenoles totales.....	72
Figura 6. Concentración de sólidos solubles totales	77
Figura 7. Porcentaje de SST (mg/ml).....	78
Figura 8. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (mg/ml) de EEP en ..	80
Figura 9. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (mg/ml) de EEP en <i>Salmonella</i>	82

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Ubicación satelital de los apiarios (Google earth)	45
Imagen 2. Distribución de las colmenas en Guavio.....	46
Imagen 3. Distribución de las colmenas en Espinalito	46
Imagen 4. Distribución de las colmenas en Pasca	46
Imagen 5. Recolección de propóleo por el método de raspado (www.oni.escuelas.edu.ar).....	47
Imagen 6. Método de recolección de propóleo por medio de malla (Autores).	48
Imagen 7. Malla de propóleo con marco de ventilación (Autores).....	48
Imagen 8. Colector de propóleo adaptado (Autores).....	49
Imagen 9. Recolección de propóleo en colector adaptado (Autores).	49
Imagen 10. Recolección de propóleo (Autores)	53
Imagen 11. Adecuación de las colmenas (Autores)	53
Imagen 12. Supervisión de las colmenas (Autores)	54
Imagen 13. Embalaje y codificación de las muestras de propóleo	54
Imagen 14. Almacenamiento en frío. (Autores)	54
Imagen 15. Pesaje de propóleo crudo (Autores)	54
Imagen 16. Almacenaje de propóleo crudo en bolsa hermética (Autores)	54
Imagen 17. Filtración del EET (Autores)	56
Imagen 18. Extracto etanólico de propóleo (Autores).	56
Imagen 19. Incubación (Autores)	57
Imagen 20. Aislamiento de la colonia. (Autores)	57
Imagen 21. EEP al 96% concentración de 3,2 mg/ml (Autores).....	57
Imagen 22. Bacterias incubadas (Autores)	58
Imagen 24. Adición del propóleo (Autores)	58
Imagen 23. Subcultivo con asa calibrada 1 µl (Autores)	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Test Duncan x Zona.....	95
Anexo 2. CMI <i>Salmonella</i>	95
Anexo 3. Análisis de Varianza CMI <i>Salmonella</i>	96
Anexo 4. CMI <i>E. coli</i>	96
Anexo 5. Análisis de Varianza CMI <i>E. coli</i>	96
Anexo 6. Análisis de Varianza Fenoles Totales	97

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 ultimo 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 fué evaluar la producción de propóleo en tres (3) diferentes zonas geográficas y tres (3) diferentes métodos de producción y posteriormente evaluarlo fisicoquímicamente y microbiológicamente.

1. JUSTIFICACIÓN

En el documento de “Diagnóstico sobre la actividad apícola y crianza de abejas en Colombia” (Martínez, 2011) realizado por el Ministerio Agricultura y Desarrollo Rural permite afirmar que cada apicultor maneja un promedio inferior a las 20 colmenas. A nivel mundial se cuenta con un número aproximado de 81´026.869 colmenas y los 4 principales países que tienen el 40% del apiario mundial son: India, China, Etiopia y Turquía. Nuestro país ocupa el puesto 62 en número de colmenas con 120.000 el cual para el 2014 se evidencia un crecimiento, puesto que en el año 2010 se contaba con 89200 colmenas (CPAA 2014) cifras que permiten considerar la actividad apícola y sus subproductos como una alternativa de alta producción en el país.

La calidad de la investigación ha mejorado a través del tiempo con la inclusión de nuevas técnicas de recolección, diferentes estructuras de las colmenas y el uso de abejas en cultivos comúnmente usados. Los productos obtenidos de las abejas han creado gran interés en los consumidores y en las empresas debido a su alto valor biológico con el fin de proteger y aumentar el número de consumidores, los productos de la apicultura deben ser inspeccionados por normas de calidad que garantizan un producto ideal para el consumo y para los fines requeridos por cada persona (Liviú, 2011).

En nuestro país, luego de la aprobación del consumo de propóleos como "suplemento dietario", se ha incrementado su demanda para la elaboración de subproductos, y su valor comercial no tiene relación con la calidad del mismo. En muy pocos casos, el comprador toma como referencia para establecer el precio, características como el aspecto, presentación, color, olor y sabor que poseen cierta relación con la "calidad real" del producto, pero de todas maneras es una apreciación subjetiva. Para efectuar una apreciación objetiva de la calidad del propóleo, y por lo tanto, establecer el valor real del mismo, es necesario completar

su evaluación, mediante la determinación analítica, que permita obtener valores de composición. (Maidana, 2011). El propóleo puede convertirse en un producto de alto valor y aporte económico para el apicultor. Actualmente no hay normas en Colombia que garanticen la calidad de este. Países como Brasil y Argentina poseen normas para la calidad del propóleo; (Ministerio de Agricultura de Brasil-APACAME, 2001) Y (Norma IRAM-INTA, 2004) respectivamente. Este trabajo de investigación busca generar un aporte para la información base en cuanto a la caracterización de propóleos colombianos que ayude a la formación de una norma que rija de acuerdo a las características botánicas de la geografía colombiana.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo General*

Analizar los efectos 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 condiciones de la provincia del Sumapaz, Cundinamarca.

2.2. *Objetivos específicos*

- Establecer un método de producción eficiente de propóleo de acuerdo a su localización geográfica, mecanismos de recolección por raspado, malla y colector.
- Determinar criterios de calidad de los propóleos crudos obtenidos según la ubicación geográfica y el método de recolección, mediante algunos indicadores organolépticos como son color, olor, sabor, aspecto, consistencia y parámetros fisicoquímicos como el contenido de sólidos solubles totales y fenoles totales, teniendo como referencia la normatividad internacional.
- Evaluar la bioactividad antibacteriana del EEP *in-vitro* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922y *Salmonella* ATCC 14028 mediante la obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. *Conceptos generales sobre el propóleo*

Las abejas generan una sustancia a partir de resinas vegetales para el aislamiento y protección del panal contra organismos patógenos, esta sustancia es conocida como propóleo el cual es de vital importancia para la colmena, elaborado por insectos de la familia *Apidae*, principalmente la especie *Apis mellifera* por medio de recolección de resinas y residuos vegetales, por este motivo la composición del propóleo puede verse afectada por diversos factores como: zona de vida, época de colecta, por el entorno ecológico y las especies vegetales de las cuales se extraen las resinas (Ortega *et al.* 2011). Los materiales colectados son triturados, humedecidos y mezclados con la cera producida por las glándulas céricas y finalmente son transportados hacia la colmena. En estado fresco es resinoso, y cuando ha permanecido durante más de cinco meses en la colmena presenta una estructura quebradiza. La coloración es variada y puede poseer tonalidades amarillentas y verdes, típicas de los propóleos europeos y algunos del Brasil; en otros casos, presenta tonalidades rojizas, siendo estas características de algunos propóleos cubanos. (Alencar *et al.*, 2007).

El propóleo se elabora con fines defensivos y satisface alguna de las siguientes funciones: mantener la colmena libre de bacterias y hongos patógenos y actuar como soporte estructural para cubrir rendijas y agujeros con el fin de regular la temperatura del interior de la colmena y evitar la entrada de otros organismos. Al interior de las colmenas los cadáveres de los insectos y pequeños vertebrados intrusos se momifican con propóleos, evitando de esta forma la proliferación de enfermedades infecciosas y el ataque por insectos necrófagos. (Martínez, 2009)

La producción de propóleo está en función de la raza de abeja y del ambiente en el cual se desarrolla la actividad apícola. La raza y los híbridos africanizados de

Apis mellifera, son más propolizadores que otras 23 razas, potenciándose este comportamiento cuando los apiarios se ubican a más de 1000 m de altitud (Peña, 2008). Son pocas las colonias y las abejas de una colmena que colectan propóleo, cerca de 3% de las pecoreadoras realizan este trabajo, el cual es muy desgastante (reduce la vida de la obrera en torno al 20%), ya que esta operación dura entre 15 y 60 minutos y se realiza en las horas más calientes del día (Manrique, 2006). Es por ello que para producirlo adecuadamente, las abejas deben ser alimentadas o tener mucho néctar a disposición, para compensar este desgaste productivo, además se podría forzar a las colmenas a tapar los espacios vacíos con cera, si la temperatura llegara a bajar mucho (Galán, 2009).

3.2. Composición del propóleo

El mayor porcentaje de composición de los propóleos lo constituyen las resinas aproximadamente entre un 45-55%. A su vez constituidas por compuestos fenólicos (Tabla 1). Algunos como pinocembrina (5,7 dihidroxiflavanona), galagninae, y ácido cafeico y sus ésteres tienen propiedades antibióticas (Kujumgiev et al. 1998). Se encuentran varios estudios bacteriológicos realizados *in vivo* como *in vitro*, que han ratificado la acción bactericida y bacteriostática relacionada con el propóleo, esta actividad puede atribuirse a la cantidad y tipos de compuestos fenólicos que constituyen (aproximadamente 300 compuestos identificados), ya que muchos de estos compuestos son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos, como es el caso de los compuestos flavonoides (Londoño *et al.* 2008).

3.3. Métodos de recolección de propóleos

Aunque existen varios métodos de recolección de este material, se han utilizado principalmente el método tradicional de raspado y el empleo de mallas plásticas.

La recolección del propóleo por raspado, es un método cada vez menos aconsejable que consiste en raspar con palanca o con espátula todos los lugares de la colmena en los cuales las abejas hayan depositado propóleo. Este método resulta muy engorroso e inconveniente por la poca productividad y la alta posibilidad de contaminación y oxidación de los compuestos bioactivos por la presencia de metales en el material utilizado para el raspado. (Asís, 1993). Por su parte los propóleos en bruto obtenidos de las mallas, normalmente presentan mejor calidad, con pocas impurezas y libres de contaminantes (Martinez *et al.* 2012). Como resultado de la diversidad en la composición química de este producto apícola y el empleo generalizado en la industria, se ha hecho necesario el control de calidad y la normalización del propóleo crudo y sus productos. Con este fin, se han establecido metodologías de trabajo en diferentes normas internacionales, entre las que se incluyen el reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos del Ministerio de Agricultura de Brasil (Martinez *et al.* 2012). Brasil es uno de los países que más esfuerzos ha hecho en materia de investigación en apicultura. Diversos trabajos se han realizado con el fin de establecer un método de extracción de propóleo eficiente, de los cuales se han arrojado resultados importantes como el famoso propóleo verde brasilero y el colector inteligente de propóleo (CPI). Según Inoue *et al.* (2007) la inclusión de nuevas técnicas de producción de propóleo incrementa significativamente la producción por colmena, específicamente mediante malla de tela o plástica y CPI, descartando el método tradicional de raspado, además de las ventajas geográficas que hay en Suramérica al tener clima tropical manteniendo una producción continua durante todo el año.

