

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE PROPÓLEOS DE LA MESA Y ANOLAIMA Y SU EFECTO
SOBRE PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS, CALIDAD DE HUEVO E INTEGRIDAD
DEL TRACTO DIGESTIVO Y REPRODUCTIVO EN GALLINAS PONEDORAS
DE HUEVO MARRÓN

LOREN MILENA CARVAJAL DIAZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA MAESTRÍA ES
SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
BOGOTÁ 2023.

EVALUACIÓN DE PROPÓLEOS DE LA MESA Y ANOLAIMA Y SU EFECTO SOBRE PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS, CALIDAD DE HUEVO E INTEGRIDAD DEL TRACTO DIGESTIVO Y REPRODUCTIVO EN GALLINAS PONEDORAS DE HUEVO MARRÓN

LOREN MILENA CARVAJAL DIAZ

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en producción animal

Directora:

Liliana Betancourt López, Zootecnista MSc., PhD

Co directora:

Arlen Patricia Gómez, Médica Veterinaria, PhD

Línea de Investigación: Nutrición Animal

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA MAESTRÍA ES SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA BOGOTÁ 2023.

*Dedico este trabajo a mi familia que me
apoyo incondicionalmente y siempre me animo para
continuar*

*Y a mí misma por que fue un reto arduo de
lograr.*

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Loren Milena Carvajal

Fecha 23/01/2023

Fecha

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, al centro agropecuario Marengo y al laboratorio de Patología Aviar por recibirme, enseñarme y permitir el uso de instalaciones y equipos.

A mi tutora Dr. Liliana Betancourt por ser mi mentora y maestra en este proceso. Las profesoras Diana Álvarez y Arlen Gómez por todo su acompañamiento, apoyo y enseñanzas.

A la empresa Campo Colombia y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación y apoyo en la investigación.

A mis compañeros de apoyo en el proyecto de investigación Camila Daza, Daniel Castro y José Luis Beltrán.

Resumen y abstract

Evaluación de propóleos de la mesa y anolaima y su efecto sobre parámetros zootécnicos, calidad de huevo e integridad del tracto digestivo y reproductivo en gallinas ponedoras de huevo marrón

Resumen

El propóleo es un producto extraído de las colmenas de abejas, ampliamente estudiado por las diferentes funciones bioactivas y por los reportes que mencionan que su consumo ayuda al fortalecimiento del sistema inmune. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inclusión de extracto de propóleo en la dieta de gallinas ponedoras sobre los parámetros zootécnicos, la calidad de huevo y la morfometría en intestino y sistema reproductivo en gallinas ponedoras. Un total de 240 gallinas ponedoras de la línea Hy-Line de 26 semanas de edad se distribuyeron en 5 tratamientos: un control negativo con dieta basal sin ningún aditivo (T1), un control positivo con dieta basal adicionada con 55 mg de bacitracina de zinc (BMD) / kg de alimento (T2) y tres tratamientos con adición de 300 (T3), 600 (T4) y 900 (T5) mg de extracto etanólico de propóleo (EEP) / kg de alimento. Se determinó el perfil de compuestos de propóleo proveniente de dos municipios de Cundinamarca, La Mesa y Anolaima por la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas y cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detector de masas Obitrap (UHPLC-ESI+-Obitrap-MS); posteriormente se tomaron registros productivos en las aves durante 8 semanas. Se evaluaron parámetros productivos y de calidad de huevo, así como parámetros morfométricos y posibles hallazgos patológicos asociados a integridad intestinal y del tracto reproductivo (oviducto y útero) y cuadro hemático. Hubo diferencias en el perfil de compuestos identificados en las muestras de propóleo de los dos orígenes; mientras que en el propóleo de La Mesa el metabolito de mayor abundancia relativa fue el ácido cafeico con 11.6%, en la muestra de Anolaima, el lupeol fue el metabolito más abundante con 14.4%. Hubo un impacto en el peso de las gallinas cuando se incluyó un 3% de frijol soya crudo en la dieta como desafío nutricional. La reducción de peso corporal en las aves suplementadas con propóleo fue inferior respecto a las aves de los grupos control positivo y negativo, con 91, 48 y 121 para T3, T4 y T5 vs 182 g en T1 ($P < 0.05$).

Tanto el porcentaje de postura como el número de huevos ave alojada fueron superiores en los grupos suplementados con extracto de propóleo respecto al grupo control suplementado con antibiótico (T2) ($P < 0.05$). En cuanto a la calidad de huevo, se presentó un mayor valor en la fuerza de ruptura de la cáscara para los tratamientos con las dosis más altas de propóleo ($P < 0,05$) (T4 - 600mg y T5 - 900mg de EEP/kg de alimento). En el análisis de micrometría intestinal del duodeno, el grupo T3 generó mayor ancho de las vellosidades ($P < 0,05$); en yeyuno se presentó mayor ancho de las criptas con el nivel T4 y en profundidad de las criptas el grupo 2 con BMD presentó el mayor valor ($P < 0.05$). En tracto reproductivo la altura del pliego y ancho del cilio fue mayor para con las dosis más altas de propóleo (T4 600 y T5 900); sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$). Los propóleos provenientes de La mesa y Anolaima son altos en terpenos y presentaron un potencial como aditivo nutracéutico en la dieta para gallinas ponedoras en las dosis de 600 mg de EEP/ kg de alimento.

Palabras clave: propóleo, gallina, parámetros zootécnicos, compuestos activos, abeja.

Evaluation of propolis from Anolaima and La Mesa, effect on animal production parameters, egg quality and integrity of the digestive and reproductive tract in brown egg laying hens

Abstract

Propolis is a product extracted from bee hives, it has been widely studied for its different bioactive functions, especially due to reports that its consumption helps strengthen the immune system. The objective of this research was to evaluate the effect of the inclusion of propolis extract in the diet of laying hens on zootechnical parameters, egg quality and morphometry in the intestine and reproductive system in laying hens. A total of 240 laying hens of the Hy-Line line of 26 weeks of age were distributed in 5 treatments; a negative control with a basal diet without any additives (T1), a positive control with a basal diet added with 55 mg of BMD (zinc bacitracin) / kg of food (T2) and three treatments with the addition of propolis at levels of 300 (T3), 600 (T4) and 900 (T5) mg EEP/kg feed. The profile of propolis compounds from two municipalities of Cundinamarca, La Mesa and Anolaima was determined by the technique of gas chromatography coupled to masses and ultra-high resolution liquid chromatography with Orbitrap mass detector (UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS); Subsequently, productive records were taken in the birds for 8 weeks. Productive and egg quality parameters were evaluated, as well as morphometric and pathological parameters associated with intestinal integrity and reproductive tract (oviduct and uterus) and blood count. There were differences in the profile of compounds identified in the propolis samples from the two origins, while in the La Mesa propolis, the metabolite with the highest relative abundance was caffeic acid with 11.6%, in the Anolaima sample, Lupeol was the most abundant metabolite with 14.4%. There was an impact on the weight of the hens when 3% raw soybeans were included in the diet, the reduction in body weight in the birds supplemented with propolis was lower compared to the birds of the positive and negative control groups, with 91, 48 and 121 for T3, T4 and T5 vs 182 g in T1 ($P < 0.05$). Both the

laying percentage and the number of bird eggs housed were higher in the groups supplemented with propolis extract compared to the control group supplemented with antibiotic ($P < 0.05$). Regarding egg quality, there was a higher value in the breaking force of the shell for the treatments with the highest doses of propolis ($P < 0.05$) (T4 600mg and T5 900mg of EEP/kg of food).

In the intestinal micrometry analysis of the duodenum, the T3 group generated greater width of the villi ($P < 0.05$); in jejunum there was a higher value in the depth of the crypts with the T4 level and in the depth of the crypts group 2 with BMD presented the highest value ($P < 0.05$). In the reproductive tract, the height of the fold and the width of the cilium were greater for the highest doses of propolis (T4 600 and T5 900); however, there were no significant differences between the treatments ($P > 0.05$). Propolis from La Mesa and Anolaima are high in terpenes and have potential as a nutraceutical additive in the diet for laying hens at doses of 600mg of EEP/kg of feed.

Key words: Propolis, hens, animal production parameters, active compound, bee

Tabla de contenido

1. Capítulo 1. Revisión de literatura	6
Contexto general.....	6
Integridad intestinal en la industria avícola.....	7
El Propóleo y sus propiedades	10
Propiedades biológicas del propóleo	12
Efectos del propóleo en aves.....	13
Bibliografía.....	15
2. Capítulo 2.....	24
<i>Determinación del perfil de compuestos del propóleo de dos municipios de Cundinamarca.</i>	24
Materiales y métodos	26
Zona de estudio, obtención de propóleo y preparación de extractos	26
Resultados	28
Discusión.....	33
Bibliografía.....	36
3. Capítulo 3.....	44
<i>Evaluación de la inclusión de propóleo en dietas para gallina ponedora de huevo marrón sobre parámetros productivos, calidad de huevo, integridad intestinal y de oviducto.</i>	44
Materiales y métodos	46
Ubicación del experimento, alojamiento y aves.....	46
Tratamientos	46
Alimentación y registro de datos.....	47
Pesaje de las aves.....	48
Calidad externa e interna del huevo	48
Toma de muestras para análisis histológico	48
Parámetros histológicos	49
Análisis estadísticos.....	53
Resultados	53
Peso corporal.....	53
Porcentaje de postura y peso del huevo.....	54
Calidad interna y externa del huevo	54
Análisis histológico e integridad intestinal.....	61
Cuadro hemático.....	62
Bibliografía.....	67
5. Conclusiones y recomendaciones	77
5.1 Conclusiones	77
5.2 Recomendaciones	77

Anexo. 1 Determinacion del perfil por cromatografia de gases..... 79

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Resumen de estudios reportados en gallina ponedora y pollo de engorde sobre los efectos del propóleo.</i>	14
<i>Tabla 2. Perfil de compuestos relevantes de propóleos por cromatografía de gases acoplada a masas (GS/MS) de propóleos de la Mesa y Anolaima Cundinamarca.</i>	30
<i>Tabla 3. Perfil de compuestos por UHPLC-ESI+-Obitrap-MS relevantes de propóleos de La Mesa y Anolaima Cundinamarca.</i>	31
<i>Tabla 4. Dieta basal</i>	47
<i>Tabla 5. Parámetros de evaluación de integridad (intestino e hígado) mediante el método "I see inside" con su respectivo factor de impacto</i>	51
<i>Tabla 6. Efecto del consumo de propóleo sobre peso corporal (g)</i>	53
<i>Tabla 7. Efecto del consumo del propóleo sobre indicadores productivos</i>	56
<i>Tabla 8. Efecto del consumo del propóleo sobre indicadores de calidad externa e interna del huevo</i>	57
<i>Tabla 9. Peso órganos (g) de gallinas ponedoras suplementadas con diferentes niveles de propóleo.</i>	58
<i>Tabla 10. Lesiones macroscópicas observadas en las necropsias de las gallinas ponedoras suplementadas con diferentes niveles de propóleo (% de aves con lesión)</i>	59
<i>Tabla 11. Efecto de la suplementación de las dietas de las gallinas ponedoras con propóleo sobre los parámetros morfométricos en intestino delgado</i>	60
<i>Tabla 12. Score de integridad intestinal e hígado ("I See Inside" – ISI) de gallinas ponedoras suplementadas con diferentes niveles de propóleo</i>	61
<i>Tabla 13. Parámetros morfométricos en tejido sistema reproductivo</i>	62
<i>Tabla 14. Cuadro hemático de gallinas ponedoras suplementadas con propóleo</i>	62

Introducción

Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) han sido usados extensamente en la industria avícola durante décadas, con el fin de mejorar parámetros productivos y crecimiento de los animales (Huyghebaert, Ducatelle, Immerseel, 2011). En torno al uso de APC surgen presiones sociales y preocupaciones médicas, como el incremento de la resistencia bacteriana, lo cual conlleva a su vez a la pérdida del efecto de los antibióticos respecto a un tratamiento específico tanto en los animales como en el hombre, por lo que se convierte en un problema de salud pública (Collignon, 2009). Por un principio de precaución, en países miembros de la Unión Europea se prohibió su uso a partir de 2006 y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda a los demás países legislar sobre la no utilización de éstos (Cepero Briz, 2008). En este sentido, varios países han venido disminuyendo y prohibiendo el uso de APC, tales como Dinamarca, Holanda, Países Bajos y en Estados Unidos ya están regulando el uso de los antibióticos de modo que sea exclusivamente para animales enfermos (Spellberg et al., 2016). En Colombia por medio de la resolución 22747 de 2018 del Instituto Colombiano agropecuario ICA se prohíbe la importación, fabricación, registro, comercialización, uso de aditivos que contengan polimixina E (colistina) y polimixina B como promotores de crecimiento en especies animales productoras de alimentos para el consumo humano). (Organización panamericana de la Salud, 2021).

AGROSAVIA, en el año 2010, de la mano con la OPS, lanzó el piloto del Programa Colombiano de Vigilancia Integrada de la Resistencia a los antimicrobianos, en la cadena avícola.

Las afectaciones sobre la salud humana y animal se han evidenciado en la resistencia bacteriana, la cual es transferida a los humanos por medio de consumo de productos finales como carne o huevos, por contacto directo con los animales, centros de sacrificio, residuos en agua, cama y suelo contaminados (Bezerra et al., 2017). En España y Estados Unidos se evidenció que por el uso de fluoroquinolonas en

producciones animales aumentaron los casos de enfermedades causadas por enterobacterias resistentes en humanos. En Canadá comprobaron que al eliminar el uso de cefalosporinas en avicultura se presentaron descensos de enterobacterias resistentes tanto en animales como en humanos. Igualmente, cuando se retomó el uso de éstos, aumentó la resistencia en ambos casos (Dutil et al., 2010).

