

## CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE PROPÓLEO CRUDO Y SÓLIDOS SOLUBLES DE EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE *Apis mellifera* EN COLOMBIA

C. Talero<sup>1,2\*</sup>, D. Hernández<sup>1</sup>, J. Figueroa<sup>1</sup>

Artículo recibido: 28 de febrero de 2012; aprobado: 7 de agosto de 2012

### RESUMEN

Se tomaron cincuenta y nueve muestras de propóleo crudo recolectadas en tres orígenes geográficos de Colombia, a las cuales se les realizó control de la calidad microbiológica, y se determinó el porcentaje de extracto seco obtenido de las extracciones etanólicas de propóleo (EEP) al 70 y 96%. Se cuantificaron los grupos indicadores mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *Staphylococcus* sp., mohos y levaduras, y se encontraron conteos en promedio de  $93 \times 10^3$ ;  $79 \times 10^2$ ;  $<1$ ; 94;  $10 \times 10^4$  UFC/g, respectivamente. La detección de patógenos se realizó para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los cuales estuvieron presentes en el 4 y 2% de las muestras, respectivamente. Los hallazgos microbiológicos se compararon con normas de calidad de Japón, Perú y El Salvador; se encontró que el grupo indicador mohos y levaduras fue el más crítico, donde 92 a 94% de las muestras evaluadas estuvieron por fuera de los límites exigidos por estas normas. Los resultados indican que las extracciones con etanol al 70 y 96% de propóleos colombianos, en promedio obtuvieron 93,0 y 175,3 mg/ml de extracto seco, respectivamente. La concentración de extracto seco se comparó con la normatividad existente en Brasil, Argentina y Japón. Para la norma más exigente, que corresponde a la brasileña, se hallaron porcentajes de cumplimiento del 53,4 y 56,1% para EEP 70 y 96%, respectivamente, y para la norma de Japón se encontraron aceptables 75,9 y 69,7% de los EEP 70 y 96%, respectivamente. Los resultados están asociados al origen fitogeográfico y a la producción no especializada de propóleos. En este estudio se incluyeron muestras de propóleo crudo de países como Bélgica, Chile, Cuba y Nueva Zelanda.

**Palabras clave:** propóleos, parámetros, clasificación, normas.

## RAW PROPOLIS MICROBIOLOGIC QUALITY AND SOLUBLE SOLIDS OF *Apis mellifera* PROPOLIS EXTRACTS IN COLOMBIA

### ABSTRACT

Raw propolis samples from three different geographical origins were submitted to the microbiological quality tests and to the extraction of the dry matter using two

<sup>1</sup> Grupo de investigación AYNI Ciencia y Tecnología Apícola, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Cr. 30 nro. 45-03. Bogotá (Colombia).

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Bioguavio/Agroudec, Programa de Zootecnia, Universidad de Cundinamarca, sede Fusagasugá. Diagonal 18 nro. 20-29. Fusagasugá (Colombia).

\* Autor para correspondencia: catalerou@unal.edu.co

ethanol extracts (70 and 96%). The aerobic mesophile, total coliforms, fecal coliforms, *Staphylococcus* sp., molds and yeasts indicator groups were quantified, finding in average  $93 \times 10^3$ ;  $79 \times 10^2$ ;  $<1$ ;  $94$ ;  $10 \times 10^4$  CFU/g respectively. The pathogen detection was made for *Escherichia coli* obtaining 51 samples free of the pathogen and 2 samples with presence of it, and for *Staphylococcus aureus*, which were present in 4 and 2% of the samples respectively. The microbiologic results were compared with the quality standards of Japan, Peru, and El Salvador, finding that the indicator groups molds and yeasts was the most critical, where 92 to 94% of the evaluated samples were off limits of the international standards. These results show that the ethanol extracts made at concentrations of 70 and 96% of Colombian propolis, obtained in average 93.0 and 175.3 mg/ml of dry extract respectively. The concentration of dry extract was compared with the standards of Brazil, Argentina and Japan. For the most strict standard, which is the Brazilian, there were found complying percentages of 53.4 and 56.1% for propolis ethanol extracts (PEE) of 70 and 96% respectively and for the Japan standard they were found acceptable 75.9 and 69.7% of the PEE 70% and 96% respectively. The results are linked to the flora, geographical origins and to the non specialized production methods. This study included raw propolis samples from countries such as Belgium, Chile, Cuba and New Zealand.