La cantidad de propóleos recogida y fabricada por las abejas varía según la raza y la flora apibotánica de los alrededores del colmenar. Colmenas situadas en áreas boscosas o cercanas a los ríos y vegetación abundante, han presentado más fuentes de resinas que las situadas en zonas de llanos. La cantidad promedio que puede producir una colmena por año varía entre los 150 y 300 g. Por ejemplo,

dependiendo de la localización del colmenar, una colonia de abejas (*Apis mellifera mellifera* L.) recoge de 50 a 500 g de propóleos por año cuando se utilizan telas o rejillas plásticas recolectoras (Thimann & Manrique, 2002).

Tabla 1. Composición general de propóleos

Componentes	Grupo de componentes	Referencias
Resinas	45 a 55% flavonoides	Pápay et al., 1987 – Hungría Bankova et al., 1987 – Bulgaria Nagy et al., 1989 – República Checa Omar, 1989 – Egipto Greenaway et al., 1990 – UK Greenaway et al., 1990 – Austria, Ecuador, Alemania, Israel, UK, USA Wang y Zhang, 1988 – China Mizuno et al., 1987 – Japón.
	Ácidos fenólicos y esterés	Nagy et al., 1985 – Hungría Wollenweber et al., 1987 – Alemania Bankova et al., 1992 – Bulgaria, Mongolia
Ceras y ácidos grasos	25 a 35% más son por lo general de cera de abejas, pero muchos son de origen vegetal	Pápay et al., 19877 – Hungría
Aceites esenciales	10% volátiles	Petri et al, 1988 – Hungría
Polen	5% Las proteínas probablemente de polen ; aminoácidos libres (AA) : 16 AA en más de 1 % de AA total de arginina y proteína que juntos componen un 45,8 %, AA ocurren en trazas	Gabrys et al., 1986 - Polonia
Otros compuestos orgánicos y minerales	5 % 14 minerales traza los cuales Fe y Zn son los más comunes.	Sheller et al., 1989 – Polonia
	Cetonas Lactonas Quinones Esteroides Ácido benzoico y ésteres Vitaminas, sólo B3 Azúcares	Bankova et al., 1987 – Bulgaria Cuellar and Rojas, 1987 – Cuba Cuellar and Rojas, 1987 – Cuba Cuellar and Rojas, 1987 – Cuba Greenaway et al., 1987 – UK Greenaway et al., 1987 – UK Greenaway et al., 1987 - UK
Revisión general		Walker and Crane, 1987 – World Asks, 1989 – Mundo Crane, 1990 – Mundo Inoue, 1988 – Japón

Fuente: (FAO, 1996)

Calidad organoléptica en propóleos

En la colmena, las abejas utilizan al propóleos con diversos fines, tales como: cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena, consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y evitar vibraciones. Dentro de los productos apícolas, el propóleos se destaca por sus propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales, anestésicas, antiulcerosas, inmunoestimulantes, hipotensiva, citostática, antioxidantes, fitoinhibidoras y anticariogénica (Chaillou et al, 2004)). Durante la colecta del propóleo, las abejas mezclan cera y las resinas con una enzima 13-glicosidasa presente en su saliva, provocando la hidrólisis de los flavonoides glucosados en flavonoidesagliconas. Posteriormente lo transportan al interior de la colmena, para ser utilizado con diferentes fines. Debido a la participación de la abeja, la composición del propóleos difiere de las resinas vegetales, pudiendo considerarse por lo tanto, un producto de origen mixto, vegetal y animal. La importancia del propóleos como “arma química” de las abejas para protegerla colmena de microorganismos patógenos, ha atraído la atención de numerosos científicos. Cada región presenta distinta flora, dependiendo de la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, la insolación y la evapotranspiración, lo que implica una variación en la composición de los propóleos. En Europa, América del Norte y oeste de Asia, la fuente dominante del propóleos es el exudado de brotes de álamos, especie vegetal perteneciente al género *Pópulos*. En cambio en América del Sur esta especie no es nativa, existiendo una gran variedad de especies vegetales para la obtención de la resina lo que dificulta la correlación del propóleos con la fuente productora. Distintos tipos de propóleos han sido definidos de acuerdo al origen botánico y a su composición química, entre ellos se describen los de tipo álamo antes mencionado, tipo abedul (*Betulaverrucosa*) provenientes de Rusia, propóleos verde de Brasil (*Baccharissp*), Propóleos rojo en Venezuela y Cuba (*Clussiasp*). Park *et al.* (2002) reportaron similitud en estudios

realizados sobre propóleos procedentes del sur de Brasil, Argentina (Tucumán y Buenos Aires) y Uruguay, realizando un perfil fitoquímico comparativo mediante el cual demostraron que el origen botánico de estos propóleos es la especie vegetal *Pópulos alba*. Estudios realizados sobre 65 muestras de propóleos procedentes de diferentes regiones de Cuba, han permitido sugerir una tipificación para los propóleos procedentes de este país. Así se tienen los propóleos pardos (tipo I) a partir de los cuales se pueden obtener extractos pardos rojizos, los que se caracterizan químicamente por la presencia de nemorosona; los propóleos rojos (tipo II) que son de color rojo y en su composición química prevalecen los isoflavonoides, fundamentalmente vestitol, medicarpina, neovestitol e isosativan; y los propóleos amarillos (tipo III)(Lozina *et al.* 2010).

3.4. Caracteres organolépticos

El aspecto, estructura, consistencia, color, olor y sabor se determinan mediante pruebas sensoriales descriptivas, realizadas por un grupo de personas semienterradas que califican los atributos en sesiones de 5 muestras cada una, utilizando escalas de intervalo. Las escalas son de 2 puntos (homogénea y heterogénea) para la estructura; de 5 puntos para el aspecto (polvo, granulado, trozos irregulares opacos, trozos irregulares con poco brillo, trozos irregulares con brillo); de 3 puntos para la consistencia (blanda, poco blanda y dura), para el olor (resinoso suave, resinoso, resinoso aromático) y para el sabor (insípido, dulce, picante) y de 15 puntos para el color (distintas tonalidades de marrón, adicionalmente segmentos amarillos, rojos entre otros). Para el análisis se colocan las muestras, codificadas, en frascos de vidrio con tapa rosca y se conservan a temperatura ambiente, se evalúan primeramente, el olor y el sabor y luego el resto de los caracteres comparando cada muestra con controles adecuados. El aspecto y la estructura se determinan por observación visual, la consistencia por opresión de la muestra con los dedos, el color mediante la comparación con una escala de colores (Chaillouet *al.* 2004).

3.5. Fenoles totales en propóleos

Los compuestos fenólicos o polifenoles han sido reconocidos por su amplio espectro de actividades biológicas, tales como anticancerígenos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, analgésicos y antioxidantes (Gómez *et al.*, 2006). Se ha establecido que la mayoría de los compuestos bioactivos encontrados en propóleos son compuestos fenólicos, sin embargo, la concentración de éstos puede variar sustancialmente de acuerdo al origen de las muestras y así mismo pueden variar las propiedades biológicas que se les atribuyen. Por esta razón, es de gran importancia realizar ensayos que permitan su detección y cuantificación, con el objeto de definir parámetros de calidad para este producto apícola. Actualmente, el contenido de fenoles totales en propóleos se determina con el método de Folin-Ciocalteu, en el cual la oxidación de los compuestos fenólicos de los metabolitos secundarios en plantas por molibdotungstato fosfórico, da como resultado un producto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 760 nm (Singleton & Rossi, 1965). En Argentina, el Código Alimentario de éste país establece que la cantidad de compuestos fenólicos que debe tener una muestra de propóleos bruto para su consumo y distribución no debe ser menor al 5%, y en un extracto blando no debe ser inferior al 0.25%. Diversos estudios han demostrado una correlación directa entre el contenido de fenoles totales y actividades biológicas presentes en los propóleos, como actividades antioxidante y Antimicrobial (Kumazawa *et al.*, 2004; (Choi *et al.*,2006) ;(Moreira *et al.*, 2008). Para el caso de la legislación brasilera el contenido de fenoles totales mínimo en una muestra debe de ser de 0,5%.

Los ácidos fenólicos y sus ésteres, genéricamente denominados “compuestos fenólicos”, son actualmente considerados los principales componentes bioactivos del propóleo. Ambos absorben radiación en la región UV del espectro electromagnético protegiendo de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles. Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido

por lo menos aun grupo oxhidrilo. La estructura más sencilla es la del ácido benzoico, pero con otros sustituyentes en el anillo se forman ácidos fenólicos como el cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico, comunes en los vegetales y en el propóleos. Dicha composición les proporciona propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales. Además, a algunos ésteres de ácidos fenólicos se les atribuye propiedades antitumorales (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

Estos fitoquímicos pueden presentar diferentes mecanismos que se complementen o sean sinérgicos en la neutralización de los agentes oxidantes, estimulación del sistema inmune, regulación de la expresión de genes implicados en la proliferación y apoptosis celular, regulación del metabolismo de hormonas y efecto antiviral. Por ello, en los últimos años, a partir del estudio MONICA (Monograph and Multimedia Sourcebook) realizado por la OMS en 1989 (Tunstall *et al.*, 1979-2002). se despertó un gran interés al comprobarse que países con consumo de alimentos y bebidas con alto contenido de polifenoles y flavonoides tiene menos tasas de mortalidad por enfermedades degenerativas y cardiovasculares (Bedascarrasbure *et al.*, 2004). Esto ha hecho que la comunidad científica vuelque su interés en productos naturales que contribuyan a reforzar la prevención y reduzcan el riesgo de padecer enfermedades, por tal motivo el interés de cuantificar estos constituyentes lo que proporciona una herramienta útil que permita la elaboración de productos con elevado valor añadido debido a su alta concentración en compuestos biológicamente activos.