En los últimos años por las restricciones y prohibiciones al uso de APC y la tendencia al consumo de productos naturales, orgánicos y libres de químicos, se han estudiado diferentes alternativas naturales que brinden beneficios a la producción, la salud y el bienestar animal, buscando el mejoramiento de parámetros productivos, el fortalecimiento del sistema inmune, la óptima absorción de nutrientes y que a su vez no tengan efectos residuales. Al respecto, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) tiene como iniciativa el seguimiento y vigilancia sobre el uso de APC en animales a nivel mundial, en consecuencia, en un reporte del año 2019, datos recolectados entre 2015 y 2017 entre los países encuestados se redujo el uso de APC de 60 a 45 países, lo cual evidencia que el proceso de la disminución de uso de APC ha avanzado y se debe continuar en la búsqueda de productos naturales alternativos que beneficien la producción y la salud.

El estudio de productos naturales está dirigido a la búsqueda e identificación de moléculas que poseen diferentes actividades biológicas como antibacterianos, insecticidas, antimicóticos, inmunoestimulante, antivirales, entre otros. Estos pueden provenir de diferentes fuentes como microorganismos, plantas, invertebrados y organismos marinos, como respuesta a interacciones propias o como respuesta a estimulantes externos. Entre los más estudiados están los microorganismos y por trayectoria desde tiempos anteriores las plantas en el área de la etnobotánica y con ello la farmacología. Dentro de estos productos naturales o de síntesis se destacan como alternativas reportadas: prebióticos, probióticos, enzimas exógenas, fitobióticos, ácidos orgánicos (láctico, butírico, fumárico), entre otros, cada uno con diferentes mecanismos de acción específicos. Se reporta su uso en avicultura y su impacto sobre el microbiota intestinal y el sistema inmunológico y otros efectos funcionales en beneficio de la industria (Sugiharto, 2016). Cuidar y mantener la integridad intestinal es importante para optimizar la salud y la producción avícola, y en el caso de las aves de postura, mantener el funcionamiento óptimo del sistema reproductivo, ya que de

este depende la formación del huevo mediante la secreción de diferentes componentes reflejado finalmente en la producción y productividad.

La demanda de productos naturales para el mantenimiento de la integridad intestinal y salud animal es creciente, y en un país como Colombia que cuenta con una alta biodiversidad de organismos para la búsqueda de metabolitos secundarios, se proyecta un alto potencial para el desarrollo de este tipo de productos; sin embargo, es aún incipiente en nuestro medio. Se plantean como desafíos la detección de compuestos activos, aislamiento, caracterización y estandarización de los mismos (Atanasov et al., 2021).

En el curso de esta búsqueda de nuevas alternativas naturales se destaca el propóleo, un producto derivado de la actividad de las abejas en la colmena que ha demostrado tener propiedades bioactivas como antibacteriano, antiviral, antifúngico (Tiveron et al., 2016), antioxidante e inmunomodulador (Orsi et al., 2000; Martínez-Gonzalez et al., 2019). En el estudio del propóleo y su uso, es imperativo la identificación y caracterización de los compuestos de éste, ya que se presenta variabilidad por el origen geográfico y la diversidad botánica circundante de la cual las abejas recolectan compuestos.

La mayoría de estudios reportados como los mencionados anteriormente en relación a la actividad biológica han sido realizados bajo ensayos *in vitro*. También se han reportado algunos estudios en diferentes producciones animales para mejorar especialmente parámetros productivos y de rendimiento. En Colombia, aún no se conocen reportes de investigaciones en gallinas ponedoras suplementadas con propóleos locales, así como niveles adecuados de inclusión, así como tampoco sus efectos sobre indicadores zootécnicos y calidad de huevo. Razón por la cual la hipótesis de este estudio plantea que el propóleo puede generar un efecto favorable sobre parámetros zootécnicos, reproductivos e integridad intestinal y ejes reproductivos. Para comprobar estos supuestos se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la composición del propóleo de dos municipios de Cundinamarca, 2)

Evaluar diferentes niveles de inclusión de propóleo en dietas para gallina y determinar el nivel más adecuado de inclusión expresado en parámetros productivos como el consumo de alimento, la conversión alimenticia, el porcentaje de postura, el peso del huevo, la calidad interna y externa del huevo, la mortalidad, 3) Determinar el impacto del uso de propóleo sobre la histomorfometría en intestino y sistema reproductivo y 4) Determinar cambios en el cuadro hemático por efecto de la inclusión de propóleo en la dieta de las gallinas ponedoras.

Bibliografía

- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Bezerra, W. G. A., Silva, I. N. G., Teixeira, R. S. C., Lopes, E. S., Albuquerque, Á. H., & Cardoso, W. C. (2017). Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. *Archivos de Zootecnia*, 66(254), 301–307.
<https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/2335/1548>
- Cepero Briz, R. (2008). Retirada de los antibióticos promotores del crecimiento en la Unión Europea: Causas y consecuencias. XII Congreso Bienal de La Asociación Mexicana de Especialistas En Nutrición Avícola (AMENA) Facultad de Veterinaria Universidad Zaragoza, 1–46.
- Collignon, P. (2009). The use of antibiotics in food production animals ; does this cause human health problems ? *RSPCA Australia Scientific Seminar*, 1–11.
- Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L. K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G. B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., & Pillai, D. R. (2010). Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans , *Canada*. 16(1). <https://doi.org/10.3201/eid1601.090729>
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Immerseel, F. Van. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*, 187(2), 182–188.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>

Orsi, R., Funari, S. R. C., Soares, A. M. V. C., Calvi, S. A., Oliveira, S. L., Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2000). Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6(2), 205–219.

<https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000200006>

Spellberg, B., Hansen, G. R., Kar, A., Cordova, C. D., Price, L. B., & Johnson, J. R. (2016). Antibiotic Resistance in Humans and Animals.

Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111.

<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>

1. Capítulo 1. Revisión de literatura

Contexto general

La industria avícola en Colombia desempeña un papel protagónico en la seguridad alimentaria, ya que el huevo y la carne de pollo, son es las proteínas más consumidas en el país. Así lo reflejan las cifras de la Federación Nacional de Avicultores de Colombia puesto que la producción de huevo al mes de junio 2022 fue de 1.332,72 millones y 148.835 toneladas para el mes de abril (Fenavi, 2022).

La carne de pollo y los huevos de gallinas son catalogados como una de las mejores fuentes de proteína, además de su fácil acceso para el consumidor local (Farrell, 2013). De acuerdo con las cifras, se espera que en los próximos años siga creciendo de forma exponencial los porcentajes de producción y de consumo de carne de pollo y huevo. No obstante, este balance positivo genera presiones y exigencias en la industria avícola, que está en un permanente esfuerzo por mejorar los indicadores de productividad y eficiencia. En este sentido, la integridad intestinal juega un papel crítico y determinante de la expresión productiva de las aves y es donde se centran la mayoría de las acciones y los estudios para optimizar la producción de carne de pollo y huevo, por lo tanto, se constituye en un objetivo de la presente propuesta para evaluar el potencial de actividad biológica del propóleo en parámetros productivos, integridad intestinal y del sistema reproductivo en gallinas ponedoras.

De otra parte, la apicultura es considerada como una actividad agropecuaria, la cual consiste en la crianza y aprovechamiento de las abejas *Apis mellifera* a través de la producción artesanal, proporcionando la miel como producto principal y productos secundarios como polen, propóleo, jalea real, cera y apitoxina (Garnica, 2005). De igual forma, de acuerdo con las cifras sectoriales publicadas por la cadena productiva de las abejas y la apicultura (CPAA) para diciembre del año 2018 se reportaron 120.437 colmenas y se estiman alrededor de 3.000 apicultores y una producción de 3.372 toneladas de miel, 170 toneladas menos que el año anterior debido a la pérdida de colmenas principalmente en los departamentos de Valle del Cauca, Córdoba y Meta

(Cadena productiva de las abejas y apicultura. & Minagricultura, 2018). La actividad de la apicultura aún se realiza a pequeña escala y la mayor parte de los productores poseen poca cantidad de colmenas y sus procesos se realizan de forma artesanal, dado ésto es un gremio que aún tiene potencial de crecimiento y expansión. Por estas razones se deben realizar más trabajos integrando la universidad- empresa -estado para desarrollar más valor agregado a los productos apícolas para que el sector crezca y tenga un mejor posicionamiento a nivel local y nacional.

El producto principal que se reporta a partir de la actividad apícola es la miel, seguido por el polen y finalmente el propóleo; del cual ya se han realizado algunos trabajos *in vitro*, destacando las propiedades biológicas de propóleo de diferentes orígenes geográficos a nivel mundial. En Latinoamérica, Brasil es uno de los países que ha realizado un trabajo amplio en el estudio, caracterización y estandarización de propóleos. En Colombia, se han realizado algunos estudios evaluando distintas propiedades *in vitro* de propóleos provenientes de diferentes áreas geográficas, (Martínez et al 2012, Gil et al 2013) pero aún no se ha potencializado como producto de alto consumo y valor biológico, con un posible uso nutracéutico para aves, por lo tanto, con la presente investigación también se espera fortalecer y exponer las propiedades de este producto y así integrar estos dos sectores apícola y avícola.

Integridad intestinal en la industria avícola.

Uno de los principales desafíos de la producción avícola a gran escala es el mantenimiento de la integridad intestinal y la inmunidad, lo cual garantiza una producción eficiente y de calidad y el crecimiento del consumo de este tipo de productos. De acuerdo con Hafez y Attia (2020), la aparición y reincidencia de enfermedades seguirán siendo los principales desafíos para la situación actual y el futuro estratégico de la industria. Además, los peligros para la salud pública generados por bacterias resistentes a los antibióticos obligan al uso racional en los sistemas de producción animal. El consumo de alimentos con residuos de antibióticos es un problema crítico en las diferentes producciones animales, por esto fortalecer y mantener una óptima salud desde el inicio garantizará el éxito en la producción. Todos los sistemas que integran la salud animal son importantes, sin embargo, uno de los más relevantes es el sistema digestivo. El intestino es la interface entre el ambiente y

el medio interno, es un ambiente que está en constante interacción con microorganismos patógenos, comensales, antígenos, toxinas, nutrientes y pro-nutrientes (Garrett et al., 2010). La integridad intestinal determina el óptimo funcionamiento del tracto gastrointestinal (TGI), el cual lleva a cabo no solamente las funciones de digestión, secreción, absorción y transporte de nutrientes (Domingo, 2015), sino también debe cumplir la función de barrera frente a agentes patógenos. El TGI está habitado por una diversa comunidad de microorganismos como bacterias, hongos y protozoos, la cual se va diferenciando y creciendo, dependiendo de la zona del TGI y la edad del animal (Choi et al., 2014).

Con el fin de identificar los cambios posibles generados por los aditivos naturales, es necesario conocer a profundidad la estructura y los cambios del TGI. El desarrollo del sistema digestivo se da en los primeros 10 días de vida del ave, donde se desarrolla la morfología del tracto (Potten, 1998). El duodeno, yeyuno e íleon componen el intestino delgado, áreas en las cuales se dan importantes procesos de digestión, absorción, secreción y homeostasis. La estructura de estos segmentos es muy similar, aunque con algunas variaciones de acuerdo con su función (Yegani & Korver, 2008). El intestino está integrado por tres capas mucosa, muscular y serosa. La mucosa está constituida por numerosas vellosidades y éstas a su vez por células epiteliales llamadas enterocitos, estos presentan microvellosidades apicales en borde de cepillo (Turk, 1982). Los enterocitos cumplen funciones de vital importancia, ya que son una barrera física que controlan la invasión de agentes patógenos y por otra parte, permite el paso de nutrientes y ciertas sustancias, a la vez que secreta diversos productos que contribuyen a su función y a mantener la homeóstasis (González & Barbeito, 2014). En la base de las vellosidades se ubican las criptas de Lieberkühn en las cuales se originan los enterocitos. Adicional a esto se encuentran células caliciformes y enteroendocrinas secretoras de muco, enzimas y hormonas. En el duodeno se ubican las vellosidades más largas y criptas más profundas, por lo cual su mucosa es más gruesa (Lenhardt & Moze, 2003). Por el contrario, el número de células caliciformes aumenta hacia el ciego (González & Barbeito, 2014). Las estructuras anteriormente mencionadas son usadas para estudios de morfología intestinal relacionando altura y ancho de las vellosidades, profundidad de la cripta y número de enterocitos por vellosidad (Klis & Jansman, 2002). Estos parámetros son importantes, ya que se ha reportado una correlación entre altura y ancho de vellosidades y criptas, reflejados en

el óptimo crecimiento y salud intestinal en los animales. La integridad intestinal se puede ver modificada por diferentes factores, tales como alimentación, aditivos, edad y raza (Yegani & Korver, 2008).

La estrategia más usada para mejorar la integridad intestinal ha sido mediante la adición de antibióticos en niveles subterapéuticos en el alimento de las aves. El uso de APC en la industria se remonta desde 1950, siendo definidos como “diferentes medicamentos que destruyen o inhiben el crecimiento bacteriano y se administran en niveles subterapéuticos” (Hughes & Heritage, 2004). Para el año 2010, el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento fue de 63,151 toneladas, con un mayor porcentaje de su utilización en países como China (23%), Estados Unidos y Brasil (13%) asociados primariamente con producciones intensivas como la avicultura (Van Boeckel et al., 2015). Los APC son utilizados para mejorar parámetros como ganancia de peso y conversión alimenticia, reflejados finalmente en el crecimiento de los animales. En la unión Europea para el año de 1999 se comenzó por prohibir el uso de la virginiamicina como APC y para el año 2006 por un principio de precaución se estableció la prohibición total de todos los APC, ya que se han reportado estudios con presencia de residuos de antimicrobianos en productos derivados de animales, aumento de la resistencia bacteriana y la posibilidad de la transmisión de genes resistentes a bacterias patógenas de impacto en salud pública (Spellberg et al., 2016). En el caso de la carne de pollo y el huevo se han detectado residuos de antimicrobianos como tetraciclinas y ciprofloxacina, detectados por medio de técnicas de cromatografía (Hassan et al., 2021). Además, en estudios realizados en animales tratados con antibióticos como promotores de crecimiento en el genoma de las bacterias se detectaron plásmidos que generan resistencia a cierto tipo de antibióticos, estableciendo reservorios de resistencia a ciertos antibióticos (Nesporova et al., 2021). El mecanismo de acción de los APC puede ser tanto bactericidas como bacteriostáticos, pero a su vez varía de acuerdo a la especie animal, sitio y modo de acción, ya que pueden actuar sobre comunidades bacterianas específicas; principalmente actúa alterando la microbiota presente en el TGI, reduciendo la competencia por nutrientes entre bacterias benéficas y patógenas, igualmente disminuyendo la colonización por bacterias patógenas (Kalpana & Srinivasan, 2004); también se plantea la posibilidad de que pueda actuar directamente en procesos

relacionados con la respuesta inmune, ya que se disminuye la energía catabólica para mantener dicha respuesta, lo que permite utilizar esa energía libre en procesos anabólicos como desarrollo muscular, crecimiento y producción (Brown et al., 2017). La investigación en los últimos años ha estado orientada a generar alternativas naturales como aditivos nutracéuticos para la integridad intestinal, entre ellas, el propóleo presenta un potencial por sus propiedades funcionales.