**Key words:** propolis, parameters, classification, standards.

## INTRODUCCIÓN

El propóleo o propóleos (propolis, ligamaza, beeglue) se ha definido como una sustancia resinosa de color generalmente pardo rojizo a amarillo verdoso, que colectan las abejas del exudado de plantas y la adición de productos metabólicos secretados por el insecto (Bankova 2005; Chaillou *et al.* 2004), con inclusión de otros materiales durante la elaboración del producto, como el polen (Marcucci 1995). El producto colectado por las abejas (crudo) muestra una alta variabilidad en razón de su estrecha relación con la región geográfica de producción, que puede llegar a presentar distinta cobertura vegetal, dependiendo de las condiciones agroecológicas.

Las abejas en colmenas comerciales generalmente utilizan el propóleo para cubrir los agujeros y las grietas con el fin de reducir la entrada de la colmena

(Krell 1996). Se cree que la utilización de propóleos de esta manera funciona para mantener en mejores condiciones la homeostasis del medio ambiente dentro de la colmena. Esto podría ser el resultado de disminuir el crecimiento microbiano en las paredes de la colmena e impedir el flujo de aire sin control en el nido y las paredes de impermeabilización y la humedad externa, además de crear algún tipo de protección contra los invasores (Visscher 1980, citado en Simone-Finstrom y Spivak 2010).

La composición química del propóleo está estrechamente asociada con el origen botánico (Greenaway *et al.* 1987, citado en Amoros *et al.* 1994). En las zonas templadas, la mayor parte del propóleo procede del exudado de los brotes de chopos o álamos pertenecientes al género *Populus* spp.; en la zona septentrional de Rusia, de los brotes de abedul (*Betula verrucosa*) y de *P. tremula* (Wollenweber y Buchmann 1997);

en las regiones mediterráneas procede de las choperas y de las hojas de *Cistus* spp. (Martos *et al.* 1997); en las zonas donde los álamos no son plantas nativas, tales como Australia y las regiones ecuatoriales de América del Sur, las abejas buscan otras plantas que reúnan las cualidades requeridas para coleccionar los exudados con el fin de elaborar propóleos (Park *et al.* 2002). En Brasil el propóleo procede principalmente de las hojas de especies de *Baccharis dracunculifolia* (Bankova 2000); en Venezuela y Cuba, de la resina floral del género *Clusia*, y en zonas más tropicales se obtiene de otros vegetales (Cuesta-Rubio *et al.* 2002).

En los análisis de la composición química de los propóleos se han identificado al menos 300 compuestos (Mani *et al.* 2006) y hasta 150 compuestos para una misma muestra (Greenaway *et al.* 1990); en la fracción aromática, más de 100 compuestos (Bankova 1987; Greenaway *et al.* 1987, 1988, citado en Amoros *et al.* 1994). Los propóleos están constituidos fundamentalmente por flavonoides, derivados de ésteres y ácidos fenólicos. Los principales grupos fenólicos identificados son: flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas, triglicéridos fenólicos (Bedascarrasbure 2000). Los flavonoides no son los marcadores químicos principales, pero los compuestos menores también pueden ser involucrados en la actividad biológica (Bankova *et al.* 1987, citado en Amoros *et al.* 1994). Existen otros componentes como los triterpenos (Pérez *et al.* 2009); el primer reporte sobre la presencia de este tipo de metabolito secundario fue la identificación del triterpeno acíclico escualeno, precursor de los triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos (Silva *et al.* 1992).

Las investigaciones realizadas en las últimas décadas, orientadas a determinar las propiedades biológicas del propóleo a nivel mundial, han permitido establecer que a los compuestos fenólicos se les atribuye acción farmacológica, quedando establecidas sus propiedades antibiótica, fungicida, antiviral y antitumoral, entre otras (Burdock, 1997). Sin embargo, la presencia de triterpenos pentacíclicos en propóleos brasileños en particular y en propóleos de países tropicales en general, constituye una característica importante de su composición química vinculada a su actividad antiinflamatoria, anticancerígena y antiviral (Pérez *et al.* 2009).