Tabla 2. Fenoles totales en diferentes países.

País	Referencia	Breve descripción	Valor	Unidad de medida	Norma Argentina (Fenoles totales)	Norma Brasileira (Fenoles totales)
1 Argentina	(CHAILLOU <i>et al</i> , 2004)	ESTUDIO DEL PROPOLEOS DE SANTIAGO DEL ESTERO, ARGENTINA	4,251-25,251	%, mg/g	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
2 Colombia	(Rodríguez <i>et al</i> , 2012)	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN EL DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO, COLOMBIA	63,72-94,55	mg de ácido gálico / g de muestra (mg de GAE/g de EEP).	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
3 Argentina	(BEDASCARRASBURE <i>et al</i> , 2004)	Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino	13,58-21,31	%, p/p	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
4 Colombia	(Palomino <i>et al</i> , 2009)	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN EL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA (COLOMBIA)	22,1-75,22	mg GAE/g de EEP.	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
5 Brasil	(Yoong <i>et al</i> , 2004)	Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya	2,59-7,29	%	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
6 Brasil	(Lozina, <i>et al</i> , 2009)	Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos	1,43-288,21	mg/g	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
7 Brasil y Corea	(Alves <i>et al</i> , 2010)	CARACTERIZACIÓN ANTIMICROBIANA Y FÍSICOQUÍMICA DE PROPÓLEOS DE Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE) DE LA REGIÓN ANDINA COLOMBIANA	0,1-0,5	%	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE

8	China	(Soto, 2015)	Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú	60,5-78,6	Miligramos de ácido gálico (GAE)/gramo de extracto etanólico de propóleo (EEP).	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
9	Colombia	(Mendes <i>et al</i> , 2006)	Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities (p431-435)	0,41-3,90	%	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
10	Colombia	(Ryeon-Mok <i>et al</i> , 2007)	Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China	42,9-302	mg/g de EEP	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
11	Colombia	(Alencar <i>et al</i> , 2007)	Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis	232±22,3	mg/g de EEP	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
12	Perú	(Graca <i>et al</i> , 2010)	Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal	3,92-8,60	mg/ml	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE
13	Portugal	(Choi <i>et al</i> , 2006)	Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea	120-212,7	mg/ml de Extracto	Mínimo 50 mg/g de GAE	Mínimo 0,5% de GAE

Autores (2016)

3.6. Acción antimicrobiana

La acción contra los microorganismos es una característica esencial del propóleo razón por la cual los seres humanos lo han utilizado durante siglos por sus propiedades farmacéuticas. Además de ser antibacterial, antifúngica y tener propiedades antivirales, el propóleo presenta muchos otros beneficios tales como antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, inmunoestimulante, anti-mutagénica entre otras (Castro, 2001).

Las propiedades antimicrobianas y medicinales de los propóleos se han informado ampliamente y tienen una larga historia (Mossad, 2008) debido a la creciente tasa

de resistencias a antibióticos por la mayoría de las bacterias. Ortega *et al.* (2011) menciona la capacidad de propóleos obtenidos en el departamento del Cauca ante *Pseudomonas aureginosa* y *Staphylococcus aureus*, demostrando el efecto bacteriostático sobre estas bacterias, teniendo en cuenta que los resultados químicos realizados revelaron presencia de flavonoides, alcaloides, cumarinas, entre otros. Resultados similares se encontraron sobre *Escherichia coli* (Martinez *et al.* 2012. Alves *et al.* 2010) *Klebsiella oxytoca* y *Staphylococcus epidermis*. (Kačániová *et al.*, 2012) *Salmonella enteritis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* entre otros (Ibrahim, 2011), ofreciendo así la información necesaria para la experimentación de posible uso de propóleos para el tratamiento y control de muchas infecciones por diferentes tipos de bacterias. Sus propiedades biológicas pueden variar según las diferentes fuentes de plantas. Los informes han señalado su actividad eficaz contra las bacterias Gram-positivas y acción limitada contra las bacterias Gram-negativas. El modo de la actividad antimicrobiana de los compuestos de los propóleos no está claro, pero las explicaciones posibles son: inhibición de la motilidad bacteriana, afecto del potencial de la membrana, inhibición del RNA-polimerasa, desorganización del citoplasma, pared citoplasmática de la membrana y de la célula e inhibición de la síntesis de la proteína. (Pepeljnjak *et al.*, 2004)

El interés global en las investigaciones con propóleo sobreviene por su gama amplia de actividades biológicas y potencial terapéutico. En América Latina los estudios con este valioso producto apícola se han concentrado en muestras de origen brasilero, aunque diversos países latinos lo producen y comercializan (Alves *et al.* 2010). Dentro de las investigaciones sobre las propiedades del propóleo hay poca información sobre el uso de esta sustancia en la producción animal. Los estudios realizados sobre las propiedades de los propóleos han demostrado su efecto positivo tanto en humanos como en la salud animal.

Algunas industrias alimenticias, han incrementado sus esfuerzos en la obtención de productos naturales con contenidos antimicrobianos y antioxidantes para adicionarlos en sus producciones buscando así la obtención de vida útil de sus productos finales, retardando y disminuyendo el proceso de peroxidación lipídica y bacterias de putrefacción que generan pérdidas económicas durante el procesamiento y almacenamiento de productos finales (Chem *et al.* 2005).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. *Ubicación y Características agroclimáticas.*

El presente trabajo se realiza como parte de los objetivos y resultados del proyecto titulado: evaluación de métodos de recolección de propóleos de abejas *Apis mellifera*, la bioactividad de sus extractos etanólicos y el desarrollo de un prototipo terapéutico en la región del Sumapaz. Financiado mediante convocatoria interna de la Universidad de Cundinamarca al grupo de investigación BIOGUAVIO/AGROUDEC categoría B en COLCIENCIAS.

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 (Tabla 3). 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.

Tabla 3. Descripción de sitios experimentales

UBICACIÓN	COBERTURA VEGETAL	COORDENADAS	ALTITUD (msnm)	TEMPERATURA (°C)
Guavio (Fusagasugá)	Vegetación tipo agropecuario	4°16.524' N 74°23.537' W	1527	23°C
Espinalito (Fusagasugá)	Vegetación arbustiva	4°19.268' N 74°24.133' W	1427	22°C
Gúchipas (Pasca)	Vegetación tipo agropecuario	4°19.279' N 74°19.122' W	2092	16°C

(Google earth 2016)

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.



Imagen 1. Ubicación satelital de los apiarios (Google earth., 2016)

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 las figuras 2, 3 y 4 se muestran la distribución de cada colmena en cada apiario, teniendo en cuenta que no se afectó el orden original dentro de cada producción.

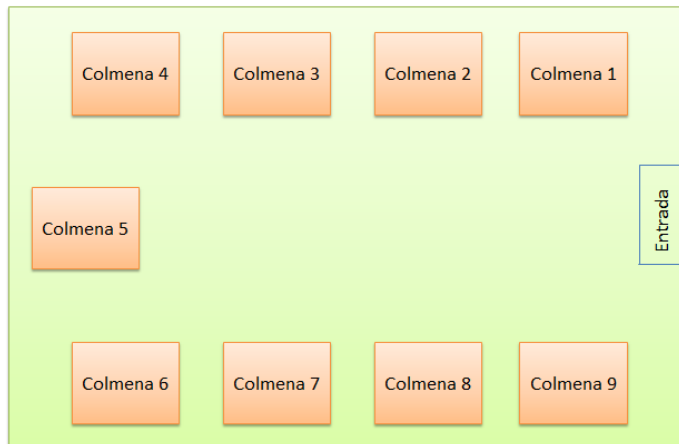


Imagen 2. Distribución de las colmenas en Guavio

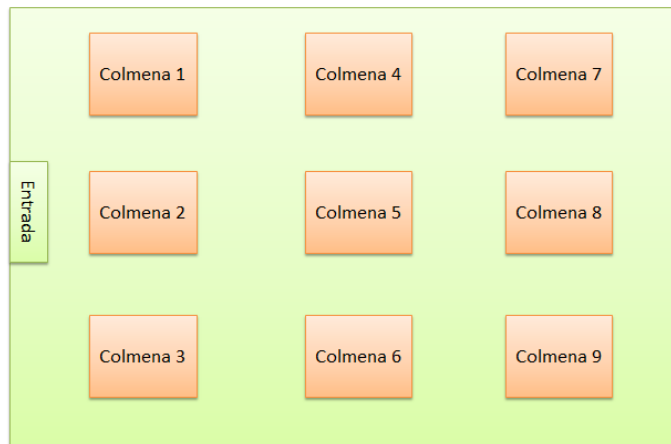


Imagen 3. Distribución de las colmenas en Espinalito

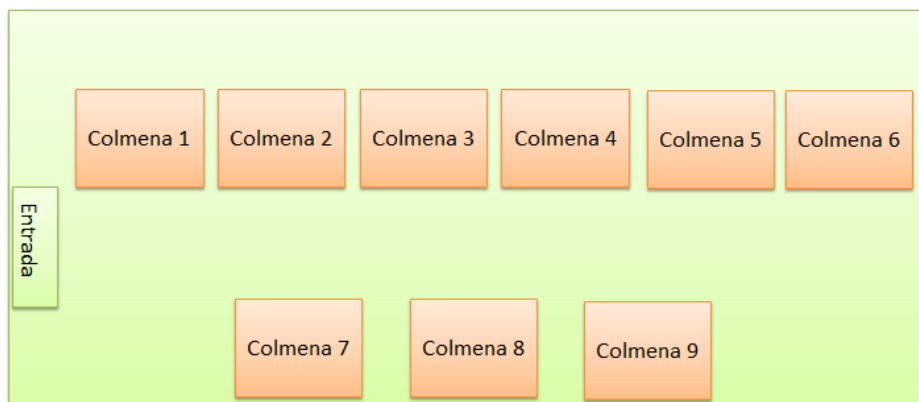


Imagen 4. Distribución de las colmenas en Pasca

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 (Tabla 2.).