El Propóleo y sus propiedades

El propóleo es “un producto extraído de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de diferentes especies de plantas según su entorno, en particular de flores y brotes de las hojas, las cuales mezclan con la saliva, enzimas y otras secreciones propias de las abejas” (Farré et al., 2004). El propóleo tiene un papel importante en la colmena, ya que es una barrera física que las abejas usan para sellar cualquier orificio distinto a la entrada de la colmena y es una barrera de defensa de la colonia porque contiene compuestos bioactivos contra microorganismos patógenos; muchas de estas estructuras químicas bioactivas son metabolitos secundarios de las plantas que las abejas colectan, acondicionan, transforman y acumulan en los propóleos (Cunha et al., 2013). Los propóleos han sido ampliamente estudiados, pero solo parcialmente entendidos en cuanto a la relación en estructuras químicas, acción sinérgica y bioactividad; sin embargo, su uso en medicina tradicional es ancestral tanto en humanos como en animales, y se evidencian efectos asociados a la respuesta inmune, como inmunomodulador, antitumoral, antibacteriano, antifúngico, antiviral y antioxidante (Sforcin & Bankova, 2011). Se han estudiado desde diferentes aspectos, principalmente composición química, relación con compuestos botánicos, actividad biológica tanto *in vitro* e *in vivo*, buscando aplicaciones a nivel industrial (Bankova et al., 2016).

La composición química del propóleo es variable, ya que depende de la composición botánica, el entorno y la especie de abeja, pero en un contexto general sus principales componentes son “resinas y bálsamos (50-55%), ceras (25-35%), aceites volátiles (10%), polen (5%), minerales y sustancias orgánicas (5%)” (Papotti et al., 2012). En el análisis del perfil químico se han descrito al menos 300 compuestos químicos tales como polifenoles, flavonoides, aldehídos fenólicos, ésteres, quininas, terpenos, sesquiterpenos, cumarinas, entre otros, de los cuales por lo menos 50 poseen

propiedades bioactivas (Bankova, Popova, et al., 2016; Papotti et al., 2012; Silici & Kutluca, 2005).

Esta variedad de compuestos que hace parte del perfil químico, proviene principalmente de una gran variedad de exudados de las plantas y secreciones propias del metabolismo de las abejas, por esto además de los compuestos anteriormente mencionados se ha identificado aminoácidos y azúcares (como glucosa, sacarosa y fructosa) (Çelemlı, 2012). Debido a esto la importancia de identificar su composición por regiones geográficas con el fin de tener patrones de composición, que permiten relacionar la actividad biológica, pero aún más importante la estandarización de los componentes. La resonancia magnética, la cromatografía de gases acoplada a masas y la cromatografía líquida son algunas de las técnicas usadas para la descripción e identificación de compuestos bioactivos en el propóleo (Cuesta-Rubio et al., 2007; Aparecida Souza Machado et al., 2016; Silici & Kutluca, 2005).

La apariencia física y estructura del propóleo cuando se extrae de la colmena en su forma original, tiene una estructura generalmente dura y terrosa, aunque también puede ser elástica y pegajosa por la cantidad de ceras o resinas que lo componen, varía en una amplia gama de colores desde café, verdoso y rojizos. Finalmente, para poder aprovechar y extraer los metabolitos activos se deben elaborar extractos, dado esto se reportan estudios evaluando diferentes tipos de solventes como etanol, acetona, metanol, aceites vegetales, agua y recientemente propilenglicol. En los estudios recopilados por Bankova 2021, el solvente más utilizado por su efectividad es el etanol del 70 al 96%, ya que gran parte de los compuestos activos y de interés son de origen polar, los cuales extraen en su mayoría con este tipo de solventes.

También se publican estudios con diferentes métodos y solventes más adecuados para el aprovechamiento del propóleo. Entre los métodos descritos está la maceración, siendo el método usado comúnmente con el fraccionamiento mecánico del propóleo en partículas de menor tamaño con los solventes nombrados anteriormente, obteniendo extractos. También se ha reportado extracción con fluidos supercríticos con CO₂ con resultados favorables para la obtención de compuestos específicos, como lo reporta Aparecida Souza Machado et al. 2016 para la extracción

de ácido cumárico y artepilin C, así como compuestos fenólicos con actividad antioxidante y antiinflamatoria encontrados en propóleo verde brasilero cuya mayor parte de su composición es de la planta *Baccharis dracunculifolia*.

Propiedades biológicas del propóleo

El uso de propóleos se remonta al antiguo Egipto, donde era empleado para embalsamar a los muertos. Debido a su capacidad antimicrobiana, también fue utilizado como un antiséptico y agente cicatrizante por los médicos griegos y romanos (Sforcin J.M, 2007).

La actividad antimicrobiana se ha reportado sobre bacterias patógenas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, coincidiendo en que presentan una mayor actividad frente a bacterias Gram-positivas (Sforcin & Bankova, 2011; Silici & Kutluca, 2005; Talero, 2014). Acerca del mecanismo de acción del propóleo como agente antibacteriano, se reportan los flavonoides como la pinocembrina, crisina, galangina y ácido cafeico como los principales responsables de ésta, afectando la membrana de las bacterias, haciendo que se disipe y que la bacteria pierda la capacidad de sintetizar ATP, también inhibiendo enzimas y proteínas asociadas a la motilidad bacteriana (Marcucci, 1995; Salomão et al., 2008; Sepulveda et al., 2006).

La actividad antifúngica ha sido evaluada sobre *Trichophyton rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae* y especialmente *Candida albicans* inhibiendo el crecimiento micelial (Monzote et al., 2012; Silici & Kutluca, 2005).

El efecto antiviral se atribuye a los flavonoides, sustancias anteriormente relacionadas en la actividad antimicrobiana frente al virus *Herpes simplex* Tipo 1. También hay reportes de actividad contra el Virus Kong (H3N2) de influenza, tanto *in vivo* como *in vitro*, atribuido al efecto del ácido cinámico, comprobado en estudios *in vitro* con compuestos análogos del ácido cinámico (Amoros et al., 1992). En Colombia, Talero (2014) encontró que de 12 muestras de propóleo, 10 presentaron actividad antiviral con una concentración de 1mg/ml contra el fago *Lambda*. Incluso con respecto a la problemática de emergencia de salud y sanitaria a nivel mundial a causa del COVID-19, se realizaron ensayos clínicos con extractos estandarizados de propóleo verde

brasileño en pacientes con afección del virus, del cual se concluyen que “la adición de propóleos a los procedimientos de atención estándar resultó en beneficios clínicos para los pacientes hospitalizados con COVID-19” (Silveira et al., 2021). Se sugiere el propóleo como producto potencial para realizar ensayos clínicos sobre el efecto como coadyuvante para fortalecer la respuesta inmune (Ripari et al., 2021).

Como agente inmunomodulador se ha demostrado que estimula tanto la inmunidad innata como adquirida, la producción de anticuerpos, diferentes células del sistema inmune (linfocitos T y B) y la acción de los macrófagos (Dimov et al., 1991). Sforcin (2007) relaciona varios estudios en los cuales se destacan efectos producidos del propóleo sobre la respuesta inmune, como aumento de anticuerpos, producción de macrófagos y activación de interferón gamma.

Sobre la función antitumoral se ha encontrado que con dosis entre 10 y 100 µg/100 µl se presentó tal actividad. Los principales mecanismos por los que el propóleo afecta a las células tumorales se relacionan con la inhibición del crecimiento celular y con el estímulo de la apoptosis (Sforcin & Bankova, 2011). Orsolich citado por Sforcin, 2007 determinó que con dosis de 50 y 150 mg/kg de propóleo y el efecto de compuestos polifenólicos aislados como el ácido cafeico y quercetina, disminuyó el número de nódulos tumorales en pulmón; sin embargo, la efectividad antimetastásica del propóleo fue superior a la presentada por sus constituyentes purificados, comprobando que tal actividad no está explicada en tales compuestos (Orsolich et al., 2004).

Efectos del propóleo en aves

Se han publicado varios estudios, en su mayoría *in vitro* con diferentes efectos del propóleo, en roedores principalmente y algunas especies como peces, bovinos, y aves, evaluando los efectos sobre parámetros productivos, reproductivos e inmunomoduladores. En la tabla 1 se resumen algunos de los estudios, sus niveles de inclusión y efectos en aves.

Tabla 1. Resumen de estudios reportados en gallina ponedora y pollo de engorde sobre los efectos del propóleo.

Efectos	Especie	Dosis de propóleo	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en niveles séricos de IgM e IgG. - Aumento en el recuento de eritrocitos. 	Gallina Ponedora	3 g/kg	Çetin, Silici, Çetin, Silici, Çetin, & Güçlü B. K., 2010
<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en IgG. - Disminución de heterófilos y la relación heterófilos/linfocitos. - Aumento de anticuerpos naturales. 	Gallina ponedora	50 mg/kg vía intraperitoneal	Freitas et al., 2011
<ul style="list-style-type: none"> - Mejor conversión alimenticia. - Aumento peso del huevo. - Disminución de heterófilos y la relación heterófilos/linfocitos. 	Gallina ponedora	100-150 mg/kg	Galal & Zaki, 2008
<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en masa y producción de huevo. - Disminución de heterófilos y la relación heterófilos/linfocitos. 	Gallina ponedora	250 y 1000 mg/kg	Abdel-Kareem & El-Sheikh, 2017
<ul style="list-style-type: none"> - Aumento del índice de albumina y las unidades Haugh. 	Gallina ponedora	250 y 400 mg/kg	Arpášová et al., 2016
<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en peso, masa de huevo y porcentaje de postura. - Mejor conversión alimenticia. - Aumento en enzimas antioxidantes. - Mejor calidad de semen e incubabilidad. 	Gallina ponedora y gallos	150- 450 mg/kg	Shreif & El-saadany, 2016
<ul style="list-style-type: none"> - Diminución de presencia de enterobacterias. - Aumento de Lactobacilos. 	Pollo de engorde	800mg/kg	Kačániová et al., 2012
<ul style="list-style-type: none"> - Mejor conversión de alimento, peso y rendimiento en canal. - Aumento de niveles 	Pollo de engorde	800mg/kg	Zafarnejad, Afzali, & Rajabzadeh, 2017

séricos de IgY e IgM y la respuesta a anticuerpos.			
<ul style="list-style-type: none"> – Mayor rendimiento en canal. – Menor pérdidas por goteo en canal. – Piel y carne de la canal colores favorables para los tratamientos de polen. 	Pollo de engorde	Propóleo 0.25 g/kg + bee pollen 20 g/kg *propóleo 0.5 g/kg *propóleo 1.0 g/kg polen 20 g/kg	Prakatur et al., 2020

En gallina ponedora, Seven, & Silic (2011) compararon el efecto del uso del propóleo bajo estrés calórico, en contraste con el uso de flavomicina sobre parámetros zootécnicos y de calidad de huevo, pero no evidenciaron diferencias significativas, por lo cual concluyeron que el propóleo tiene un efecto similar al del antibiótico.

Como se puede observar en la tabla 1, los efectos funcionales del uso de propóleo como aditivo nutraceútico son favorables, estableciendo el efecto principalmente a nivel inmunológico y en rendimientos productivos tanto para pollo de engorde como para gallina ponedora. Sin embargo, en los estudios citados los niveles de inclusión son variables (Tabla 1).

En pollo de engorde se comprobó que el propóleo brindó resultados similares al uso de APC como avilamicina (comercial), siendo así una alternativa eficiente en la producción avícola (Vieira et al., 2020). Con estos antecedentes se espera resultados positivos en el desempeño y la fisiología de las gallinas ponedoras por efecto de la suplementación con propóleo en la dieta.

Bibliografía

Abdel-Kareem, A. A. A., & El-Sheikh, T. M. (2017). Impact of supplementing diets with propolis on productive performance, egg quality traits and some haematological

- variables of laying hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(3), 441–448. <https://doi.org/10.1111/jpn.12407>
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus Type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55(12), 1732–1740. <https://doi.org/10.1021/np50090a003>
- Aparecida Souza Machado, B., Pina Dantas Silva, R., de Abreu Barreto, G., Serra Costa, S., Figuerêdo da Silva, D., Neves Brandão, H., Luiz Carneiro da Rocha, J., Antônio Dellagostin, O., Antônio Pegas Henriques, J., Andres Umsza-Guez, M., & Ferreira Padilha, F. (2016). Chemical Composition and Biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of Brown, green and red Propolis derived from different geographic regions in Brazil. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>
- Arpášová, H., Haščík, P., Pistová, V., Mellen, M., Gálik, B., & Fik, M. (2016). The Effect of propolis extract on internal quality parameters of table eggs. In *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies (Issue 2)*. <https://www.cabdirect.org.ezproxy.unal.edu.co/cabdirect/FullTextPDF/2017/20173012631.pdf>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braid, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20
- Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. 7(1), 13–20.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin, M. N., I Falcão, S., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K. B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., ... Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 1–49. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1. <https://doi.org/10.20450/mjcce.2016.864>
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: a review.