Los lineamientos de calidad para propóleo son complejos, ya que los propóleos presentan diferentes colores, olores y composición; los lineamientos también tienen directa relación con los métodos de extracción, además del cuidado y la higiene, tanto en el almacenamiento como en la conservación del producto.

Los primeros esfuerzos propuestos en cuanto a estándares oficiales de calidad referidos al producto "crudo o bruto" y a veces a sus extractos (forma tradicional de extraer compuestos activos para ser empleados en la industria) iniciaron en los países del Este europeo. Los límites máximos y mínimos para ciertos grupos químicos están determinados, pero son pocas las pruebas estandarizadas que están disponibles para establecer la actividad biológica de varios componentes (López y Ubillós 2004).

En la actualidad, las sustancias que determinan la calidad de los propóleos no se unifican como norma, y cada país o compañía tiene sus propios estándares, incluidos los términos específicos para los propóleos y sus productos relacionados. Los esfuerzos en investigación se enca-

minan entonces hacia la “estandarización internacional de los propóleos” como una de las propuestas para el Foro Mundial de Ciencias del Propóleos (WPSF) (Lee y Jo 2011).

Colombia (Sur América) no posee ningún tipo de normatividad o estándar para el propóleo crudo o sus extractos, aunque se han realizado investigaciones previas alrededor de los propóleos en caracterización antimicrobiana y fisicoquímica (Moreno *et al.* 2007; Palomino *et al.* 2009; Bastos *et al.* 2011a; Samara-Ortega *et al.* 2011; Vilorio *et al.* 2012). Hoy en día, la calidad de este producto y su valor comercial no tienen relación directa; el precio es determinado por características como el aspecto, la presentación, el color, olor y sabor que poseen cierta relación con la “calidad real” del producto, pero es una valoración subjetiva. Complementar su evaluación mediante la determinación analítica permitirá obtener valores de composición como parámetros fundamentales de la calidad de los propóleos y, por tanto, establecer el valor comercial del mismo.

El presente estudio se desarrolló con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica y de porcentaje de extracto seco de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia, y así establecer parámetros de calidad para su comercialización como materia prima de uso industrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en el marco del Proyecto Cualificación de productos de las abejas: miel, polen y propóleos mediante indicadores microbiológicos.

## Recolección de muestras

Se emplearon 59 muestras de propóleo crudo, provenientes de tres orígenes geográficos, 16 de Boyacá, 16 de Cundinamarca y 27 de Santander, en su mayoría obtenidas mediante raspado de colmenas comerciales de *Apis mellifera* entre los años 2008 y 2010. Se incluyó en este estudio una muestra de propóleo crudo de cada uno de los siguientes países: Bélgica, Chile, Cuba y Nueva Zelanda.

## Control de calidad microbiológico

Para evaluar la calidad microbiológica, se siguieron los métodos de recuento en placa y búsqueda de patógenos descritos en la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF 2000). Se detectaron y cuantificaron los grupos indicadores: mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras, para 53 muestras procedentes de Colombia.

Los resultados de la calidad microbiológica se compararon con el cumplimiento de la normatividad internacional existente para este producto de los países de Japón, Perú y El Salvador (JCP 2010; MDS 2003; CONACYT 2003).

## Obtención de extractos etanólicos de propóleos

A las muestras de propóleo crudo se les retiraron las impurezas mecánicas, y se trituraron y homogeneizaron separadamente. Cada muestra fue pesada, dividida en dos partes iguales y extraídas en recipientes de vidrio cerrados, con dos concentraciones diferentes de disolvente etanólico (70 y 96%), conservando una relación disolvente:soluto 70:30 (Almeida 2003; Bruschi y Lara 2006). Se procedió a

obtener principios activos en la disolución, mediante agitaciones diarias 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 h para separar las ceras que se precipitan (Bedascarrasbure *et al.* 2006) en la mezcla de solventes de extracción. La mezcla se filtró al final del proceso para obtener el Extracto Etanólico de Propóleo “madre” (EEPm).