4.1.1. Métodos de recolección

Los métodos de recolección evaluados durante el trabajo de campo fueron los siguientes:

- El método de raspado consiste en obtener el propóleo depositado por las abejas en la parte superior de la colmena entre los cuadros y la tapa interna, valiéndose de una palanca de acero inoxidable.



Imagen 5. Recolección de propóleo por el método de raspado (www.oni.escuelas.edu.ar).

- La malla plástica consiste en una matriz rígida con aberturas trapezoidales y que en la parte más angosta tiene menos de 5 mm de amplitud, esta malla es colocada en contacto con las abejas, permitiendo la entrada de corrientes de aire pero no de luz. La malla se instala sobre la parte superior de la colmena, luego se sobrepone un

marco de ventilación en madera con aberturas para separar la malla de la tapa.



Imagen 6. Método de recolección de propóleo por medio de malla (Autores).



Imagen 7. Malla de propóleo con marco de ventilación (Autores)

- El método de colector fue adaptado de modelos brasileiros como el CPI (Inoue et al, 2007) el cual consistió en usar una malla plástica proporcionada al tamaño de los laterales de las colmenas y forradas en plástico transparente facilitando la entrada de luz.



Imagen 8. Colector de propóleo adaptado (Autores).



Imagen 9. Recolección de propóleo en colector adaptado (Autores).

4.2. Tratamientos

Los tratamientos elaborados para esta investigación están descritos en la tabla 3.

Tabla 4. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Descripción
(T1)	Colmena ubicada en Guavio a 1527 m.s.n.m con el método de recolección por raspado
(T2)	Colmena ubicada en Guavio a 1527 m.s.n.m con el método de recolección por malla
(T3)	Colmena ubicada en Guavio a 1527 m.s.n.m con el método de recolección por colector
(T4)	Colmena ubicada en Espinalito a 1427 m.s.n.m con el método de recolección por raspado
(T5)	Colmena ubicada en Espinalito a 1427 m.s.n.m con el método de recolección por malla
(T6)	Colmena ubicada en Espinalito a 1427 m.s.n.m con el método de recolección por colector
(T7)	Colmena ubicada en Pasca a 2092 m.s.n.m con el método de recolección por raspado
(T8)	Colmena ubicada en Pasca a 2092 m.s.n.m con el método de recolección por malla
(T9)	Colmena ubicada en Pasca a 2092 m.s.n.m con el método de recolección por colector

4.3. 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 propóleos y microbiológicas del propóleo. Dichas variables se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Cuadro de distribución de tratamientos y réplicas

F1 (A) Zona	F2 (B) Altitud (m.s.n.m.)	F3 (C) Método de recolección	Interacción	Tratamientos	Réplicas		
					R1	R2	R3
1 Guavio	1 (1527)	1 (Raspado)	1;1;1	T1	T1R1	T1R2	T1R3
		2 (Malla)	1;1;2	T2	T2R1	T2R2	T2R3
		3 (Colector)	1;1;3	T3	T3R1	T3R2	T3R3
2 Espinalito	2 (1427)	1 (Raspado)	2;2;1	T4	T4R1	T4R2	T4R1
		2 (Malla)	2;2;2	T5	T5R1	T5R2	T5R3
		3 (Colector)	2;2;3	T6	T6R1	T6R2	T6R3
3 Pasca	3 (2092)	1 (Raspado)	3;3;1	T7	T7R1	T7R2	T7R3
		2 (Malla)	3;3;2	T8	T8R1	T8R2	T8R3
		3 (Colector)	3;3;3	T9	T9R1	T9R2	T9R3

Tabla 6. Variables evaluadas en el experimento

Variables	Tipo	Método de evaluación
Productivas	Producción total	Peso
	Organoléptico	Sensorial
Fisicoquímicas del propóleo	% Sólidos Solubles	Dsecado
	Totales	
	Fenoles totales	Espectrofotometría
Microbiológicas	Concentración	
	Mínima Inhibitoria (CMI)	Microdilución en caldo y Agar

4.4. Análisis estadístico

Los datos u observaciones de las variables se sometieron a análisis estadístico, acorde al diseño experimental planteado, para ello, se calcularon estadígrafos de tendencia central como la media y de dispersión como la desviación estándar y el coeficiente de variación; posteriormente los datos de las variables se sometieron a análisis de varianza de doble vía trabajando con el paquete informático Infostat versión 2014. Cuando se presentaron diferencias estadísticas, se seleccionó el test de comparación múltiple de Duncan.

4.5. Producción de propóleos

4.5.1. En campo

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.).



Imagen 10. Recolección de propóleo (Autores)



Imagen 11. Adecuación de las colmenas (Autores)



Imagen 13. Supervisión de las colmenas (Autores)



Imagen 12. Embalaje y codificación de las muestras de propóleo

4.5.2. En laboratorio

Se pesaron las muestras en recipientes numerados y almacenando a 0°C en completa oscuridad, con el fin de preservar las propiedades bioquímicas de las muestras. Se realizó una matriz para llevar la información de la producción de cada tratamiento, al finalizar el periodo de recolección, se realizó la sumatoria del peso total recolectado por modelo evaluado.



Imagen 16. Almacenaje de propóleo crudo en bolsa hermética (Autores)

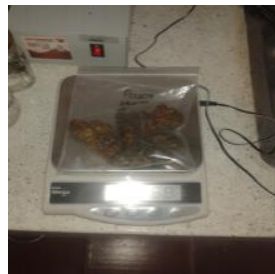


Imagen 15. Pesaje de propóleo crudo (Autores)



Imagen 14. Almacenamiento en frío. (Autores)

4.6. 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, clasificándose en buena calidad (a), calidad media (b) y calidad inferior (c). La prueba de consistencia se realizó por medio de un análisis físico y visual de las muestras de propóleo.

4.7. 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).



Imagen 18. Extracto etanólico de propóleo (Autores).



Imagen 17. Filtración del EET (Autores)

4.8. 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)

4.9. 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 (1×10^8 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.

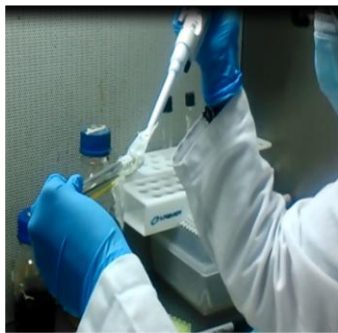


Imagen 21. EEP al 96% concentración de 3,2 mg/ml (Autores)

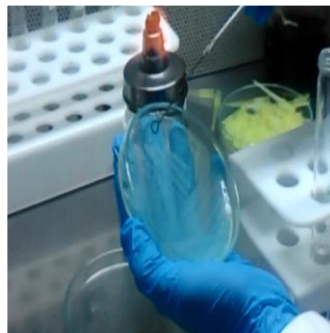


Imagen 20. Aislamiento de la colonia. (Autores)



Imagen 19. Incubación (Autores)

De esta manera se consiguieron las diluciones o concentraciones (mg/ml) de EEP, a probar. De la suspensión bacteriana 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.

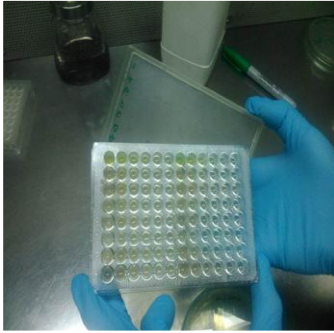


Imagen 22. Bacterias incubadas (Autores)

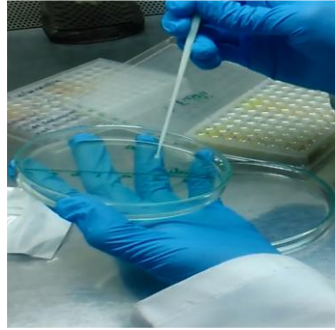


Imagen 24. Subcultivo con asa calibrada 1 µl (Autores)

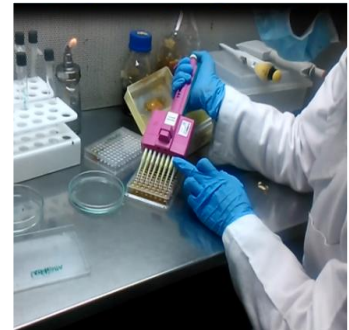


Imagen 23. Adición del propóleo (Autores)

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.

4.10. Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas utilizadas en el laboratorio se encuentran descritas en la tabla 7.

Tabla 7. Técnicas analíticas de cada variable

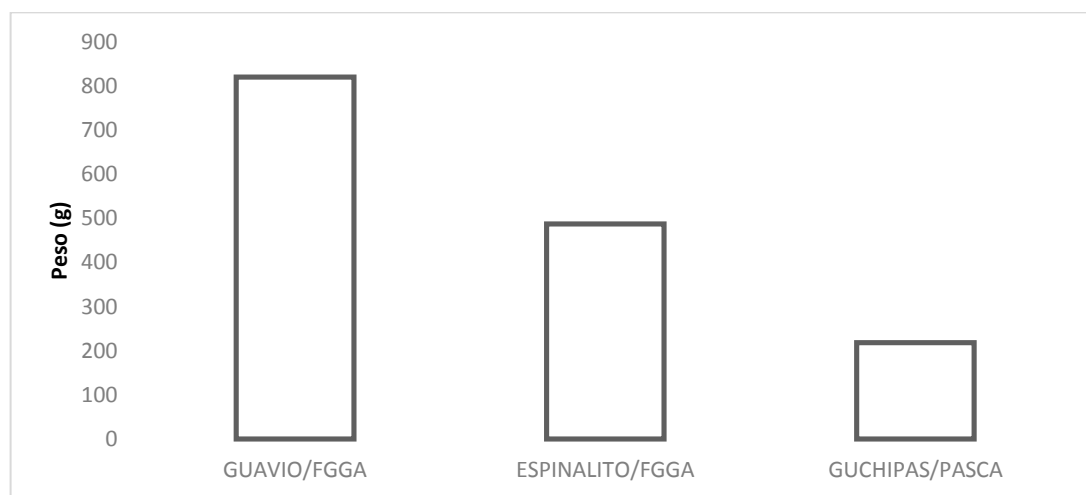
Variable	Unidad	Técnica Analítica
Sólidos Solubles	%	Secado en el medidor de humedad PRECISA® XM120
Fenoles Totales	g/ml	Espectrofotometría UV-Vis a $\lambda=690$ nm con ácido gálico como estándar (Anexos)
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	mg/ml	Microdilución en caldo y sub cultivo de bacterias <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella</i> ATCC 14028 en Agar Muller Hilton

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. 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).