- Journal of Apicultural Research, 0(0), 1–10.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426>
- Bezerra, W. G. A., Silva, I. N. G., Teixeira, R. S. C., Lopes, E. S., Albuquerque, Á. H., & Cardoso, W. C. (2017). Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. *Archivos de Zootecnia*, 66(254), 301–307.
<https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/2335/1548>
- Brown, K., Uwiera, R. R. E., Kalmokoff, M. L., Brooks, S. P. J., & Inglis, G. D. (2017). Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>
- Cadena productiva De las abejas y apicultura., & Minagricultura. (2018). Cadena productiva de las abejas y apicultura & quot; cifras sectoriales de 2018"; <https://drive.google.com/file/d/1-Hz6b0GwziQMKzWb2FA6J8lvF1BRXw1Z/view>
- Çelemlı, Ö. G. (2012). Pot-Honey. In P. Vit, S. R. P. M., & D. Roubik. (Eds.), *Pot-Honey* (pp. 525–528). SpringerLink (Online service).
- Cepero Briz, R. (2008). Retirada de los antibióticos promotores del crecimiento en la Unión Europea: Causas y consecuencias. XII Congreso Bienal de La Asociación Mexicana de Especialistas En Nutrición Avícola (AMENA) Facultad de Veterinaria Universidad Zaragoza, 1–46.
- Çetin, E., Silici, S., Çetin, N., & Güçlü B. K. (2010). Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. *Poultry Science*, 89(8), Pages 1703–1708.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.2009-00546>
- Choi, J. H., Kim, G. B., & Cha, C. J. (2014). Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science*, 93(8), 1942–1950. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03974>
- Collignon, P. (2009). The use of antibiotics in food production animals; does this cause human health problems? *RSPCA Australia Scientific Seminar*, 1–11.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., Fernandez, M. C., Hernández, I. M., Rosado, A., & Rastrelli, L. (2007). Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7502–7509.
<https://doi.org/10.1021/jf071296w>

- Cunha, M. G., Franchin, M., Galvão, L. C. C., Ruiz, A. L. T. G. de, Carvalho, J. E. de, Ikegaki, M., Alencar, S. M. de, Koo, H., & Rosalen, P. L. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-23>
- Denli, M., Cankaya, S., Silici, S., Okan, F., & Uluocak, A. N. (2005). Effect of dietary addition of turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). 848–854.
- Dimov, V., Manolova, I. N., Bankova, V., Nikolov, N., & Popov, S. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*, 22, 160–162. https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1991/02/Apidologie_0044-8435_1991_22_2_ART0008.pdf
- Domingo, I. (2015). Influencia de la integridad intestinal sobre el rendimiento y rentabilidad aviares.
- Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L. K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G. B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., & Pillai, D. R. (2010). Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* serovar heidelberg from chicken meat and humans, Canada. 16(1). <https://doi.org/10.3201/eid1601.090729>
- Farré, Frasquet, & Sánchez. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45(1), 21–43.
- Farrell, D. (2013). Poultry Development: The nutritional benefits of chicken meat compared with other meats. In *The role of poultry in human nutrition* (FAO 2013).
- Fenavi. (2022). *Avicultores*.
- Freitas, J., Vanat, N., Pinheiro, J., Balarin, M., Sforcin, J., & Venanci, E. (2011). The effects of propolis on antibody production by laying hens. *Poultry Science*, 90(6), 1227–1233. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.2010-01315>
- Galal, A., & Zaki, T. G. (2008). Productive Performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. *International Journal of Poultry Science*, 7(3), 272–278.
- Gálvez, C. F., Benavides, G. F. R., & Osorio, J. (2009). El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas. *Biosalud*, 8(ISSN 1657-9550), 2–6.
- Garnica, D. S. (2005). Guía ambiental apícola. *Biocomercio Sostenible*, 91.

-
- Garrett, W. S., Gordon, J. I., & Glimcher, L. H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*, 140(6), 859–870. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.023>
- Gil, J., Durango, D., Rojano, B., & Marin, J. (Eds.). (2013). Antioxidant activity and Chemical composition of Colombian propolis. In *Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants* (CABI, pp. 95–97).
- González, N., & Barbeito, C. G. (2014). *Histología de las Aves* (primera). Universidad nacional de la plata. www.editorial.unlp.edu.ar
- Hafez, H. M., & Attia, Y. A. (2020). Challenges to the poultry industry: Current perspectives and strategic future after the COVID-19 Outbreak. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(August). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00516>
- Hassan, M. M., El Zowalaty, M. E., Lundkvist, Å., Järhult, J. D., Khan Nayem, M. R., Tanzin, A. Z., Badsha, M. R., Khan, S. A., & Ashour, H. M. (2021). Residual antimicrobial agents in food originating from animals. *Trends in Food Science and Technology*, 111(January), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.075>
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., Trombetta, D., Kiani, R., Kobarfard, F., Mojgani, N., Saffarian, P., Ayatollahi, S. A., Sarkar, C., Islam, M. T., Keriman, D., Uçar, A., ... Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>
- Hughes, P., & Heritage, J. (2004). Antibiotic growth-promoters in food animals. In *assessing quality and safety of animal feeds*. In FAO.
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Immerseel, F. Van. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*, 187(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>
- Jaramillo-Colorado, B., Duarte-Restrepo, E., & Jaimes, L. (2016). Bioactividad del aceite esencial de *Croton trinitatis* Millsp colombiano. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 15(4), 249–257.
- Kačániová, M., Rovná, K., Arpášová, H., Čuboň, J., Hleba, L., Pochop, J., Kunová, S., & Haščík, P. (2012). In vitro and *in vivo* antimicrobial activity of propolis on the microbiota from gastrointestinal tract of chickens. *Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 47(11), 1665–1671. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.687248>

- Kalpna, P., & Srinivasan, K. (2004). Digestive stimulant action of spices.pdf (pp. 167–169).
- Klis, van der, & Jansman. (2002). Salud intestinal ajuste de dietas. http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1176982877a.pdf
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–17.
- Lenhardt, & Moze. (2003). Morphological and functional changes of the small intestine in growth-stunted broilers. *ACTA VET. BRNO*, 72, 353–358. <http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83–99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>
- Márquez Hernández, I., Campo Fernández, M., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2005). Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 68(6), 931–934. <https://doi.org/10.1021/np0495884>
- Martínez, J., Garcia, C., Durango, D., & Gil, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Characterization of propolis from municipality of Caldas obtained through two collection methods*. 17(1), 2861–2869.
- Monzote, L., Cuesta-Rubio, O., Fernandez, M. C., Hernandez, I. M., Fraga, J., Pérez, K., Kerstens, M., Maes, L., & Cos, P. (2012). In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memories Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(8), 978–984. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800003>
- Nesporova, K., Valcek, A., Papagiannitsis, C., Kutilova, I., Jamborova, I., Davidova-Gerzova, L., Bitar, I., Hrabak, J., Literak, I., & Dolejska, M. (2021). Multi-drug resistant plasmids with *esbl/ampc* and *mcr-5.1* in paraguayan poultry farms: The linkage of antibiotic resistance and hatcheries. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040866>
- Orsi, R., Funari, S. R. C., Soares, A. M. V. C., Calvi, S. A., Oliviera, S. L., Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2000). Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6(2), 205–219. <https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000200006>
- Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., & Plessi, M. (2012). Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *Journal*

- of Agricultural and Food Chemistry, 60(11), 2852–2862.
<https://doi.org/10.1021/jf205179d>
- Pieroni, C. A., de Oliveira, M. C., dos Santos, W. L. R., Mascarenhas, L. B., & Oliveira, M. A. D. (2020). Effect of green propolis on the productivity, nutrient utilization, and intestinal morphology of Japanese laying quail. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49. <https://doi.org/10.37496/RBZ4920190198>
- Potten, C. S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353(1370), 821–830. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0246>
- Prakatur, I., Miškulin, I., Senčić, Đ., Pavić, M., Miškulin, M., Samac, D., Galović, D., & Domaćinović, M. (2020). The influence of propolis and bee pollen on chicken meat quality. *Veterinarski Arhiv*, 90(6), 617–625. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0888>
- Ramírez, I., Cruz, A., & Martínez, P. (2015). Propóleos En Aves-Pollos De Engorde- Y Sus Perspectivas Clínicas En Salud Animal. 1–7.
- Ripari, N., Sartori, A. A., da Silva Honorio, M., Conte, F. L., Tasca, K. I., Santiago, K. B., & Sforcin, J. M. (2021). Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(3), 281–299. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa067>
- Rocha, C., Durau, J. F., Barrilli, L. N. E., Dahlke, F., Maiorka, P., & Maiorka, A. (2014). The effect of raw and roasted soybeans on intestinal health, diet digestibility, and pancreas weight of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(1), 71–79. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00829>
- Salomão, K., Pereira, P. R. S., Campos, L. C., Borba, C. M., Cabello, P. H., Marcucci, M. C., & De Castro, S. L. (2008). Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 317–324. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem058>
- Sepulveda, E., Gooycolea, F., Hernandez, J., & Velásquez, C. (2006). Pinocebrina: Principal componente químico de propóleo sonorenses. *Invurnus*, 1(2). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1126.0007>
- Seven, I., Seven, P. T., & Silici, S. (2011). Effects of dietary Turkish propolis as alternative to antibiotic on growth and laying performances, nutrient digestibility and egg quality in laying hens under heat stress. *Revista Medica Veterinaria*, 3, 186–191.
- Sforcin, J., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of

- new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253–260.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
- Shehata, M. G., Ahmad, F. T., Badr, A. N., Masry, S. H., & El-Sohaimy, S. A. (2020). Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2020.12.001>
- Shreif, E. Y., & El-saadany, A. S. (2016). The effect of supplementing diet with propolis on bandarrah laying hens' performance. 5623(36).
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
- Silveira, M. A. D., De Jong, D., Berretta, A. A., Galvão, E. B. dos S., Ribeiro, J. C., Cerqueira-Silva, T., Amorim, T. C., Conceição, L. F. M. R. da, Gomes, M. M. D., Teixeira, M. B., Souza, S. P. de, Santos, M. H. C. A. dos, San Martin, R. L. A., Silva, M. de O., Lírio, M., Moreno, L., Sampaio, J. C. M., Mendonça, R., Ultchak, S. S. Passos, R. da H. (2021). Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111526>
- Spellberg, B., Hansen, G. R., Kar, A., Cordova, C. D., Price, L. B., & Johnson, J. R. (2016). Antibiotic Resistance in Humans and Animals.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>
- Talero, C. A. (2014). Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellifera*) en tres áreas geográficas de Colombia. <http://bdigital.unal.edu.co/39430/1/cesaraugustotalerourrego.2014.pdf>
- Tiveron, A. P., Rosalen, P. L., Franchin, M., Cristina, R., Lacerda, C., Bueno-silva, B., Benso, B., Denny, C., Ikegaki, M., & Alencar, S. M. De. (2016). Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south brazilian organic propolis. 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165588>
- Turk, D. E. (1982). The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization.

-
- <http://ps.oxfordjournals.org/>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Vieira, W. C., Geraldo, A., Zangerônimo², M. G., Gonçalves, J. M., Avelar, G. S., Costa, L. M. S., Valentim, J. K., & Garcia, R. G. (2020). Replacement of performance enhancers by propolis ethanol extract in broiler diets. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 43(1807–8672), 1–10.
- Yegani, M., & Korver, D. R. (2008). Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. *Poultry Science*, 87(10), 2052–2063. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00091>
- Zafarnejad, K., Afzali, N., & Rajabzadeh, M. (2017). Effect of bee glue on growth performance and immune response of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 2119, 1–6. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1174130>

2. Capítulo 2

Determinación del perfil de compuestos del propóleo de dos municipios de Cundinamarca.

Resumen

La composición del propóleo es ampliamente variable, ya que está influenciada por el origen geográfico y la diversidad botánica circundante que las abejas visitan en la búsqueda de resinas. Dado esto es necesaria la caracterización química con el fin de poder establecer algunos componentes relacionados con el efecto o actividad biológica del propóleo. El objetivo de este capítulo fue caracterizar propóleo procedente de Cundinamarca en relación con su perfil/contenido de metabolitos secundarios. A partir de la elaboración de extracto etanólico se determinó el perfil de compuestos por cromatografía de gases acoplada a masas y cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detector de masas Orbitrap (UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS). Se destacaron varios compuestos como el ácido cafeico, quercetina y ácido ferúlico para ambas muestras en diferentes concentraciones respectivamente. Se evidenciaron compuestos terpenoides que han sido asociados a actividad antioxidante; en la muestra de La Mesa se detectó lanosterol (triterpenos) y para Anolaima, lupeol, lupeona y α -Amirona (Triterpenos) como compuestos más abundantes. Este es el primer reporte de propóleo de esta zona de Cundinamarca, lo cual permite un primer acercamiento a los compuestos presentes y posible funcionalidad de los propóleos en esta zona.

Palabras clave: composición propóleo, terpenos, cromatografía.

Introducción

El propóleo es un producto extraído de las colmenas de abejas, principalmente elaborados de resinas de plantas del hábitat de las abejas. Al interior de las colmenas cumplen una función principalmente estructural, ya que las abejas lo usan para sellar cualquier orificio distinto a la entrada de la colmena. Por sus propiedades funcionales, se constituye en una barrera de defensa de la colonia porque contiene compuestos bioactivos contra microorganismos patógenos, muchas de estas estructuras químicas bioactivas son metabolitos secundarios de las plantas, que las abejas colectan, acondicionan, transforman y acumulan en los propóleos (Cunha et al., 2013).