El extracto seco (materia seca o sólidos solubles totales) se determinó para los EEPm, adaptando la metodología de las Normas para propóleos de Brasil, Argentina y Japón (MAPA 2001; CONAL 2008; JCP 2010). Un (1) ml del EEPm se pesó en un recipiente previamente aforado y se sometió a 100 ± 2°C por 60 min en horno de secado para eliminar completamente el solvente. El conjunto se colocó en un dese-

cadador hasta llegar a temperatura ambiente y se registró el peso; el procedimiento se repitió con intervalos de 15 min, hasta obtener un peso constante.

### Análisis de datos

Para el control de calidad microbiológico de las muestras de propóleo crudo se empleó un análisis estadístico descriptivo. Los extractos secos de los EEP fueron expresados en porcentaje (%ES) y se obtuvo la desviación estándar.

### RESULTADOS

La cuantificación de los grupos microbianos indicadores (aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, *Staphylococcus* sp., mohos y levaduras) y la detección de los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en propóleos colombianos se muestran en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Control de calidad microbiológico de muestras de propóleo de abejas *Apis mellifera* de Colombia colectadas en tres regiones de Colombia durante el periodo 2008-2010.

| Indicador microbiológico     | N  | Promedio* | Moda* | Mínimo* | Máximo* |
|------------------------------|----|-----------|-------|---------|---------|
| Coliformes totales           | 53 | 79x102    | < 1   | < 1     | 29x104  |
| Mohos y levaduras            | 53 | 10x104    | < 1   | < 1     | 16x105  |
| Aerobios mesófilos           | 53 | 93x103    | 60    | 20      | 24x105  |
| Coliformes fecales           | 53 | < 1       | < 1   | < 1     | 10      |
| <i>Staphylococcus</i> sp.    | 53 | 94        | < 1   | < 1     | 30x102  |
| Patógenos                    | N  | Detección |       |         |         |
| <i>Escherichia coli</i>      | 51 | Ausencia  |       |         |         |
|                              | 2  | Presencia |       |         |         |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 52 | Ausencia  |       |         |         |
|                              | 1  | Presencia |       |         |         |

\*Microorganismos por gramo de propóleo crudo (UFC/g)

El porcentaje de las muestras que cumplen con la normatividad internacional existente en cuanto al control de calidad microbiológica (cuantificación de los grupos microbianos, indicadores y detección de los microorganismos patógenos) de propóleos crudos de Colombia se indica en la Tabla 2.

Los hallazgos en la concentración de sólidos solubles en los EEP expresados en mg/ml de solución se presentan en la Tabla 3, según la zona de origen geográfico y la solución hidroralcohólica empleada para la extracción.

Más del 50% de los EEP colombianos se consideraron aceptables para las normas de Brasil, Argentina y Japón (Tabla 4).

**TABLA 2.** Control de calidad microbiológico de muestras de propóleo de abejas *Apis mellifera* de Colombia según el requisito de las normas internacionales (n = 53).

| Indicador microbiológico     | Resultado por indicador |      |             |                 |              |             |
|------------------------------|-------------------------|------|-------------|-----------------|--------------|-------------|
|                              | Aceptables (%)          |      |             | Límites (UFC/g) |              |             |
|                              | Japón                   | Perú | El Salvador | Japón           | Perú         | El Salvador |
| Coliformes totales           | 45                      | n.r. | 23          | 0               | n.r.         | < 100       |
| Mohos y levaduras            | 6                       | 8    | 8           | ≤ 30            | 10-100       | 1-100       |
| Aerobios mesófilos           | n.r.                    | 57   | 57          | n.r.            | 1.000-10.000 | <10.000     |
| Coliformes fecales           | n.r.                    | n.r. | 96          | n.r.            | n.r.         | 0           |
| <i>Staphylococcus</i> sp.    | n.r.                    | n.r. | 85          | n.r.            | n.r.         | < 1         |
|                              | Ausencia (%)            |      |             |                 |              |             |
| <i>Escherichia coli</i>      | n.r.                    | 96   | n.r.        | n.r.            | 3-10         | n.r.        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | n.r.                    | n.r. | 98          | n.r.            | n.r.         | 100         |
| Resultado por norma          | 6                       | 8    | 8           |                 |              |             |

UFC/g: Unidades formadoras de colonia por gramo; n.r.: No reporta; ≤ : Menor o igual que < : Menor que.