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

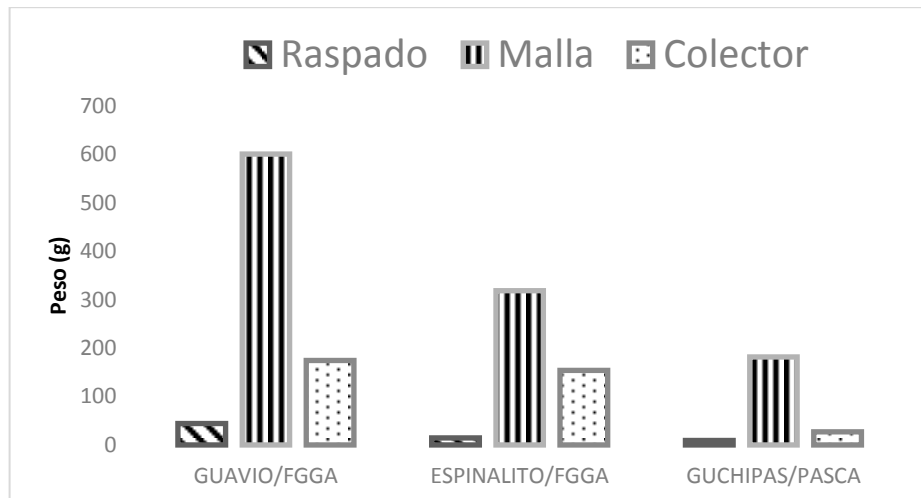


En la zona del Guavio el método de recolección por raspado tuvo los rendimientos más bajos en cuanto a producción, inicialmente se obtuvieron 22 g que fueron disminuyendo en cada cosecha, logrando un peso final de solo 44,1 g. Resultados similares se presentaron en las zonas de Espinalito y Pasca los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



En la tabla 8, se muestra el análisis de varianza en la producción de propóleo crudo en los tres sitios experimentales. El análisis de varianza en doble vía para la variable del método de recolección indica que la implementación de un medio de producción alternativo influye en la cantidad de propóleo obtenido al final del experimento, ($P < 0,01$), mientras que las variables como la altura y la zona no tuvieron incidencia en la producción total ($P > 0,05$).

Tabla 8. Análisis de varianza de la producción de propóleo.

Variable	N	R	R Aj	CV
Producción total de propóleo	27	0,68	0,68	15,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	3,24	8	0,41	4,79	0,0028
Método de recolección (a)	2,44	2	1,22	14,42	0,0002
Altitud (b)	0,73	2	0,36	4,3	0,0297
Zona (c)	0	0	0	-	-
axb	0,07	4	0,02	0,22	0,9229
axc	0,00	0	0,00	-	-
bxc	0,00	0	0,00	-	-
axbxc	0,00	0	0,00	-	-
Error	1,52	18	0,08		
Total	4,76	26			

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. (Tabla 9). 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.

Tabla 9. Test Duncan x Método

Test: Duncan Alfa= 0,01			
Error: 0,0846 Gl: 18			
Método de recolección	Medias	n	E.E.
Raspado	1,53	9	0,1 A
Colector	1,87	9	0,1 A B
Malla	2,26	9	0,1 B

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) 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 (Tabla 10).

Tabla 10. Test DUNCAN x Altura

Test: Duncan Alfa= 0,01			
Error: 0,0846 Gl: 18			
Altitud (m.s.n.m)	Medias	n	E.E.
3	1,69	9	0,10 A
2	1,87	9	0,10 A
1	2,09	9	0,10 A

Infostat (2014)

En cuanto a la zona no se reportan datos dentro del analisis de varianza, sin embargo, el test de comparacion múltiple de Duncan indica que no se presentaron diferencias estadísticas (tabla 11) y por lo tanto la cantidad total del propóleo producido no se vio influenciada por la ubicación de las colmenas.

Tabla11. Test DUNCAN x Zona

Test: Duncan Alfa= 0,01			
Error: 0,0846 Gl: 18			
Zona	Medias	n	E.E.
Pasca	1,69	9	0,1 A
Espinalito	1,87	9	0,1 A
Guavio	2,09	9	0,1 A

En la figura 3 se muestran promedios con letras iguales indicando que no se presentan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$), lo cual indica que la variable dependiente (producción de propóleo) no se vio afectada por el tipo de cobertura vegetal existente en cada zona. Comparando la producción de propóleo por método de recolección, raspado y malla presentan diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,05$) demostrando que el método por malla representa un aumento en la producción de propóleo; en cuanto al método de recolección por colector la grafica demuestra que no existen diferencias estadísticas entre este método frente a malla y raspado ($P > 0,05$). (Figura 4), lo cual indica que la producción de propóleo implementando colector adaptado representa una producción promedio entre malla y raspado.

Figura 4. Comparación de la producción de propóleo por método

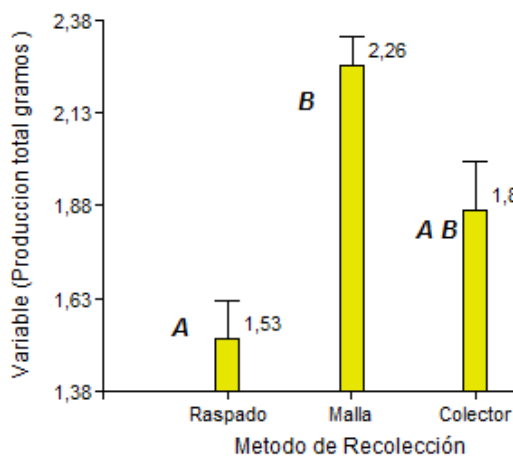
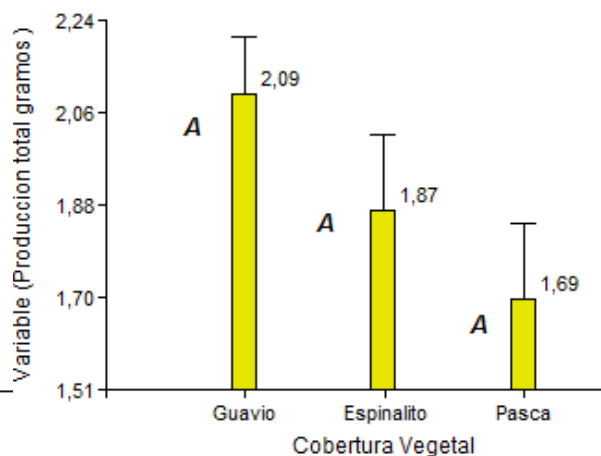


Figura 3. Comparación de la producción de propóleo por zona



Según el análisis estadístico, la altitud afectó la variable dependiente, debido a que el valor de $P = 0,0297 > 0,05$ pero superior a 0,01. En cuanto al método de

recolección, su inclusión afecta en gran medida la variable dependiente (producción), siendo el valor de $P > 0,01$ causando estadísticamente efectos altamente significativos. Las interacciones no presentan datos excepto Altura x método de recolección, en el cual el valor de $P > 0,05$ lo que indica que no se presentan diferencias estadísticas entre los promedios de la producción. (Tabla 12).

Tabla 12. Resumen estadístico

FV	P_Valor	VARIABLE DEPENDIENTE	
		Producción	
Zona (A)	-	-	-
Altitud (B)	0,0297	*	*
M. Recolección (C)	0,0002	**	**
AxB	-	-	-
AxC	-	-	-
BxC	0,9229	NS	NS
AxBxC	-	-	-

- No hay datos

* Se presentan diferencias estadísticas significativas entre los promedios de las VD por causa de las VI

** Las VI causaron efectos altamente significativos sobre las VD

NS No se presentan diferencias estadísticas entre los promedios de la VD por causa de la VI

5.2. Caracterización organoléptica

Los resultados de las diferentes características obtenidas de las muestras de propóleo se encuentran registrados en la tabla 13. 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%). Las 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.