De acuerdo a los reportes de literatura, se han estudiado propóleos de diferentes partes del mundo, caracterizando los compuestos entre los cuales se han reportado grupos como ésteres, fenoles, flavonoides, ácidos aromáticos, alifáticos y terpenos, describiendo la actividad biológica y a su vez el posible origen botánico del compuesto (Bankova *et al* 2016)

En América del sur, Brasil es uno de los países con amplia experiencia e información con relación a propóleos de la zona, destacando el propóleo verde como un producto estandarizado en su composición y propiedades. Este es un aspecto importante, ya que la composición puede ser altamente variable entres zonas geográficas y cambios de clima en una misma zona (Papotti et al., 2012). Por esta razón, es relevante la identificación de los compuestos de propóleo, con el fin de establecer su relación con la actividad biológica, y el origen geográfico. El objetivo de este capítulo fue identificar el perfil de composición de propóleo de dos regiones de Cundinamarca y establecer su variación de un territorio a otro.

Materiales y métodos

Zona de estudio, obtención de propóleo y preparación de extractos

Las zonas de estudio seleccionadas para la obtención de propóleo hacen parte de la provincia del Tequendama: La mesa con una temperatura promedio de 24 °C y 1200 msnm y Anolaima con una temperatura promedio de 20 °C y 1675 msnm.

Se obtuvieron muestras de 12 diferentes apiarios de productores apícolas que participaron voluntariamente de cada una de las zonas, éstas se recolectaron por medio de trampas recolectoras de propóleo.

El propóleo se conservó en bolsas herméticas en congelación hasta el momento del procesamiento; de acuerdo con el método descrito por Talero (2014) posteriormente las muestras se pesaron y se trituraron para obtener partículas más pequeñas, cada una de las muestras se depositaron en frascos de vidrio ámbar, por cada 30g de propóleo se agregaron 70 ml de alcohol etílico al 96% de pureza. Se mantuvieron durante 15 días en este proceso en agitación diaria con el fin de extraer la mayor parte de compuestos. Luego se filtraron para retirar los residuos y material que no se disuelve como ceras e impurezas.

Determinación de compuestos en extracto de propóleo por cromatografía de gases acoplada a masas (GS/MS).

Los extractos etanólicos de propóleo se enviaron al Instituto de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander para la determinación del perfil de compuestos volátiles por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas. De acuerdo con el método reportado por el Instituto de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, la muestra se diluyó en diclorometano. La separación y detección de las sustancias aisladas se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, AT 5973N), operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (full scan). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 5%-Ph-PDMS, 60 m x 0.25 mm x 0.25 µL. La inyección se realizó en modo splitless, con un volumen de inyección de 2 µL.

Adicionalmente, se determinaron compuestos fenólicos por cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detector de masas Orbitrap (UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS) y extracción por ultrasonido. Una cantidad del extracto obtenido fue disuelto en una mezcla de metanol: agua al 0.2% en ácido fórmico (1:1), se agitó con vórtex (5 min) y se realizó sonicación (5 min), posteriormente se inyectó. Los extractos se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC), Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente (HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfaz del LC-MS fue la electronebulización (ESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones Orbitrap. La separación se realizó en una columna Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9 μ m de tamaño de partícula) a 30° C. La fase móvil fue A: una solución acuosa de 0,2% de formiato de amonio y B: acetonitrilo con 0,2% de formiato de amonio. La condición inicial de gradiente fue de 100% A, cambiando linealmente hasta 100% B (8 min); se mantuvo durante 4 min; el retornó a las condiciones iniciales en 1 min; el tiempo total de corrida fue de 13 min, con 3 min para post-corrída. El espectrómetro de masas Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), conectado por la interfaz de electronebulización (HESI), operada en modo positivo con un voltaje de capilar de 4,5 kV. Se usó nitrógeno como gas secante. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de masas m/z 60- 900. El detector de masas Orbitrap fue calibrado con las soluciones de referencia certificadas: Ultramark™ 1621 Mass Spec (AB172435, ABCR GmbH & Co. KG), dodecilsulfato de sodio (L4509, Sigma-Aldrich) y taurocolato de sodio hidratado (T4009, Sigma-Aldrich). La identificación de los compuestos se realizó usando el modo de adquisición full scan y extracción de iones (EIC) correspondientes a los $[M+H]^+$ de compuestos de interés, medición de masas con exactitud y precisión de Δ ppm < 1 y usando una solución-mix estándar de los compuestos fenólicos (sustancias certificadas estándar) (Anexo 1).

Estudio de etnobotánica

Adicionalmente a los apicultores de la zona que proveyeron muestras de propóleo se realizaron visitas en los predios para aplicar una encuesta y tomar muestras botánicas y por medio de etnobotánica inferir el posible del origen botánico de las resinas. Se

establecieron transectos de acuerdo a la información suministrada por los productores, y se recolectaron semillas, ramas con flores, frutos, corteza. Dependiendo la disponibilidad de las plantas. Posterior a las visitas se realizó la identificación de las plantas. Con el apoyo de un experto botánico, identificando por familia y posiblemente genero para algunas de estas.

Resultados

Para la muestra de propóleo proveniente de la Mesa se rastrearon 40 compuestos volátiles en total, de los cuales algunos se presentan sin identificación. Para la muestra de Anolaima se rastrearon 33 compuestos y también se presentan algunos sin identificación (Anexo 1).

En la tabla 2 se observan el perfil de compuestos de propóleos de las dos regiones, La Mesa y Anolaima por cromatografía de gases acoplada a masa (GS/MS) se identificaron compuestos como ácidos grasos, aceites esenciales, ácidos aromáticos y terpenos. Se evidencian compuestos similares para ambas muestras como benzoato de etilo, ácido benzoico, Acetato de α -amirnilo y ácido palmítico en diferentes % de cantidad relativa.

En ambos se evidenciaron terpenos para la muestra de La Mesa lanosterol 5% y para el caso de Anolaima 3 terpenos α -amirona (5%), lupenona (5%) y lupeol (14,4%).

En la tabla 3 se observan los compuestos identificados por medio de cromatografía líquida UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS, se identificaron ácidos hidroxicinámicos como el ácido cafeico, ácido felúrico y ácido ursólico en ambas muestras y un solo flavonoide quercetina en La Mesa (2%) y Anolaima (1,5%). Los demás compuestos fenólicos se detectaron por debajo del nivel mínimo de cuantificación.

Adicionalmente a los apicultores de la zona que proveyeron muestras de propóleo se realizaron visitas en los predios para aplicar una encuesta y tomar muestras botánicas y por medio de etnobotánica inferir el posible del origen botánico de las resinas. Se establecieron transectos de acuerdo a la información suministrada por los productores, y se recolectaron semillas, ramas con flores, frutos, corteza. Dependiendo la disponibilidad de las plantas. Posterior a las visitas se realizó la identificación de las plantas. Con el

apoyo de un experto botánico, identificando por familia y posiblemente género para algunas de estas.

Tabla 2. Perfil de compuestos relevantes de propóleos por cromatografía de gases acoplada a masas (GS/MS) en la Mesa y Anolaima Cundinamarca.

Compuesto	La Mesa		Anolaima	
	Tiempo de retención	Cantidad relativa %	Tiempo de retención	Cantidad relativa %
$C_6H_{14}O_2$	7,8	0,3	-	-
1,1-Dietoxietano	8,1	7,8	8,2	1,2
C_9H_{16}	15,1	0,6	15,2	0,6
$C_6H_{14}O_3$	15,6	0,2	-	-
α -Pinenol	16,1	0,3	-	-
Derivado de siloxanos	18,0	0,2	-	-
Malonato de dietilo	21,6	0,4	-	-
Acetofenona	21,8	1,0	-	-
Benzoato de etilo	25,9	1,3	25,9	0,4
Ácido benzoico	26,8	4,9	26	0,4
$C_{10}H_{12}O_2$	27,7	0,6	-	-
Cadina-3,5-dieno	36,2	0,2	-	-
6-Pentadecil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona	-	-	61,7	1,1
Lanosterol	75,3	5,0	-	-
α -Amirona	-	-	77,8	5,0
Lupenona	-	-	78,4	5,0
Lupeol	-	-	79,6	14,4
<i>ar</i> -Curcumeno	37,2	0,2	-	-
Epizonareno	37,8	0,2	-	-
Acetato de α -aminerilo	82,7	2,7	82,7	12,3
2-Oxopropanoato de etilo	-	-	10,1	0,2
Ftalato de bis(2-etilhexilo)	-	-	61,3	1,4
δ -Cadineno	38,5	0,2	-	-
<i>trans</i> -Calameneno	39,3	0,8	-	-
$C_{15}H_{20}$	39,1	0,2	-	-
α -Calacoreno	39,3	0,2	-	-
α -Colocaleno	41,5	0,2	-	-
$C_{14}H_{24}O_2$	41,6	0,4	-	-
1,1-Dimetoxi-2-propanona	-	-	10,7	0,4
$C_{10}H_{16}O_2$	-	-	34,6	0,6
α -Cadinol	42,6	0,4	-	-
<i>cis</i> -14-nor-Muurool-5-en-4-ona	43,5	0,5	-	-
Cafeína	47,1	0,2	-	-
Ácido palmítico	49,4	0,5	49,4	0,9
Palmitato de etilo	50,1	2,7	-	-
Linoleato de etilo	53,3	1,8	-	-
Oleato de etilo	53,3	4,9	53,4	0,9
Acetato de β -aminerilo	-	-	80,8	5,4

Tabla 3. Perfil de compuestos por UHPLC-ESI+-Obitrap-MS relevantes de propóleos de La Mesa y Anolaima Cundinamarca (mg/kg).

Compuesto	NMC* mg/kg	La Mesa	Anolaima
Teobromina	1.0	< 1,0	< 1,0
Teofilina	1.0	< 1,0	< 1,0
Epigallocatequina (EGC)	1.0	< 1,0	< 1,0
Catequina (C)	1.0	< 1,0	< 1,0
Epicatequina (EC)	1.0	< 1,0	< 1,0
Ácido p-hidroxibenzoico	1.0	< 1,0	< 1,0
Cafeína	1.0	< 1,0	< 1,0
Ácido cafeico	1.0	11,6	3,9
Ácido vanílico	1.0	< 1,0	< 1,0
Epigallocatequina galato (EGCG)	1.0	< 1,0	< 1,0
Ácido p-cumárico	1.0	< 1,0	< 1,0
Epicatequina galato (ECG)	1.0	< 1,0	< 1,0
Ácido felúrico	1.0	2,1	3,0
Quercetina	1.0	2,0	1,5
Ácido rosmarínico	1.0	< 1,0	< 1,0
Luteolina	1.0	< 1,0	< 1,0
Kaempferol	1.0	< 1,0	< 1,0
Ácido trans-cinámico	1.0	< 1,0	< 1,0
Naringenina	1.0	< 1,0	< 1,0
Apigenina	1.0	< 1,0	< 1,0
Pinocembrina	1.0	< 1,0	< 1,0
Ácido carnósico	1.0	< 1,0	< 1,0
Ácido ursólico	1.0	1,0	< 1,0
Cianidina 3-rutinosido	1.0	< 1,0	< 1,0
Pelargonidina 3-glucósido	1.0	< 1,0	< 1,0
Quercetina 3-glucósido	1.0	< 1,0	< 1,0
Cianidina	1.0	< 1,0	< 1,0
Kaempferol 3-glucósido	1.0	< 1,0	< 1,0
Pelargonidina	1.0	< 1,0	< 1,0

NMC, Nivel mínimo de cuantificación. *Detectado por encima del nivel de detección y por debajo del nivel de cuantificación.

Para los predios visitados y en las encuestas realizadas a todos los productores, varias de las especies son frecuentes como el eucalipto, yarumo, cítricos, mango, caucho y plátano. Para estudios reportados sobre la composición botánica del propóleo, no se reportan estudios con herramientas etnobotánicas con este fin específico. Para este caso es importante resaltar que se espera poder generar una base preliminar del posible origen a partir de datos etnobotánicos, lo cual permita en un correlacione con análisis químicos.

Tabla 4. Identificación posible de plantas recurso de resinas.

Nombre Común	Nombre científico	Familia	Características
Yarumo Guarumo Negro	<i>Cecropia arachnoidea</i> Pittier	<i>Cecropiaceae</i>	Es un árbol nativo de Colombia. Generar un exudado de visco. Se encuentra de forma frecuente en bosques primarios.
Guamo	<i>Inga marginata</i>	<i>Mimosaceae</i>	Se encuentra distribuido ampliamente en Cundinamarca.
Eucalipto	<i>Eucalyptus ficifolia</i>	<i>Myrtaceae</i>	Distribuido en zonas altas
Mango	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	Generan un exudado de color blanco. Visitado por varios tipos de insectos.
Caucho	<i>Ficus tequendamae Dugand</i>	<i>Moraceae</i>	Es una especie nativa de Colombia
Sangregado Sangre de cristo	<i>Croton smithianus</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Es una especie nativa de Colombia. Genera exudado color rojo
Pino		<i>Podocmpaceae</i>	Frecuentemente genera exudades por el desprendimiento de ramas.
Plátano		<i>Musaceae</i>	Las flores generan un exudado lechoso
Arrayan		<i>Myrtaceae</i>	Es una especie nativa de Colombia
Nogal cafetero Moho		<i>Boraginaceae</i>	Es una especie nativa. Usado en

			restauración de bosque secundario.
Roble		<i>Bignoniaceae</i>	Es una especie nativa
Naranja		<i>Rutaceae</i>	
Mamey	<i>Mammea americana</i>	<i>Clusiaceae</i>	Genera un exudado amarillo
Guayabo		<i>Myrtaceae</i>	Es una especie nativa

Discusión

Como se mencionó anteriormente, la composición del propóleo es ampliamente variable, ya que sus compuestos principales provienen de resinas y bálsamos que las abejas recolectan de diferentes plantas, dependiendo su ubicación geográfica y la vegetación disponible (Farré et al., 2004).