**TABLA 3.** Concentración de extracto seco a partir de dos concentraciones de etanol.

| Región          | Promedios de extracto seco por región geográfica y concentración del disolvente |                     |
|-----------------|---|---------------------|
|                 | EEP (Extracto seco mg/ml)   |                     |
|                 | Et. 70%   | Et. 90%             |
| Boyacá          | 81,9 ± 4 1,7  | 154,4 ± 49,8        |
| Cundinamarca    | 85,0 ± 37,9   | 175,2 ± 62,7        |
| Santander       | 103,3 ± 75,7  | 187,4 ± 90,4        |
| <b>Promedio</b> | <b>93,0 ± 60,0</b>  | <b>175,3 ± 74,2</b> |
| Chile           | 96,0  | 186,0               |
| Nueva Zelanda   | 121,0   | 132,0               |
| Cuba            | 105,0   | 211,0               |
| Bélgica         | 146,0   | 249,0               |

Et: Concentración del etanol.

**TABLA 4.** Porcentaje de muestras aceptables en rendimiento de extracto seco de propóleos de abejas *Apis mellifera* en Colombia comparadas con el porcentaje de extracto seco reportado en las normas para propóleo de Brasil, Argentina y Japón. (n = 118).

| EEP     | Aceptables (%) |           |       | Extracto seco (%)   |                        |                    |
|---------|----------------|-----------|-------|---------------------|------------------------|--------------------|
|         | Brasil         | Argentina | Japón | Brasil <sup>1</sup> | Argentina <sup>2</sup> | Japón <sup>3</sup> |
| Et. 70% | 53,4           | 58,6      | 75,9  | 11                  | 10                     | 8                  |
| Et. 96% | 56,1           | 59,1      | 69,7  |                     |                        |                    |

1. (Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Brasil 2001); 2. (Comisión Nacional de Alimentos. Argentina 2008); 3. (Japan Council of Propolis. Japón 2010).

## DISCUSIÓN

Los principales indicadores del porcentaje de rechazo de las muestras evaluadas, según la confrontación con las normas internacionales en cuanto a la calidad microbiológica del producto, son los recuentos de mohos y levaduras. La presencia de hongos se puede explicar debido a un mal manejo asociado a la humedad de la materia prima. Adicionalmente, el crecimiento de estos microorganismos se puede dar por la presencia de trazas de miel y polen en el propóleo crudo obtenido de la colmena.

Los coliformes totales y los aerobios mesófilos son indicadores microbiológicos de importancia para las muestras de propóleo crudo evaluadas (Tabla 2); un porcentaje alto de muestras superan los límites en las normas internacionales, lo cual indica probablemente condiciones sanitarias deficientes en el proceso de recolección y conservación de las muestras.

El 4% de las muestras de propóleo crudo fueron positivas para coliformes fecales (Tabla 2), en donde el criterio de aceptación es igual a cero en la norma salvadoreña; lo anterior sugiere una probable contaminación de fuente fecal humana o animal, contaminación que pudo producirse durante el proceso de recolección en campo de las muestras. Para el indicador

de *E. coli*, requisito en la norma peruana, 4% de las muestras tuvieron presencia de esta bacteria.

El 2% de las muestras de propóleo crudo registraron presencia de *S. aureus* (Tabla 2.). Esta bacteria es indicadora de condiciones de manejo o deficiencia de proceso; pueden provenir de la piel, la garganta, la nariz durante la manipulación de la materia prima.

En cuanto a la determinación de materia seca –parámetro que cuantifica el porcentaje de sólidos solubles extraídos de propóleos, en promedio–, el 9,3% de las muestras presentó sólidos solubles entre 81,9 y 103,3 mg/ml, cuando se empleó como solvente etanol al 70%. Un aumento en la concentración de etanol (96%) incrementa el número de muestras (17,5 en promedio) que muestran valores de sólidos superiores (154,4 – 187,4 mg/ml) al anteriormente mencionado (Tabla 3), resultados semejantes a los anteriormente obtenidos con etanol al 70%, de EEP colombianos que variaron en un rango de 2,72 a 9,17% (Bastos *et al.* 2011a), de propóleos brasileños (propóleo marrón) que presentaron valores entre 2,6 a 27,6% (Bastos *et al.* 2011b) y de propóleos de Chile (propóleo de producción especializada) 9,6% (Et. 70%) y 18,6 (Et. 96%); Cuba (propóleo rojo cubano) 10,5 (Et.