Tabla 13. Características organolépticas de tres diferentes zonas geográficas

Zona	TT	COLOR	OLOR	SABOR	ASPECTO	CONSISTENCIA	PESO (g)	CALIDAD
GUAVIO	MALLA	Marrón oscuro con tintes rojos	Resinoso	Picante	Trozos irregulares opacos	Maleable	155,2	b*
		Marrón claro con tintes	Aromático	Insípido	Trozos irregulares opacos	Maleable	160,6	b*
		Marrón claro con tintes	Aromático	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	261,7	b*
	RASPADO	Marrón oscuro	Resinoso agradable	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	17,6	b*
		Marrón oscuro	Resinoso agradable	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	7	b*
		Marrón claro con tintes	Resinoso agradable	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	9,8	b*
	COLECTOR	Marrón claro con tintes	Aromático	Insípido	Trozos irregulares opacos	Granulado	46,1	b*
		Marrón claro con tintes	Aromático	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	110,3	b*
		Marrón oscuro con tintes rojos	Resinoso agradable	Picante	Trozos irregulares brillantes	Maleable	45	b*
ESPINALITO	MALLA	Marrón claro con tintes	Resinoso	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	201,5	b*
		Marrón claro con tintes	Resinoso	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	61,6	b*
		Marrón oscuro	Aromático	Insípido	Trozos irregulares opacos	Maleable	26,2	b*
	RASPADO	Marrón oscuro	Aromático	Insípido	Trozos irregulares opacos	Rígido	5,4	b*
		Marrón oscuro	Resinoso agradable	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	6,5	b*
		Marrón oscuro	Aromático	Picante	Trozos irregulares opacos	Maleable	1	b*
	COLECTOR	Marrón oscuro	Resinoso agradable	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Rígido	1,8	b*
		Marrón claro con tintes	Aromático	Insípido	Trozos irregulares opacos	Maleable	27	b*
		Marrón claro con tintes	Aromático	Insípido	Trozos irregulares opacos	Maleable	123,2	b*
PASCA	MALLA	Marrón oscuro con tintes rojos	Resinoso	Picante	Trozos irregulares brillantes	Maleable	73,9	b*
		Marrón oscuro con tintes rojos	Aromático	Insípido	Trozos irregulares brillantes	Maleable	31	c**
		Marrón oscuro	Resinoso	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	37	b*
	RASPADO	Marrón oscuro	Resinoso	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Rígido	1,2	b*
		Marrón claro con tintes	Resinoso	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Rígido	2,2	b*
		Marrón oscuro con tintes	Resinoso	Resinoso	Trozos irregulares opacos	Maleable	0,9	b*
	COLECTOR	Marrón oscuro	Aromático	Picante	Trozos uniformes opacos	Maleable	24,5	b*
		Marrón oscuro con tintes	Aromático	Picante	Trozos irregulares opacos	Maleable	2,4	b*
		Marrón oscuro	Resinoso	Picante	Trozos uniformes opacos	Maleable	24,2	b*

Autores (2016)

a (Buena calidad) *b (calidad media) **c (baja calidad)

Para diferenciar la calidad de los propóleos se consultó la Tipificación de Calidad CEDIA para propóleos en bruto (Maidana *et al*, 2011). Se presentan variaciones en las características evaluadas dependiendo básicamente de factores geográficos y climáticos de las zonas. Las zonas estudiadas poseen especies vegetales de interés apícola; plantas arbóreas, arbustivas y plantas rastreras, muchas de ellas endémicas, cuya composición es muy variada. La coloración de las muestras de propóleos en general depende en gran parte de la cantidad de flavonoides del mismo, aunque la cera influye y disminuye la calidad de este producto. (Yoong, 2014). Las muestras que presentan diversidad de colores corresponde la variabilidad vegetal de la zona (Ortega, *et al*. 2011). Los resultados indican que hay una clara tendencia de los propóleos a presentar sabores resinosos en los tres sitios experimentales. La ausencia de brillo de algunas muestras corresponde a la fitogeografía de la zona y la oxidación externa que sufre la resina (Lozina *et al*, 2010).

5.2.1 Color

Los porcentajes más altos obtenidos en este corresponden a las muestras de color marrón claro con tintes (37,03%); Propóleos color marrón oscuro (40,7%), en otros estudios realizados como el de López *et al.*,(2000) respecto al color reporta los porcentajes más altos correspondientes a tintes castaños 26% seguido de marrón claro 22%, en otro estudio este mismo autor reporta porcentajes de color marrón oscuro del 50-70%; Viloría *et al* 2012 reporta en su estudio que el color que prevaleció en las muestras estudiadas fue marrón oscuro (72,23%), seguido de café oscuro con tintes amarillos (16,67%) y finalmente se reporta una coloración del 65% de las muestras con color marrón oscuro, un 20% marrón claro con tintes amarillos, un 10% marrón con tintes castaños y un 5% marrón claro con tintes castaños en el estudio realizado por Maidana *et al* (2011). La coloración de las muestras de propóleos en general depende en gran parte de la cantidad de flavonoides del mismo, aunque la cera influye y disminuye la calidad de este

producto. (Yoong, 2014). Las muestras que presentan diversidad de colores corresponde la variabilidad vegetal de la zona (Ortega, *et al.* 2011). Los resultados indican que hay una clara tendencia de los propóleos a presentar sabores resinosos en los tres sitios experimentales. La ausencia de brillo de algunas muestras corresponde a la fitogeografía de la zona y la oxidación externa que sufre la resina (Lozina *et al.*, 2010).

5.2.2 Olor

En cuanto al olor se evidenciaron tres predominantes en el estudio, resinoso (33,3%), aromático (44,4%) y resinoso agradable (22,2%), comparables con el estudio realizado por Maidana *et al* (2011) que encontró olor del 75% de las mismas fue resinoso, por otra parte en trabajos realizados por López *et al*, 2003 se obtuvieron resultados en cuanto a olor resinoso aromático 37% resinoso 21% y en otro de sus trabajos resinoso aromático 50-100%, Viloría *et al* 2012 reporta en su estudio que los olores dominantes en el propóleo fueron resinoso suave y resinoso aromático, correspondiendo a un 44,45% y 33,34%, respectivamente.

5.2.3 Sabor

El sabor de las muestras de propóleo obtuvo tres diferentes valores, picante (26%), insípido (26%) y resinoso (48%) en otro estudio se reporta otra valoración correspondiente a amargo que en ese caso fue del 100% reportado por López *al* 2003. Otras muestras de propóleos caracterizadas por Viloría *et al* (2012) muestran resultados de sabores insípidos (72,22%) y amargos (27,78%) que se diferencian con los obtenidos en este estudio.

5.2.4. Consistencia

Las prueba de consistencia que se realizó a temperatura ambiente, mostró que el 81,4% de los propóleos son maleables, 14,81% propóleos rígidos y propóleos granulados con apenas 3,70%, Maidana *et al* 2011 reporta que el 100 % de las

muestras presentaron estructura maleable, por otra parte López *et al* (2003) en dos diferentes estudios reporto valores correspondientes a estructura maleable (36%) y rígida (43%) en su primer estudio y maleable (75%) en el segundo estudio realizado, finalmente Vilorio *et al* (2012) reporta un análisis de consistencia realizados a diferentes muestras indicando que el 66,67% son poco maleables y el 33,33% rígidas.

5.2.5. Aspecto

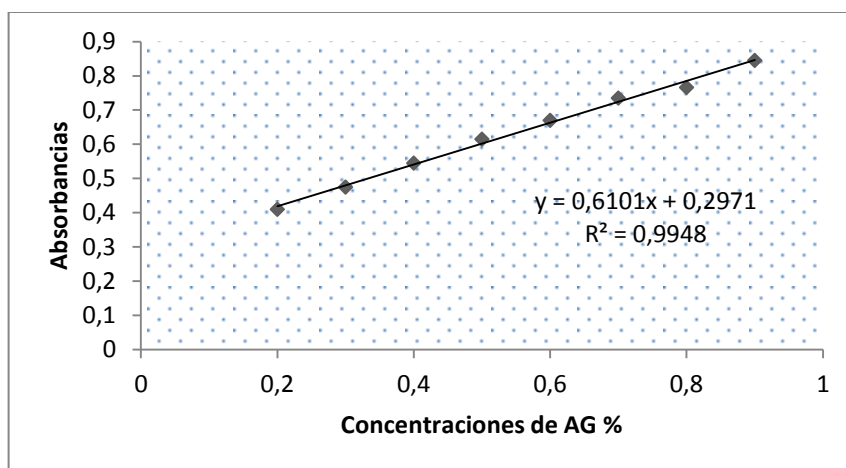
Por último el aspecto de trozos irregulares opacos prevaleció en el 81,4% de las muestras, los trozos irregulares brillantes y los trozos uniformes opacos presentaron valores de 11,1% y 7,4% respectivamente, resultados diferentes fueron obtenidos por Maidana *et al* (2011) quien reporto el 45% presentó un aspecto de trozos irregulares con brillo, el 30% uno de trozos irregulares con poco brillo y el resto como trozos irregulares opacos. López *et al* (2003) reporta resultados correspondientes a trozos irregulares opacos 36% y trozos irregulares con brillo 36 %, destacando que los resultados obtenidos en las tres zonas geográficas fueron mucho más altos en cuanto a trozos irregulares opacos.

5.3. 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 R^2 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



Diferentes autores han utilizado el contenido fenólico como un parámetro químico para definir la calidad del propóleo. Así, Kumazawa *et al* (2004) analizaron algunos propóleos de diferentes orígenes geográficos (Argentina, Australia, Brasil, Bulgaria, Chile, China, entre otros), encontrando que los valores de fenoles van desde 31.2 hasta 299 mg/g, estando la mayoría por encima de 200 mg/g. Por su parte Anh *et al.*, (2004, 2007) reportaron que los extractos de propóleos de Corea y China tienen altos contenidos de fenoles, los cuales varían desde 85 hasta 283 mg/g de extracto y desde 42.9 hasta 302 mg/g de extracto, respectivamente; mientras que en otro trabajo desarrollado por Moreira *et al.*, (2008) se determinó que el contenido de fenoles de dos propóleos de Portugal es de 151 y 329 mg/g.

Posterior a esto se realizó el mismo procedimiento pero ahora con las muestras de propóleo obtenidas en cada una de las zonas y por diferentes métodos de recolección para así obtener sus absorbancias (Tabla 14).

Tabla 14. Absorbancias y concentración de las muestras de propóleo por triplicado

Zonas	Ttos	Triplicados						Promedio
		Absorbancia 1	Concentración (mg/ml)	Absorbancia 2	Concentración (mg/ml)	Absorbancia 3	Concentración (mg/ml)	
Guavio	Guavio malla	0,459	64,98	0,468	68,72	0,462	66,22	66,64
	Guavio colector	0,48	73,71	0,49	77,87	0,483	74,96	75,51
	Guavio Raspado	0,506	84,53	0,518	89,52	0,511	86,61	86,88
Espinalito	Espinalito malla	0,647	143,18	0,659	148,17	0,651	144,84	145,40
	Espinalito colector	0,437	55,82	0,449	60,82	0,442	57,90	58,18
	Espinalito raspado	0,488	77,04	0,495	79,95	0,486	76,21	77,73
Pasca	Pasca colector	1,004	291,68	1,016	296,67	1,018	297,50	295,29
	Pasca malla	0,725	175,62	0,728	176,87	0,717	172,30	174,93

Autores (2016)

El contenido de fenoles en propóleos han sido considerados como un parámetro importante que establece tanto la calidad del mismo, como su potencial de actividad biológica; por ello normatividades de otros países como Brasil (Ministerio de Agricultura de Brasil- APACAME, 1999) y Argentina (Norma IRAM-INTA, 2004) establecen algunos valores de estos compuestos con el fin de definir requisitos mínimos de calidad. Los compuestos fenólicos, entre los cuales se incluyen los flavonoides, representan un índice de la calidad del producto final. Cuanto mayor sea el porcentaje de estos componentes, mayor será también la pureza y calidad, por consiguiente su precio será mucho más alto siendo así un subproducto rentable y de fácil extracción.