En general se identifican varios grupos de compuestos en el perfil de composición, para las muestras analizadas como ácidos aromáticos, terpenos, ácidos grasos y ácidos hidroxicinámicos. En propóleos colombianos de la región de Antioquia se presentan algunas similitudes con compuestos primarios como ácidos grasos, entre los que se destacan el palmítico, linoleico y oleico (Martínez et al., 2012). Palomino et al. (2010) reportaron una amplia variedad de compuestos terpénicos, tipo labdano, como ácido isocuprésico, ácido cuprésico, lupeol y agatadiol en comparación con la muestra proveniente de Anolaima en la que se identificaron triterpenos pentacíclicos como el lupeol, lupenona y α -Amirina asociados con actividad antioxidante, antiinflamatoria y hepatoprotector; estos compuestos también han sido reportados en propóleos brasileros y cubanos (Bracho et al., 2009). Según Šturm & Ulrich (2020), los triterpenoides pentacíclicos se encuentran en gran medida en el propóleo tropical, los mecanismos de acción de la α -amirina, la β -amirina y el lupeol interactúan con el núcleo hidrofóbico de las membranas, mostrando fuertes efectos citotóxicos frente a cepas patógenas. Barrera et al. (2015) reportaron estos triterpenos en propóleo de Zaragoza, Antioquia. Gil et al. (2013)

reportaron resultados de propóleos antioqueños ricos en terpenos y triterpenos asociados a especies vegetales como *Araucaria*.

De acuerdo a lo reportado por Sousa et al. (2016) en un ensayo realizado en ratones con propóleo amarillo brasilero con altos contenido de terpenos especialmente lupeol se observó un efecto ansiolítico y antidepresivo. El lupeol está asociado a una gran variedad de familias de plantas *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Apocynaceae* y *Fabaceae*. Se ha documentado actividad antiprotzoaria, antiinflamatoria, anticancerígeno e inhibidor de algunas enzimas específicas relacionadas con daño celular (Gallo & Sarachine, 2014). Entre los ácidos fenólicos más comunes en propóleos europeos se reporta el ácido benzoico y cinámico, relacionados con actividad antioxidante (Kędzia 2009). Asimismo, entre los derivados más frecuentes del ácido benzoico se reporta el ácido p-hidroxi-benzoico, el ácido p-metoxibenzoico y el ácido gálico (Kurek et al 2014). El ácido benzoico se evidenció en ambas muestras, pero con un porcentaje mayor para la muestra de La Mesa en comparación a Anolaima.

Se identificaron en pequeñas cantidades aceites esenciales, epizonareno presente en plantas como el pino o ciprés (*Cupressus*). También ar-Curcumeno y trans-Calameneno que son compuestos asociados a la planta *Croton trinitatis millsp* con actividad repelente y antioxidante (Jaramillo-Colorado et al., 2016).

Los ácidos cafeico y ferúlico presentes en los dos municipios evaluados presentan actividad antibacterial, antifúngica y antitumoral y se han reportado también en propóleo verde brasilero (Sied et al., 2019). Xia et al. (2022) reportaron un efecto como adyuvante del propóleo en vacunas para el parvovirus porcino, al aumentar la respuesta inmune sobre algunas interleucinas e inmunoglobulinas, de esta forma afirmaron que específicamente el ácido ferúlico presentó buen efecto inhibidor sobre las células PK-15 asociadas a la replicación de este virus.

El ácido cafeico es un metabolito secundario presente en varias plantas y ha sido estudiado por sus actividades biológicas como anticancerígeno y antidiabético al inhibir las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa; también se reporta efecto antimicrobiano, antiviral y antioxidante inhibiendo factores de transcripción (Aijaz et al., 2023).

Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides se han asociado a varias actividades biológicas en propóleos; para las muestras del presente estudio, únicamente se evidenció quercetina, el cual se ha relacionado con actividad antiviral y anticancerígena (Yilmaz et al., 2004). En un estudio realizado en ratones se identificó el efecto gastro protector de la quercetina (Beber *et al.* 2018). Otros compuestos fenólicos relacionados en la composición del propóleo como kaempferol, ácido p-cumárico y pinocembrina fueron detectados por debajo de los niveles de cuantificación del equipo. Pinocembrina ha sido relacionado en altos niveles en propóleos de origen europeo y asiático, mientras que los propóleos de climas cálidos tropicales han sido asociados a compuestos terpenoides (Braakhuis, 2019).

En los propóleos colombianos, hasta el momento se reportan terpenos entre los compuestos frecuentes; es importante continuar con la caracterización e investigación de propóleos de diferentes orígenes de Colombia, para generar información para posibles procesos de estandarización.

En un estudio reciente sobre propóleo chilenos en los cuales se realizó identificación botánica a través de fragmentos vegetales y de granos de polen contenidos en el propóleo unos de los más abundantes es el Eucalipto (*Eucalyptus spp*), y para varios estudios habitualmente predomina una especie botánica en la composición (Alvear et al., 2021). Para algunos propóleos brasileros se ha reportado como fuente botánica principal *Hyptis divaricata*.

Para el caso de Colombia en un reporte de año 2000 se encuentran plantas de las cuales las abejas extraen diferentes tipos de recursos como néctar, polen y resinas entre las que se destacan las familias *Asteraceae*, *Ericaceae* y *Euphorbiaceae*. Y en relación a compuestos químicos como terpenos, flavonoides y fenoles se asocian *Labiatae*, *Pinaceae*, y *Umbeliferae* *Eucalyptus sp* (*Myrtaceae*)(Salamanca Grosso et al., 2000) Se destaca el Eucalipto y Pino, que es unos de los más frecuentes reportados según el estudio de etnobotánica desarrollado.

En conclusión, los propóleos estudiados de La Mesa y Anolaima comparten algunos compuestos en común; son ricos en triterpenoides lupeol, lupenona, α -Amirona para las

muestras de Anolaima y para La Mesa el lanosterol, compuestos asociados a una actividad antiinflamatoria y antioxidante. También poseen ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido benzoico en ambas muestras. La caracterización preliminar de los compuestos presentes en las muestras puede permitir posteriormente la relación de propóleo en ensayo *in vivo*.

Bibliografía

- Aijaz Mohd, Keserwani Nishith, Yusuf Mohd, Haque Ansari Nizamul, Usha Ruhinaz I, Kalia Pankaj (2023). Chemical, Biological, and Pharmacological Prospects of Caffeic Acid. *Biointerface research in applied chemistry*. ISSN 2969-5837. Volume 13, Issue 4, 2023, 324. <https://doi.org/10.33263/BRIAC134.324>.
- Alvear, M., Santos, E., Cabezas, F., Pérez-Sanmartín, A., Lespinasse, M., & Veloz, J. (2021). Geographic area of collection determines the chemical composition and antimicrobial potential of three extracts of chilean propolis. *Plants*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/plants10081543>.
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55(12), 1732–1740. <https://doi.org/10.1021/np50090a003>.
- Aparecida Souza Machado, B., Pina Dantas Silva, R., de Abreu Barreto, G., Serra Costa, S., Figuerêdo da Silva, D., Neves Brandão, H., Luiz Carneiro da Rocha, J., Antônio Dellagostin, O., Antônio Pegas Henriques, J., Andrés Umsza-Guez, M., & Ferreira Padilha, F. (2016). Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in brazil. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>.
- Babaei, S., Rahimi, S., Amir, M., Torshizi, K., & Tahmasebi, G. (2016). Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. 7(1), 13–20.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1. <https://doi.org/10.20450/mjcce.2016.864>.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: a review. *Journal of Apicultural Research*, 0(0), 1–10.

<https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426>.

- Barrera, Elizabeth, Gil, Jesús, Restrepo, Ana, Mosquera, Kelly, & Durango, Diego. (2015). A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiiiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(2), 7667-7678. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50982>.
- Beber, A.P.; de Souza, P.; Boeing, T.; Somensi, L.B.; Mariano, L.N.B.; Cury, B.J.; Burci, L.M.; da Silva, C.B.; Simionatto, E.; de Andrade, S.F. Constituents of leaves from *Bauhinia curvula* Benth. exert gastroprotective activity in rodents: Role of quercitrin and kaempferol. *Inflammopharmacology* 2018, 26, 539–550.
- Bracho Pérez J. C, Rodríguez Best C, , Llanes F. Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú* [Internet]. 2009;75(4):439-452. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371937615006>
- Braakhuis Andrea. (2019) Review Evidence on the Health Benefits of Supplemental Propolis. *Nutrients* 2019, 11, 2705; doi:10.3390/nu11112705.
- Choi, J. H., Kim, G. B., & Cha, C. J. (2014). Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science*, 93(8), 1942–1950. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03974>.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., Fernandez, M. C., Hernández, I. M., Rosado, A., & Rastrelli, L. (2007). Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7502–7509. <https://doi.org/10.1021/jf071296w>.
- Cunha, M. G., Franchin, M., Galvão, L. C. C., Ruiz, A. L. T. G. de, Carvalho, J. E. de, Ikegaki, M., Alencar, S. M. de, Koo, H., & Rosalen, P. L. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-23>.
- Denli, M., Cankaya, S., Silici, S., Okan, F., & Uluocak, A. N. (2005). Effect of dietary addition of turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). 848–854.
- Farré, Frasquet, & Sánchez. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45(1), 21–43.
- Freitas, J., Vanat, N., Pinheiro, J., Balarin, M., Sforcin, J., & Venanci, E. (2011). The

-
- effects of propolis on antibody production by laying hens. *Poultry Science*, 90(6), 1227–1233. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.2010-01315>
- Gallo Margareth B. C, Sarachine Miranda J. (2009) Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. (Special Issue 1), 46-66.
- Garrett, W. S., Gordon, J. I., & Glimcher, L. H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*, 140(6), 859–870. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.023>.
- Gil, J., Durango, D., Rojano, B., & Marin, J. (Eds.). (2013). Antioxidant activity and Chemical composition of Colombian propolis. In *Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants* (CABI, pp. 95–97).
- Hafez, H. M., & Attia, Y. A. (2020). Challenges to the poultry industry: Current perspectives and strategic future after the COVID-19 Outbreak. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(August). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00516>.
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., Trombetta, D., Kiani, R., Kobarfard, F., Mojgani, N., Saffarian, P., Ayatollahi, S. A., Sarkar, C., Islam, M. T., Keriman, D., Uçar, A., ... Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>.
- Jaramillo-Colorado, B., Duarte-Restrepo, E., & Jaimes, L. (2016). Bioactividad del aceite esencial de *Croton trinitatis* Millsp colombiano. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 15(4), 249–257.
- Kačániová, M., Rovná, K., Arpášová, H., Čuboň, J., Hleba, L., Pochop, J., Kunová, S., & Haščík, P. (2012). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of propolis on the microbiota from gastrointestinal tract of chickens. *Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 47(11), 1665–1671. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.687248>
- Kędzia B. Chemical composition of polish propolis. Part I. The initial period of investigations. *Post. Fitoter.* 2009; 1:39–44.
- Klis, van der, & Jansman. (2002). Salud intestinal. Ajuste de dietas. http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1176982877a.pdf
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–17.

-
- Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*. 2013 Dec 20;19(1):78-101. doi: 10.3390/molecules19010078. PMID: 24362627; PMCID: PMC6271064
- Ma Xia, Guo ZhenHuan, Li Yana, Yang Kun, Li Xianghui, Liu Yonglu, Shen Zhiqiang, Zhao Li, Zhang Zhiqiang. Phytochemical Constituents of Propolis Flavonoid, Immunological Enhancement, and Anti-porcine Parvovirus Activities Isolated From Propolis. *Frontiers in Veterinary Science*, volumen 9 2022. DOI=10.3389/fvets.2022.857183. ISSN=2297-1769
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83–99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>.
- Márquez Hernández, I., Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2005). Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 68(6), 931–934. <https://doi.org/10.1021/np0495884>
- Martínez, J., Garcia, C., Durango, D., & Gil, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Characterization of propolis from municipality of Caldas obtained through two collection methods*. 17(1), 2861–2869.
- Monzote, L., Cuesta-Rubio, O., Fernandez, M. C., Hernandez, I. M., Fraga, J., Pérez, K., Kerstens, M., Maes, L., & Cos, P. (2012). In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(8), 978–984. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800003>.
- Nesporova, K., Valcek, A., Papagiannitsis, C., Kutilova, I., Jamborova, I., Davidova-Gerzova, L., Bitar, I., Hrabak, J., Literak, I., & Dolejska, M. (2021). Multi-drug resistant plasmids with *esbl/ampc* and *mcr-5.1* in paraguayan poultry farms: The linkage of antibiotic resistance and hatcheries. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040866>.
- Orsi, R., Funari, S. R. C., Soares, A. M. V. C., Calvi, S. A., Oliviera, S. L., Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2000). Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6(2), 205–219. <https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000200006>.

- Palomino García Lady Rossana, Martínez Galán Julián Paúl, García Pajón Carlos Mario, Gil González Jesús Humberto, Durango Restrepo Diego Luis. (2010) Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia) *Physicochemical Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, vol. 63, núm. 1, 2010, pp. 5373-5383 Universidad Nacional de Colombia.
- Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., & Plessi, M. (2012). Chemical and Functional Characterization of Italian propolis Obtained by different harvesting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), 2852–2862. <https://doi.org/10.1021/jf205179d>
- Pieroni, C. A., de Oliveira, M. C., dos Santos, W. L. R., Mascarenhas, L. B., & Oliveira, M. A. D. (2020). Effect of green propolis on the productivity, nutrient utilisation, and intestinal morphology of Japanese laying quail. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49. <https://doi.org/10.37496/RBZ4920190198>
- Ripari, N., Sartori, A. A., da Silva Honorio, M., Conte, F. L., Tasca, K. I., Santiago, K. B., & Sforcin, J. M. (2021). Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(3), 281–299. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa067>
- Rodríguez-Pérez, B., Canales-Martínez, M. M., Penieres-Carrillo, J. G., & Cruz-Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria* 30, e2435. doi. <http://doi.org/10.15174.au.2020.2435>.
- Salamanca Grosso, G., Ramírez, C., Rubiano, L., González, E. V., Osorio, E. J., & Monica, H. (2000). *Origen naturaleza y características de los propóleos Colombianos*.
- Salomão, K., Pereira, P. R. S., Campos, L. C., Borba, C. M., Cabello, P. H., Marcucci, M. C., & De Castro, S. L. (2008). Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 317–324. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem058>
- Sepulveda, E., Gooycolea, F., Hernandez, J., & Velásquez, C. (2006). Pinocembrina: Principal componente químico de propóleo sonorenses. *Invurnus*, 1(2). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1126.0007>.
- Sforcin, J., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253–260.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>.

- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
- Shehata, M. G., Ahmad, F. T., Badr, A. N., Masry, S. H., & El-Sohaimy, S. A. (2020). Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.12.001>.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
- Syed Ishtiaq Anjum, Amjad Ullah, Khalid Ali Khan, Mohammad Attaullah, Hikmatullah Khan, Hussain Ali, Muhammad Amjad Bashir, Muhammad Tahir, Mohammad Javed Ansari, Hamed A. Ghramh, Nuru Adgaba, Chandra Kanta Dash, Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 26, Issue 7, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>.
- Silveira, M. A. D., De Jong, D., Berretta, A. A., Galvão, E. B. dos S., Ribeiro, J. C., Cerqueira-Silva, T., Amorim, T. C., Conceição, L. F. M. R. da, Gomes, M. M. D., Teixeira, M. B., Souza, S. P. de, Santos, M. H. C. A. dos, San Martin, R. L. A., Silva, M. de O., Lírio, M., Moreno, L., Sampaio, J. C. M., Mendonça, R., Ultchak, S. S., ... Passos, R. da H. (2021). Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111526>.
- Sousa de Menezes da Silveira Cinthia Cristina, Melo Pereira Fernandes Luanna, Lopes Silva Mallone, Araújo Luz Diandra, Quadros Gomes Antônio Rafael, Monteiro, Christiane Schineider Machado Marta Chagas, Reyes Torres Yohandra, Onofre de Lira Tatiana, Ferreira Antonio Gilberto, Fontes-Júnior Enéas Andrade, Ferraz Maia Cristiane Socorro, "Neurobehavioral and Antioxidant Effects of Ethanolic Extract of Yellow Propolis", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 2906953, 14 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2906953>
- Spellberg, B., Hansen, G. R., Kar, A., Cordova, C. D., Price, L. B., & Johnson, J. R. (2016). Antibiotic Resistance in Humans and Animals.
- Šturm, L.; Ulrih, N. P. Propolis flavonoids and terpenes, and their interactions with model

- lipid membranes: a review. In *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*; Bongiovanni, A., Pocsfalvi, G., Manno, M., Kralj-Iglic, V., Eds.; Academic Press, 2020; Vol. 32, Chapter 2, pp 25–52.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>.
- Talero, C. A. (2014). Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellifera*) en tres áreas geográficas de Colombia. <http://bdigital.unal.edu.co/39430/1/cesaraugustotalerourrego.2014.pdf>
- Tiveron, A. P., Rosalen, P. L., Franchin, M., Cristina, R., Lacerda, C., Bueno-silva, B., Benso, B., Denny, C., Ikegaki, M., & Alencar, S. M. De. (2016). Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of south brazilian organic propolis. 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165588>.
- Turk, D. E. (1982). The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. <http://ps.oxfordjournals.org/>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Vieira, W. C., Geraldo, A., Zangerônimo², M. G., Gonçalves, J. M., Avelar, G. S., Costa, L. M. S., Valentim, J. K., & Garcia, R. G. (2020). Replacement of performance enhancers by propolis ethanol extract in broiler diets. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 43(1807–8672), 1–10.
- Xu, X., Yang, B., Wang, D., Zhu, Y., Miao, X., & Yang, W. (2020). The chemical composition of brazilian green propolis and its protective effects on mouse aortic endothelial cells against inflammatory injury. *Molecules*, 25(20). <https://doi.org/10.3390/molecules25204612>.
- Yılmaz L, Yılsay TÖ, Bayizit AA (2004). Chemical Composition, Biological Properties and Health Effects of Propolis. *Food and Feed Science & Technology Journal* 6: 34-38.
- Yegani, M., & Korver, D. R. (2008). Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. *Poultry Science*, 87(10), 2052–2063. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00091>
- Zafarnejad, K., Afzali, N., & Rajabzadeh, M. (2017). Effect of bee glue on growth

performance and immune response of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 2019, 1–6. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1174130>.

3. Capítulo 3

Evaluación de la inclusión de propóleo en dietas para gallina ponedora de huevo marrón sobre parámetros productivos, calidad de huevo, integridad intestinal y de oviducto.

Resumen

El propóleo contiene compuestos bioactivos con efectos funcionales importantes que pueden contribuir con el fortalecimiento de la integridad intestinal. El objetivo de este capítulo fue evaluar y comparar diferentes niveles de inclusión de propóleo en la dieta de gallinas ponedoras de la línea Hy-Line brown con 26 semanas de edad durante 8 semanas. Se establecieron 5 tratamientos: un control negativo con dieta basal sin ningún aditivo (T1), un control positivo con dieta basal adicionada con 55 mg de bacitracina de zinc (BMD) / kg de alimento (T2) y tres tratamientos con adición de propóleo en niveles de 300 (T3), 600 (T4) y 900 (T5) mg de extracto etanólico de propóleo EEP/kg de alimento. Se evaluaron los indicadores productivos, peso corporal, producción de huevo, consumo de alimento y de ellos se derivaron conversión de alimento, porcentaje de postura y mortalidad. Se evaluaron variables de calidad interna y externa del huevo, así como de la integridad intestinal, del oviducto y parámetros sanguíneos. Todos los tratamientos con inclusión de propóleo en la dieta superaron el porcentaje de postura y el número de huevos ave alojada cuando se comparan con el grupo T2 ($P < 0.05$). Después del desafío con inclusión de frijol soya crudo en la dieta, la suplementación con propóleo minimizó la pérdida de peso de las gallinas. El grupo T2 presentó el mejor peso del huevo ($P < 0.05$), respecto a los demás tratamientos; la fuerza de ruptura de la cáscara fue superior para los grupos suplementados con propóleo y BMD respecto al control negativo ($P < 0.05$). Como resultado del cuadro hemático se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de eosinófilos, el grupo T3 presentó los niveles más altos respecto a los demás grupos, superando los niveles normales para este parámetro; en HB (% hemoglobina), y HCM (Promedio de hemoglobina en un solo glóbulo rojo) el T1 presentó valor mayor respecto a los demás tratamientos. VCM (tamaño de glóbulos rojos) los T4 y T5 obtuvieron valores mayores. Respecto a la morfometría intestinal, se presentaron diferencias ($P < 0.05$) en ancho y profundidad de las vellosidades en los diferentes segmentos entre los tratamientos: en duodeno mayor ancho para T3 respecto a los demás, en yeyuno mayor ancho para el T4 y en íleon mayor profundidad de

las criptas para el T4. En el sistema reproductivo no se presentaron efectos del propóleo ($P > 0.05$) sobre las glándulas secretoras y la morfometría de los cilios.

A partir de los resultados de este capítulo se puede concluir que la inclusión de propóleo en dietas para gallinas ponedoras tuvo diferentes efectos benéficos tanto en indicadores productivos como de integridad intestinal y de oviducto.

Introducción

La actividad del propóleo ha sido ampliamente reportada por sus propiedades antibacterial, antimicótica, antiviral, anticancerígena, inmunoestimulante, entre otras; es por esto que se ha estudiado tanto su composición como el efecto del consumo en animales y humanos (Aparecida Souza Machado et al., 2016).

En los últimos años, las restricciones y prohibiciones al uso de APC y la tendencia por el consumo de productos naturales, orgánicos y libres de químicos, han conducido a generar alternativas naturales que brinden beneficios a la producción y la salud animal, buscando el mejoramiento de parámetros productivos, el fortalecimiento del sistema inmune, la óptima absorción de nutrientes en el tracto digestivo y que a su vez no tengan efectos residuales (Atanasov et al., 2021).

El estudio de productos naturales está dirigido a la búsqueda e identificación de las moléculas que poseen diferentes actividades biológicas (Martin et al., 2013). Estos compuestos pueden provenir de diferentes fuentes como microorganismos, plantas, invertebrados y organismos marinos como respuesta a interacciones propias o como respuesta a estimulantes externos (Martin et al., 2013). Entre los más estudiados están los microorganismos y por trayectoria desde tiempos milenarios las plantas en el área de la etnobotánica. Productos como el propóleo, se presentan como una alternativa porque cumplen con esta descripción, su uso ha sido reportado en diferentes especies como ratones, ganado, cerdos, y en aves como codornices, pavos, pollo de engorde y gallinas (Babaei et al., 2016; Denli et al., 2005; Ramírez et al., 2015). Aunque se reportan resultados positivos sobre diferentes parámetros, aún se evidencia gran variabilidad en cuanto a las

dosis óptimas de inclusión en las dietas, además no se han reportado hasta el momento estudios en gallina ponedora con propóleos de origen colombiano. El objetivo de este estudio se centró en evaluar y comparar diferentes niveles de inclusión de propóleo en la dieta de gallinas ponedoras sobre los parámetros productivos, calidad de huevo, indicadores de integridad intestinal y de oviducto.

Materiales y métodos

Ubicación del experimento, alojamiento y aves

El estudio se desarrolló en el Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia, ubicado en el municipio de Mosquera, con una temperatura ambiente promedio de 14°C, y una altura de 2.630 msnm. La investigación incluyó una muestra homogénea de 240 gallinas de la estirpe Hy Line Brown de 26 semanas de edad hasta la semana 35. Las aves se alojaron en jaula a una densidad de 600 cm²/ave, se manejaron bajo condiciones técnicas y de acuerdo con la normativa de uso de animales del Comité de Bioética de la Universidad Nacional de Colombia.

Tratamientos

Se formuló y preparó una dieta basal maíz-soya (Tabla 5) cumpliendo con los requerimientos según la guía de manejo de la estirpe para la fase de producción en todos los tratamientos. A partir de la semana 6 del experimento se incluyó en la dieta un 3% de frijol soya crudo para todos los tratamientos como desafío. Cada tratamiento con 6 replicas, cada una con 8 aves. Cada tratamiento con 48 aves por tratamiento.

El propóleo utilizado en el bioensayo fue una mezcla de propóleos (50:50) obtenidos en el muestreo de los municipios de La Mesa y Anolaima.

Los tratamientos incluidos en el estudio se describen a continuación:

T1: Dieta basal sin inclusión de propóleo ni APC (semana 6- 8: inclusión de 3% de frijol soya crudo).

T2: Dieta basal con adición de 55 mg de BMD/kg dieta (semana 6- 8: inclusión de 3% de frijol soya crudo).

T3: Dieta basal con la adición de 300 mg EEP/ kg dieta (semana 6- 8: inclusión de 3% de frijol soya crudo).

T4: Dieta basal con la adición de 600 mg de EEP/ kg dieta (semana 6- 8: inclusión 3% de frijol soya crudo).

T5: Dieta basal con adición de 900 mg de EEP/ kg dieta (semana 6- 8: inclusión de 3% de frijol soya crudo).

Tabla 5. Dieta basal con los requerimientos para la fase de producción según la guía de manejo de la estirpe de Ponedora Comercial empleada en el estudio.

Ingrediente	%
Maíz	56,243
Torta de soya	18
Soya integral	14
Sal común	0,3
Carbonato de calcio	9,2
Fosfato bicálcico	1,7
Premezcla mineral	0,1
Premezcla vitaminica	0,1
Colina Hcl	0,07
DL-metionina	0,287
Treonina	0,02

Alimentación y registro de datos

Durante la primera semana se realizó una fase de acostumbramiento del alimento comercial a la dieta basal, el alimento se suministró a primera hora durante las 8 semanas. Se suministraron 115 g/ave/d para todos los tratamientos y agua *ad libitum*.

Pesaje de las aves

Se realizaron cuatro pesajes durante todo el experimento cada 15 días, un pesaje inicial de las 240 aves del experimento, dos pesajes al 20 % de las aves totales (8 aves por tratamiento) y un pesaje final para todas las aves del experimento, para un total de 4 periodos de pesaje. Se tomaron registros diarios durante ocho semanas por cada tratamiento y réplica, incluyendo el número de huevos/réplica y el peso de huevo. Con los datos se calculó % de postura ($\#$ de huevos / $\#$ de gallinas) *100, número de huevos ave alojada ($\#$ de huevos acumulados / $\#$ inicial de aves) y conversión de alimento en kg:docena de huevos (consumo de alimento / $\#$ de docenas de huevos).

Calidad externa e interna del huevo

Antes de finalizar el experimento se tomaron 30 huevos de cada tratamiento (5 por cada réplica). Se llevaron al laboratorio para el análisis de calidad en un equipo analizador de huevo Digital Egg Tester DET6500 donde se determinó y registró el peso de huevo, la resistencia a la ruptura, las unidades Haugh, la altura del albumen, el color de yema, el grosor de la cáscara, la altura de la yema, el diámetro de la yema y el índice de yema.

Toma de muestras para análisis histológico

En la semana 8 del bioensayo se tomaron 6 aves por cada uno de los tratamientos, se sometieron a necropsia en el Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Nacional de Colombia, cumpliendo con el protocolo estipulado para el procesamiento de las aves y la disposición final de las aves procesadas.

Se registraron hallazgos macroscópicos relevantes en los órganos durante la necropsia, así como el peso del hígado, bazo, molleja, proventrículo, tracto digestivo, tracto reproductivo, y número de folículos ováricos predominantes.

Se tomaron muestras de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos, así como de hígado y páncreas para análisis histopatológico. Adicionalmente, se tomó del tracto reproductivo conformado por infundíbulo, mágnium, istmo y útero. Las muestras se procesaron de acuerdo a la técnica propuesta por Wu et al. (2004). Se cortaron secciones de 2 cm aproximadamente, se lavaron con solución salina para eliminar contenido intestinal y se fijaron con formaldehído

tamponado con fosfato al 10%. Posteriormente, las muestras se incluyeron en bloques de parafina y las secciones de los tejidos se cortaron y tiñeron con hematoxilina-eosina.