70%) y 14,6% (Et. 96%); Nueva Zelanda (propóleo de colmenas en producción de miel de Manuka) 12,1% (Et. 70%) y 13,2 (Et. 96%); Bélgica 21,1% (Et. 70%) y 24,9% (Et. 6%), evaluados en el presente estudio (Tabla 3).

Las extracciones con etanol al 70% mostraron valores promedio de extractos secos menores a los obtenidos con la extracción con etanol al 96%, lo cual se explica en parte a la menor solubilidad de resinas y ceras en el agua (Tabla 3), justificado en parte por la menor solubilidad de las resinas y las ceras en el agua, condición que se presentó al emplear la disolución etanólica (70%) que contiene la mayor proporción de agua. Bastos *et al.* (2011b) 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. Los EEP evaluados en este estudio presentaron una alta fluctuación en cuanto al porcentaje de extracto seco en cada región. Adicionalmente, en investigaciones anteriores hay evidencias de una mayor actividad antibacteriana (*S. aureus* y *E. coli*) cuando el porcentaje de extracto seco es más alto (Bastos *et al.* 2011a; Bastos *et al.* 2011b).

La normatividad internacional existente en Brasil, Argentina y Japón establecen un mínimo de 11, 10 y 8%, respectivamente, en el de extracto seco obtenido del EEP (Tabla 4).

Las muestras de EEP colombianos que no cumplieron con la concentración exigida por las normas internacionales se puede explicar por la calidad del propóleo crudo, en términos de impurezas, y la proporción de cera de abejas en la materia prima.

## CONCLUSIONES

El modelo de obtención de propóleos en campo debe evaluarse en Colombia, considerando la biodiversidad botánica presente en las distintas regiones y los sistemas de producción. La normatividad para el control microbiológico y para la estandarización de rendimiento en extracto seco ha de adoptarse mediante una norma propia, para dar claridad de la condición de comercio de este producto dentro del territorio nacional.

Colombia ha avanzado en la tipificación en cuanto a actividad biológica de los propóleos por regiones geográficas, pero se hace necesario un mayor conocimiento sobre la composición fisicoquímica y la determinación de marcadores químicos que permitan identificarlos. Adicionalmente, se requiere ampliar las zonas de estudio de tal manera que se encuentren zonas recomendadas para la producción de propóleos, y apicultores especializados en producirlo con sistemas productivos eficientes.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y a la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por la cofinanciación de esta investigación. A las asociaciones de apicultores (Asoapiboy, Asoapicom, Asoapis), por el aporte de su trabajo con las abejas. Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo y colaboración.