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 ($F > 0,05$) (Tabla 19). 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.

(Rodríguez *et al*, 2012) en su trabajo “caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de atlántico, Colombia” reportaron resultados de 63,72-94,55 mg/g de compuestos fenólicos que podrían compararse con los obtenidos en este estudio resaltando que algunos de estos están dentro de los rangos reportados por el autor, es el caso de espinalito con los tratamientos colector y raspado y en la zona geográfica de Guavio en todos los tratamientos estudiados,(57,90 y 76,21; 66,22,74,96 y 86,61) respectivamente. Siendo los nuestros en algunas zonas geográficas más altos. Dentro de los rangos de este estudio frente a los reportados por (Ryeon *et al*, 2007) 42,9-302 en contenidos fenólicos son los más cercanos y semejantes pero desarrollados en diferentes países.

La variación en la composición de los propóleos ha sido descrita previamente y puede variar por diferentes factores como las características geográficas y climáticas donde fueron colectadas las muestras, también a la vegetación que las abejas tienen acceso para elaborar la resina y la especie de abeja, entre otros (Bankova, 2005). Estudios previamente relacionados con la composición del propóleos en otros países permiten concluir que aunque los flavonoides son las

principales sustancias activas, también se pueden encontrar otro tipo de metabolitos (lignanós, benzofenonaspreniladas, ácidos diterpénicos, ácidos coumáricos y ciná- micos con sus respectivos ésteres), como los responsables de la actividad biológica (Bankova, 2005). En nuestro caso en algunas de las zonas menos productivas se encuentran los valores más altos en cuanto a fenoles se trata, es el caso del municipio de pasca donde se encuentra uno de los valores más bajos productivos de 20,70 gr y en contenido de fenoles el valor más alto del estudio, correspondiente a 295,29 mg/g, demostrando que no hay una relación en cuanto a alta producción y altos contenidos fenólicos.

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) $232 \pm 22,3$ 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.

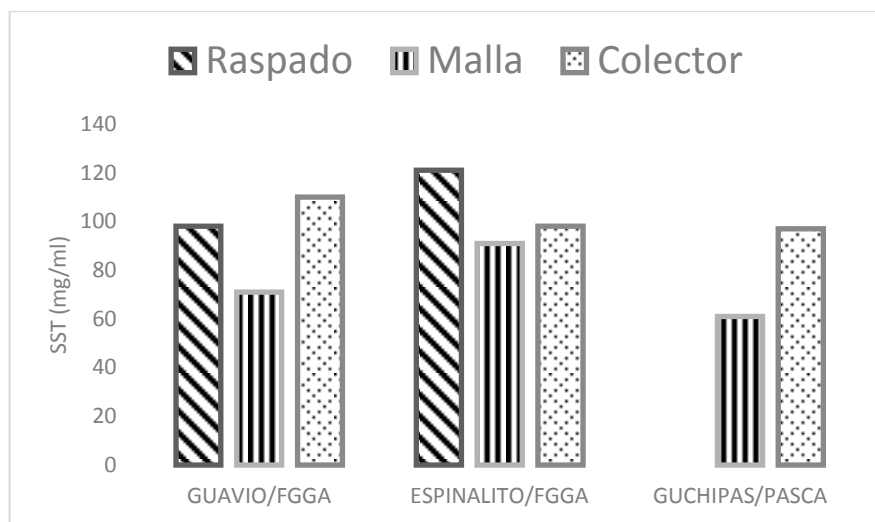
Finalmente se destaca que todas las muestras analizadas superan el requisito mínimo, establecido por la legislación brasilera (Ministerio de Agricultura, 2001) y argentina (Norma iram-inta. 2004) para la presencia de compuestos fenólicos, como determinante de la calidad. Siendo superado este parámetro 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.

5.4. 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).

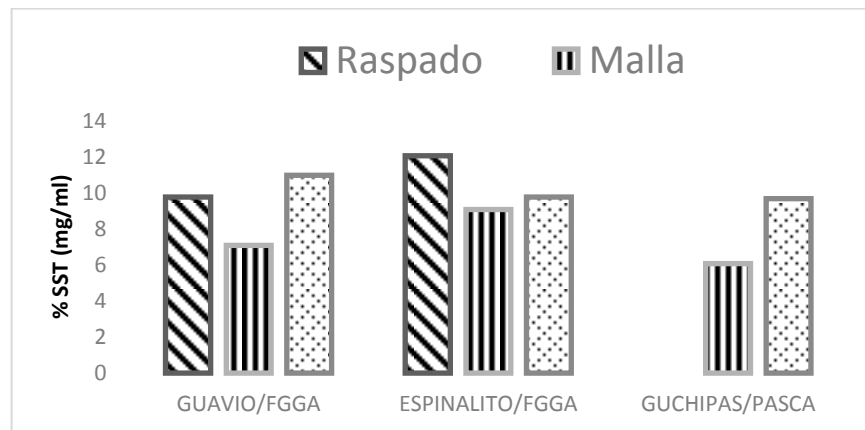
Figura 6. Concentración de sólidos solubles totales



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 7. 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.

5.5. 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. (Figura 8).

Tabla 15. Actividad antimicrobiana contra *E. coli*

Actividad antibacteriana contra <i>E. coli</i>									
N° de dilución		1	2	3	4	5	6	CMI	Tiempo (Horas)
Tratamiento		3, 2	1, 6	0, 8	0, 4	0, 2	0, 1	(mg/ml de agar)	
	Control Alcohol	96%	B	B	C	C	C	1,6	24
1	Guavio Raspado	96%	B	B	B	B	C	0,4	24
2	Guavio malla	96%	B	B	B	C	C	0,8	24
3	Guavio colector	96%	B	B	B	C	C	0,8	24
4	Espinalito raspado	96%	B	B	B	C	C	0,8	24
5	Espinalito malla	96%	B	B	B	C	C	0,8	24
6	Espinalito colector	96%	B	B	B	B	C	0,4	24
7	Pasca raspado	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Pasca malla	96%	B	B	B	C	C	0,8	24
9	Pasca colector	96%	B	B	B	C	C	0,8	24

Bactericida (B)

Crecimiento (C)

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 antibacterial 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 8. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (mg/ml) de EEP en *E. coli*



Tabla 16. Actividad antimicrobiana contra *Salmonella*

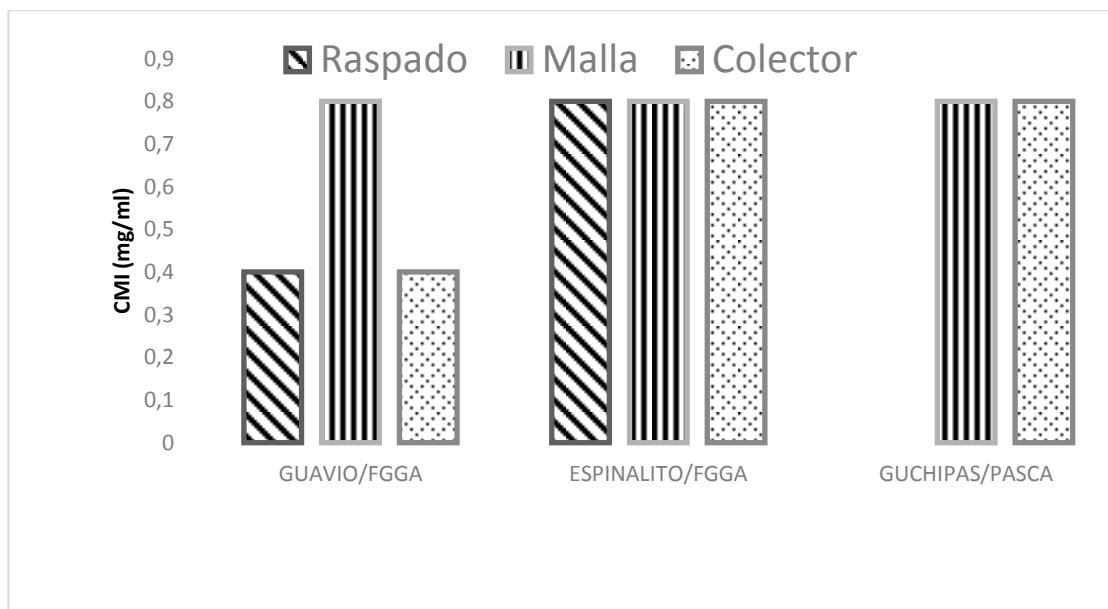
Actividad antibacteriana contra <i>Salmonella</i>										
N° de dilución			1	2	3	4	5	6	CMI	Tiempo (horas)
	Tratamiento		3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	(mg/ml de agar)	
	Control alcohol	96%	B	B	B	C	C	C	0,8	24
1	Guavio raspado	96%	B	B	B	B	C	C	0,4	24
2	Guavio malla	96%	B	B	B	C	C	C	0,8	24
3	Guavio Colector	96%	B	B	B	B	C	C	0,4	24
4	Espinalito raspado	96%	B	B	B	C	C	C	0,8	24
5	Espinalito malla	96%	B	B	B	C	C	C	0,8	24
6	Espinalito colector	96%	B	B	B	C	C	C	0,8	24
7	Pasca raspado	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Pasca malla	96%	B	B	B	C	C	C	0,8	24
9	Pasca colector	96%	B	B	B	C	C	C	0,8	24

Bactericida (B)

Crecimiento (C)

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 9).

Figura 9. 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 fué de apenas 5,7 g y su extracto se evaporó antes de ser analizado, por lo cual fue excluido en esta parte del procedimiento.

6. 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 está 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 Brasilera 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.

6.1. RECOMENDACIONES

Se recomienda a los productores hacer uso de los diferentes métodos de recolección alternativos al de raspado, obteniendo así diferencias productivas considerables, teniendo en cuenta que el método por malla presentó los mejores resultados productivos.

Para los interesados en producciones apícolas se recomienda tener apiarios dentro de rangos de altura 1527 msnm y 2092 msnm, pues estos muestran producciones sobresalientes en cuanto a propóleo se refiere.

El contenido de fenoles totales está intrínsecamente relacionado con la flora vegetal circundante a las abejas, condiciones medioambientales de la zona como temperatura y altitud, por ello en cada una de las localizaciones de los apiarios este contenido siempre variará, y se hace necesario realizar el análisis en cada una de las muestras obtenidas por zona.

Quien obtenga resultados en cuanto a fenoles totales debe hacer una comparación con normas internacionales para verificar la calidad y aceptación del mismo en otros países.

Se necesitan más estudios relacionados a la actividad antibacteriana de los propóleos para lograr una estandarización en el país en busca del uso de este subproducto como alternativa frente a antibióticos convencionales.

Es importante hacer un seguimiento a los estudios realizados en el país para lograr una tipificación y normatividad propia de nuestro país que se acerque más a nuestra diversidad vegetal y arbórea, así como también a nuestros ambientes y temperaturas. Por otra parte se recomienda el uso de mallas plásticas y colectores

inteligentes para un aumento de la producción, aclarando que para ello se debe realizar un análisis de la zona para verificar su viabilidad.

Continuar con los trabajos de investigación en el país, en busca de una normatividad de calidad no solo para este subproducto apícola, sino para todos los demás. Por medio de estos estudios se refleja la importancia de la apicultura en el país, por ello se debe continuar con su producción y expansión en diferentes zonas del país.

7. 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&inea=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 from 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 or 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 antifungica 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 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. Martínez *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 propóleos 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. Rodriguez *et al*, Y. (2012). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propoleos recolectados en el departamento del atlantico, 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 denominacion 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). *Caracterizacion botanica de los propoleos producidos en distinto origen geografico en la region apicola i -cuenca 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. Viloría *et al*, J. (2012). Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (antioquia, colombia). *Bioteología 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.

8. ANEXOS

Anexo 1. Test Duncan x Zona

Test: Duncan Alfa= 0,01			
Error: 0,0846 Gl: 18			
Zona	Medias	n	E.E.
Pasca	1,69	9	0,10 A
Espinalito	1,87	9	0,10 A
Guavio	2,09	9	0,10 A

Anexo 2. CMI Salmonella

CMI Salmonella

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Guavio	3	1,6	0,533	0,053
Espinalito	3	2,4	0,800	0,000
Pasca	3	2,4	0,800	0,000
Raspado	3	2	0,667	0,053
Malla	3	2,4	0,800	0,000
Colector	3	2	0,667	0,053

Anexo 3. Análisis de Varianza CMI *Salmonella*

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>FC</i>	<i>P>FC</i>	<i>Ft(0,01)</i>
Métodos	0,14	2,00	0,07	4,00	0,11	18
Zona	0,04	2,00	0,02	1,00	0,44	18
Error	0,07	4,00	0,02			
Total	0,24888889	8				

Anexo 4. CMI *E. coli*

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Guavio	3	2	0,6667	0,0533
Espinalito	3	2	0,6667	0,0533
Pasca	3	2,4	0,8000	0,0000
Raspado	3	2	0,6667	0,0533
Malla	3	2,4	0,8000	0,0000
Colector	3	2	0,6667	0,0533

Anexo 5. Análisis de Varianza CMI *E. coli*

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>FC</i>	<i>P>FC</i>	<i>Ft(0,01)</i>
Zonas	0,0356	2	0,018	0,4	0,6944	18
Métodos	0,0356	2	0,018	0,4	0,6944	18
EE	0,1778	4	0,044			
Total	0,2489	8				

Anexo 6. Análisis de Varianza Fenoles Totales

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>FC</i>	<i>P>FC</i>	<i>Ft(0,01)</i>
Métodos	6,22	8	0,77	0,23	0,97	3,88
Zona	24,73	2	12,36	3,80	0,04	6,22
Error	52,01	16	3,25			
Total	82,96	26				

Anexo 7. Metodología para el Análisis de Fenoles totales

- **Actividad 1: Preparación de ácido gálico, estándar desecado**

Se utilizó una capsula de porcelana lavada y secada en horno a 105°C por 15 minutos, 1 g de Ácido gálico, se llevó a horno con una temperatura de 105°C por 2 horas, posteriormente desecado por 15 min. De esta manera se obtiene el estándar desecado.

- **Actividad 2: Carbonato de sodio al 5%**

Se preparó una solución en agua destilada de carbonato de sodio al 5%. Se realizó una solución total donde se agregaron 250 ml de agua destilada y 25 g de carbonato de sodio en un beaker de 500 ml, luego se agitó hasta disolver completamente (utilizando agitador magnético), posteriormente transferido a un balón aforado de 500 ml. Después se lavó el beaker con agua destilada y se transfirió el agua al balón, aforando con agua destilada hasta 500 ml, agitado 1 minuto y finalmente rotulado.

- **Actividad 3: Preparación de stock Acido Gálico (AG)**

En un beaker de 250 ml se agregó 50 ml de agua destilada y 1 g de ácido gálico desecado, se agitó hasta disolver (utilizando agitador magnético), se transfirió la solución a un balón aforado de 100 ml y se agregó agua destilada hasta aforar, se agitó 20 segundos y se rotuló. Como resultado se obtuvo el Stock de ácido gálico (1g/100ml), de acuerdo a la cantidad de estándares que se vayan a realizar se repite esta actividad.

- **Actividad 4: Estándares de ácido gálico**

Se alistaron 7 balones aforados de 100 ml. Se prepararon 7 estándares con concentraciones diferentes, aforando cada balón con agua destilada. En la tabla 4 se muestran las concentraciones utilizadas.

Tabla 17. Estándares de ácido gálico

Stocks Acido Gálico					
Balón aforado	Estándar	Stock	Agua destilada	Total Balón aforado	Ácido Gálico (mg)
1	St1	90	10	100	900
2	St2	80	20	100	800
3	St3	70	30	100	700
4	St4	60	40	100	600
5	St5	50	50	100	500
6	St6	40	60	100	400
7	St7	30	70	100	300
8	St8	20	80	100	200

- **Actividad 5: Curva de calibración Ácido Gálico**

Se alistaron 8 beaker de 50 ml, lavados y secados en estufa 15 min, desecados 10 min y por último se rotuló. Se adicionaron los siguientes reactivos:

Tabla 18. Curva de calibración de Ácido Gálico

Frascos (Beaker de 50 ml)								
Reactivos	B	1	2	3	4	5	6	7
Agua destilada (ml)	0,125	0	0	0	0	0	0	0
Estándares (ml)	0	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Carbonato de sodio (ml)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Reactivo folin (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Se agitó cada frasco durante 1 minuto. Se agregó agua destilada hasta llegar a 12,5 ml y se agitó 1 min. Se taró y se dejó reposar 15 min.

- **Actividad 6: Medición de estándares en espectrofotómetro de UV**

De cada solución (B,1,2,3,4,5,6,7), se agregaron 5 ml en 1 tubo de ensayo más 5 ml de agua destilada, agitando cada tubo. Luego se pasaron las soluciones a las celdas del espectrofotómetro y se midieron absorbancias utilizando una longitud de onda de 690 nm.

Después de obtener los resultados de la curva de calibración, se pasaron estos valores a Excel 2013 para realizar la gráfica de la curva con su respectiva ecuación, porcentaje de correlación y línea de tendencia de las concentraciones

- **Actividad 7: Toma de absorbancias en muestras de propóleo**

Para correr las muestras obtenidas en el estudio se realizó el mismo proceso de la actividad 5. Se remplazaron los estándares por las muestras agregando los mismos reactivos en igual proporción. A continuación se puede observar la forma de su preparación.

Tabla 19. Soluciones para lectura de muestras

Reactivos	Frascos (Beaker de 50 ml)							
	B	1	2	3	4	5	6	7
Agua destilada (ml)	0,125	0	0	0	0	0	0	0
Muestras de extractos etanólicos de propóleo (ml)	0	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Carbonato de sodio (ml)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Reactivo folin	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

(ml)

Luego de preparar estas soluciones, el proceso fue igual al de la actividad 5. Se midieron las absorbancias de las muestras por triplicado siguiendo los siguientes pasos:

1. Se colocó la absorbancia en cero (100% de transmisión) con agua destilada.
2. Se determinó la absorbancia del blanco
3. Se analizó el estándar o patrón de verificación para evaluar la exactitud de la curva de calibración.
4. Se analizaron las muestras
5. Se repitieron los análisis del blanco

- **Actividad 8: Procesamiento de información**

Obtención de la concentración de compuestos fenólicos a partir de la curva de calibración y las absorbancias obtenidas de las muestras:

De acuerdo a la curva de calibración obtenida con los estándares de ácido gálico, genera unos valores de absorbancia de referencia, para ubicar las absorbancias resultado de las muestras por tratamiento y zona geográfica para así hallar sus concentraciones reemplazando la ecuación de la curva patrón que a continuación se ilustrara:

$$Y = mx + b$$

Pendiente ↑
 ↓ Absorbancia ↓ Concentración
 Intercepto →

Debido a que la concentración es igual a X y se comporta como variable dependiente de Y (Absorbancia). Por tal razón se debe despejar X para obtener la concentración:

$$Y = mx + b$$

Pendiente ↑
 ↓ Absorbancia ↓ Concentración
 Intercepto →
 ↓ Despejar

$$x = \frac{Y - b}{m}$$

Luego de obtener los datos de concentración se calculó un factor de corrección para que los datos de concentración de fenoles totales expresados en mg de ácido gálico / g de muestra sean reales de acuerdo a la concentración de los extractos. Después de obtener los factores de corrección de cada muestra se multiplican por la concentración obtenida de la curva de calibración de ácido gálico de cada uno de los tratamientos.