## REFERENCIAS

1. Almeida S. 2003. Preparo do extrato de própolis legal. MensagemDoce (70).



2. Amoros M, Lurton E, Boustiel J, Girre L. 1994. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod.* 57(5): 644-647.
3. Bankova V, Dylugero A, Popov S, Marekov N. 1987. A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z. Naturforsch.* 42C: 147.
4. Bankova V. 2000. Determining quality in propolis samples. *J Am Apither Soc.* 7(2).
5. Bankova V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* 100: 114-117.
6. Bastos EM, Guzmán D, Figueroa J, Tello J, Scoaris DO. 2011a. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) de la región andina colombiana. *Acta biol. Colomb.* 16(1): 175-184.
7. Bastos EM, Galbiati C, Loureiro E, Scoaris DO. 2011b. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente a *Escherichia coli*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63(5): 1255-1259.
8. Bedascarrasbure E. 2000. Propóleos: un valioso producto de la colmena. 1er. Congreso Internacional de Propóleos. Argentina.
9. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Fierro W, Álvarez A. 2006. Propóleos. San Miguel de Tucuman, Argentina: Magna.
10. Bruschi ML, Lara EH. 2006. Preparation and Antimicrobial Activity of Gelatin Microparticles Containing Propolis Against Oral Pathogens. *Drug Dev Ind Pharm.* 32: 229-238.
11. Burdock G. 1997. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol.* 36: 347-363.
12. Chaillou LL, Herrera HA, Maidana JF. 2004. Estudio del Propóleo de Santiago del Estero Argentina. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(1): 11-15.
13. [CONAL] Comisión Nacional de Alimentos. 2008. Resolución Conjunta SPRI N° 94 y SAGPA N° 357. Argentina.
14. [CONACYT] Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2003. Norma Salvadoreña Obligatoria: Calidad de Propoleo Crudo NSO. 65.19.02:03. El Salvador.
15. Cuesta-Rubio O, Frontana-Uribe B, Ramírez-Apan T, Cárdenas J. 2002. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Z Naturforsch;* 57c: 372-378.
16. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. 1987. The analysis of bud exudate of *Populus euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 232, 249-272.
17. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. 1988. Composition of propolis in Oxfordshire U.K. and its ion to poplar bud exudates. *Z. Naturforsch.* 43C: 301-304.
18. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. 1990. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World.* 71: 107-118.
19. [ICMSF] International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2000. Microorganismos de los alimentos. 2a. ed. Moreno B, Ramis Vergés M, traductores. Zaragoza, España: Editorial Acirbia.
20. [JCP] Japan Council of Propolis. 2010. Propolis voluntary food standards. Japan.
21. Krell R. 1996. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 Chapter V. [Internet]. Value-added products from beekeeping [FAO]; [cited 2011 Dec 22]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076E00.htm>
22. Lee SW, Jo SK. 2011. WPSF Actividades y Propuestas para la estandarización Internacional de los Propóleos. Apimondia 2011 Resúmenes, 28.
23. López J, Ubilllos M. 2004. Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. [Tesis de pregrado]. [Lima, Perú] Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
24. Mani F, Damasceno H, Novelli E, Martins E, Sforcin J. 2006. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol.* 105: 95-98.
25. Marcucci MC. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 26: 83-89.
26. Marcucci, MC. 1998. Controle de Qualidade de Própolis. *Mensagem Doce*(48).

27. Martos I, Cossentini M, Ferreres F, Barberan FA. 1997. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J Agric Food Chem*; 45(8): 2824-2829.
28. Meda AC, Mattos Meda AP. 1994. Própolis um bem da humanidade - Produção e controle. *Anales del X Congreso Brasileiro de Apicultura* (p. 46-50). Pousada do Rio Quente Do. Brasil.
29. [MAPA] Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento del Brasil. 2001. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001, Anexo VII: Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis.
30. [MDS] Ministerio de Salud de la República del Perú. Proyecto de Actualización de la RM N° 615-2003 SA/DM. 2003. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú.
31. Moreno Z, Martínez P, Figueroa J. 2007. Efecto antimicrobiano in vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubanos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Revista NOVA*. 5(7): 1-100.
32. Palomino L, García C, Gil J, Rojano B, Durango D. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16(3): 388-395.
33. Park YK, Alencar SM, Scamparini ARP, Aguiar CL. 2002. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural* 2: 997-1003.
34. Pérez JC, Rodríguez C, Llanes F. 2009. Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Rev Soc Quím Perú*. 75(4): 439-452.
35. Samara-Ortega N, Benítez-Campo N, Cabezas-Fajardo FA. 2011. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9 (1): 8-16.
36. Silva M, Bittner M, Hoeneisen M. et al. 1992. Química de los triterpenos. *Secretaría General de los Estados Americanos*, 73 p.
37. Simone-Finstrom M, Spivak M. 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*. 41: 295-311.
38. Viloria J, Gil J, Durango D, García C. 2012. Caracterización fisicoquímica del propóleo de la Región del Bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 10: 76-85.
39. Visscher P. 1980. Adaptations of honey bees (*Apis mellifera*) to problems of nest hygiene. *Sociobiology*. 5: 249-260.
40. Wollenweber E, Buchmann SL. 1997. Feral-honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Z. Naturforsch.* 52c: 530-535.