Parámetros histológicos

Los cortes histológicos se examinaron con un microscopio de luz (Olympus, Tokyo, Japan) y se empleó el software ImageView con un aumento de 40x. En tracto digestivo se evaluaron vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon, donde se midió longitud y ancho de las vellosidades y profundidad de las criptas (μm). Finalmente se realizó un score de parámetros de integridad intestinal, que evaluó grosor de la lámina propia, hipertrofia epitelial, infiltrado inmune del epitelio, infiltrado inmune de la lámina propia, proliferación de células caliciformes, congestión, ooquistes, bacterias, necrosis y dilatación de la cripta. Se asignó una puntuación de 0 – 3, mediante el método modificado “I See Inside” (ISI) de Kraieski et al. (2017) donde puntaje 0 es ausencia de lesión, puntuación 1 es alteración hasta el 25% del área, puntuación 2 es alteración que oscila entre el 25,1 y el 50 % del área y puntuación 3 es la alteración que se extiende a más de 50% del área o frecuencia observada.

Se determinó el factor de impacto - IF de 1-3 con la fórmula descrita en la ecuación 1 y los parámetros definidos en la Tabla 6. El IF se define para cada alteración macroscópica y microscópica durante el análisis, asimismo se establece en función de la reducción de la capacidad funcional de un órgano basada en conocimientos previos de la literatura de 1 a 3, siendo 3 el mayor impacto en la función del órgano. El score máximo ISI se calculó según la fórmula reportada en estudios previos (Brudnicki et al., 2017; Belote et al., 2019).

En el sistema reproductivo se midió la longitud y el ancho de los pliegues primarios y la altura del epitelio de la mucosa y se evaluaron glándulas secretoras por cuadrante, estableciendo una calificación de 1 a 5 de acuerdo al estado de tamaño de la glándula y el número de glándulas por cuadrante. También se consideraron los hallazgos patológicos relevantes en cada una de las secciones evaluadas.

Ecuación 1. Fórmula para calcular la integridad intestinal mediante el método ISI

$$ISI = \Sigma(IF*S)$$

Tabla 6. Parámetros de evaluación de integridad (intestino e hígado) mediante el método "I see inside" con su respectivo factor de impacto.

Órgano	Parámetro evaluado	Factor de Impacto
Intestino	Grosor Lamina propia	2
	Hipertrofia	1
	Hiperplasia	1
	Infiltración de células inflamatorias en el epitelio	1
	Infiltración de células inflamatorias en la lámina propia	3
	Proliferación de células caliciformes	2
	Congestión	2
	Presencia de Ooquistes	3
	Necrosis	3
	Presencia de Bacterias	3
	Dilatación de la Cripta	2
Score máximo		69
Hígado	Congestión	1
	Vacuolización celular	2
	Proliferación de conductos biliares	2
	Infiltración de células inmunes	1
	Necrosis	3
	Pericolangitis	3

Agregado linfático

2

Score máximo 42

Análisis estadísticos

Las gallinas se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar en 5 tratamientos con 6 réplicas por tratamiento y 8 gallinas por cada réplica. Los resultados se analizaron usando el procedimiento GLM (General Linear Model) de SAS Institute (2002). Se hicieron análisis estadísticos descriptivos, análisis de varianza (teniendo en cuenta los supuestos de aleatoriedad, normalidad, homocedasticidad e independencia) y cuando se presentaron diferencias significativas se utilizó la prueba de Duncan para comparar la media de los tratamientos experimentales ($p < 0.05$). Para los parámetros de integridad intestinal y de oviducto, los datos se analizaron por estadística no paramétrica y se procesaron por el programa estadístico de SAS Institute (2002).

Resultados

Peso corporal

No se observaron diferencias en el peso corporal de las gallinas ($P > 0.05$) (Tabla 7). Sin embargo, para el último periodo (4) cuando se incluyó un 3% de frijol soya crudo en la dieta, el peso corporal disminuyó para todos los tratamientos, no obstante, los tratamientos suplementados con propóleo perdieron menos peso respecto a los grupos T1 y T2. De esta forma, cuando se compara con el control negativo, quien tuvo una pérdida de peso corporal de 182 g, con los tratamientos T3, T4 y T5 suplementados con propóleo, esa reducción fue significativamente más baja con 91, 48 y 121 g, respectivamente.

Tabla 7. Efecto del consumo de propóleo sobre el peso corporal de gallinas (g).

Tratamiento	Periodo				Diferencia P4-P3
	1	2	3	4	
T1	2077 ± 1.69	2102 ± 1.60	2130 ± 1.54	1948 ± 1.73	-182
T2	2101 ± 1.67	2107 ± 1.53	2124 ± 1.70	1985 ± 1.99	-139
T3	2092 ± 1.81	2101 ± 1.83	2120 ± 1.51	2029 ± 2.15	-91
T4	2096 ± 1.25	2081 ± 2.09	2079 ± 2.51	2031 ± 1.96	-48

Capítulo 3.

T5	2038 ±1.32	2098 ±1.59	2151 ±1.57	2030 ±1.42	-121
----	------------	------------	------------	------------	------

La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas $p > 0.05$. Se tomaron 4 pesajes durante las 8 semanas de experimento, en cada uno de los tratamientos T1 Dieta basal, T2: Dieta basal + 55 PPM BMD (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + 300 mg EEP/kg de alimento, T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento.

Porcentaje de postura y peso del huevo

Se presentaron diferencias entre los tratamientos para las variables porcentaje de postura, peso de huevo, huevos ave alojada y conversión de alimento/ docena de huevo ($P < 0.05$). Los grupos que recibieron la dieta con inclusión de propóleo superaron el porcentaje de postura y el número de huevos ave alojada cuando se comparan con el grupo control positivo (Tabla 7), pero no hubo diferencias respecto al grupo control negativo ($P > 0.05$). Resultados similares fueron encontrados con el número de huevos por ave alojada. Aunque según la norma ICONTEC, todos los pesos promedios del huevo clasificaron como AA, el grupo T2 presentó el mayor peso respecto a los demás tratamientos ($P < 0.05$), los grupos T3 y T4 presentaron un peso promedio de huevo intermedio, y T1 y T5 presentaron más bajo peso del huevo ($P < 0.05$; Tabla 8).

Calidad interna y externa del huevo

La resistencia ruptura obtuvo valores mayores para los grupos tratados con propóleo y BMD cuando se compararon con el grupo T1 ($P < 0.05$; Tabla 9). El índice de yema fue más bajo en el grupo T3 cuando se comparó con T1, T2 y T4 ($P \leq 0.08$). Para las demás variables de calidad no se evidenciaron diferencias ($P > 0.05$).

Hallazgos macroscópicos evidenciados durante las necropsias

En la tabla 10 se muestran los resultados del pesaje de los órganos, los cuales no presentaron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$); sin embargo, para el pesaje del ave, intestino y oviducto se presentan valores mayores para los grupos suplementados con propóleo cuando se comparan con el T1. En la tabla 11 se describen los hallazgos macroscópicos observados en las necropsias, en las que se presentó con más frecuencia el hígado friable (16% de las aves de los tratamientos 2 al 5). La quilla desviada se observó en todos los tratamientos con porcentajes mayores para el T4 y T5 seguidos de los controles

positivos y negativos. En el único tratamiento que no se observó oviducto quístico persistente fue en T2.

Tabla 8. Efecto del consumo del propóleo sobre indicadores productivos

Parámetro	Tratamientos					P< α
	T1	T2	T3	T4	T5	
Consumo de alimento (g)	115	115	115	115	115	
% de postura	96.2 \pm 4.31 ^a	94.2 \pm 4.07 ^b	96.3 \pm 3.53 ^a	95.8 \pm 2.98 ^a	96.7 \pm 3.19 ^a	0.0043
Peso de huevo (g)	62.9 \pm 5.10 ^c	64.2 \pm 4.95 ^a	63.1 \pm 3.95 ^c	63.6 \pm 4.92 ^b	62.6 \pm 4.72 ^d	0.001
Masa de huevo	63.7 \pm 0.69	63.7 \pm 0.68	63.6 \pm 0.74	63.7 \pm 0.71	63.7 \pm 0.71	0.9490
Total huevos/ave alojada	46.1 \pm 0.043 ^a	45.2 \pm 0.040 ^b	46.2 \pm 0.035 ^a	46 \pm 0.029 ^a	46.4 \pm 0.031 ^a	0.0043
Conversión de alimento	1.92	1.96	1.96	1.91	1.93	0.046

Diferentes letras para la misma línea evidencian diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$. La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas $p > 0.05$. T1 Dieta basal sin aditivos, T2: Dieta basal + 55 PPM BMD (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + 300 mg EEP/kg de alimento T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento.

Tabla 9. Efecto del consumo del propóleo sobre indicadores de calidad externa e interna del huevo

Variable	T1	T2	T3	T4	T5	P<α
Calidad externa						
Resistencia ruptura	5.14 ± 1.48 ^b	5.27 ± 0.78 ^a	5.21 ± 0.78 ^{ab}	5.41 ± 0.91 ^a	5.26 ± 0.84 ^a	0.0956
Grosor de la cáscara	0.41 ± 0.09	0.40 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.8273
Calidad interna						
Altura de albumen	5.65 ± 0.74	5.67 ± 0.79	5.99 ± 0.92	5.60 ± 0.88	5.93 ± 1.89	0.5977
Color de la yema	6.17 ± 0.50	6.17 ± 0.55	6.17 ± 0.58	6.07 ± 0.58	5.98 ± 0.55	0.8503
Unidades haugh	72.9 ± 6.00	72.25 ± 6.73	75.33 ± 7.41	72.20 ± 6.83	71.26 ± 16.82	0.6840
Altura de la yema	15.75 ± 0.82	21.10 ± 29.26	16.01 ± 0.70	15.71 ± 0.82	16.24 ± 1.26	0.4157
Diámetro de yema	42.52 ± 1.89	42.37 ± 1.79	43.47 ± 1.23	42.59 ± 2.66	42.98 ± 2.40	0.7251
Índice de yema	0.379 ± 0.02 ^a	0.373 ± 0.02 ^a	0.368 ± 0.01 ^b	0.370 ± 0.03 ^{ab}	0.378 ± 0.02 ^a	0.1741

Diferentes letras para la misma línea evidencian diferencias significativas al nivel de p<0.05. La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas p>0.05. T1 Dieta basal sin aditivos, T2: Dieta basal + 55 PPM BMD (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + 300 mg EEP/kg de alimento T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento.

Tabla 10. Peso de órganos (g) de gallinas ponedoras suplementadas con diferentes niveles de propóleo.

TTO	Molleja	Proventrículo	Intestino	Hígado	Grasa	Bazo	Oviducto	Folículos	Peso ave (g)
1	40 ± 3.98	10 ± 2.69	90 ± 7.72	43 ± 7.97	88 ± 29.01	2.18 ± 0.36	66 ± 13.11	41 ± 9.86	1976 ± 206.21
2	47 ± 7.6	12 ± 3.86	96 ± 11.46	42 ± 5.12	98 ± 34.18	1.98 ± 0.58	68 ± 2.6	39 ± 7.01	2305 ± 346.86
3	47 ± 11.58	12 ± 5.03	100 ± 9.59	55 ± 9.63	106 ± 21.48	2.45 ± 0.27	74 ± 13.45	46 ± 2.97	2328 ± 335.82
4	41 ± 3.47	10 ± 3.58	96 ± 12.79	44 ± 6.63	83 ± 41.42	2.08 ± 0.37	80 ± 14.19	46 ± 8.97	1985 ± 237.38
5	37 ± 7.15	16 ± 3.57	110 ± 18.98	49 ± 8.01	96 ± 49.61	4.8 ± 6.09	76 ± 9.22	46 ± 7.05	2130 ± 303.84

La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas $p > 0.05$. T1 Dieta basal sin aditivos, T2: Dieta basal + 55 PPM BMD (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + to T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento.

Tabla 11. Lesiones macroscópicas observadas en las necropsias de las gallinas ponedoras suplementadas con diferentes niveles de propóleo (% de aves con lesión)

Lesiones macroscópicas	Tratamiento				
	1	2	3	4	5
Hemorragias petequiales en pechuga	0	0	0	0	0
Coloración anormal en hígado	0	16	16	0	0
Hígado agrandado	16	0	16	16	16
Hígado friable	0	16	16	16	16
Hígado graso	0	16	0	0	0
Vesícula aumentada de tamaño	0	0	0	0	0
Congestión en cornetes	0	16	16	0	0
Congestión en sacos aéreos	0	0	0	16	0
Opacidad de sacos aéreos	0	16	16	0	0
Espuma en sacos aéreos	0	16	0	0	33
Congestión en tráquea	0	33	16	0	33
Mucosidad en tráquea	0	16	16	0	0
Quilla desviada	33	33	16	66	66
Aumento Glándula proventricular	0	0	0	0	0
Puntos blanquecinos multifocales en Bursa de Fabricio	0	0	0	0	0
Pododermatitis	0	0	0	0	0
Huevo en formación	66	83	33	16	66
Ovario quístico persistente	16	0	33	16	33

Tabla 12. Efecto de la suplementación de la dieta de las gallinas ponedoras con propóleo sobre los parámetros morfométricos en intestino delgado

T	Duodeno			Yeyuno			Íleon		
	Altura de vellosidad	Ancho de vellosidad	Profundidad de criptas	Altura de vellosidad	Ancho de vellosidad	Profundidad de criptas	Altura de vellosidad	Ancho de vellosidad	Profundidad de criptas
1	691 ± 95.5	67 ± 12.1 ^c	136 ± 58.5	762 ± 81.6	107 ± 26.5 ^b	213 ± 60.5 ^b	448 ± 160.4	90 ± 28.7 ^a	129 ± 13.5 ^c
2	680 ± 137.3	73 ± 21.2 ^b	114 ± 10.3	759 ± 182.2	93 ± 25.3 ^b	228 ± 39.7 ^a	623 ± 40.3	61 ± 7.8 ^c	135 ± 47 ^b
3	607 ± 64.2	83 ± 20 ^a	123 ± 20.8	1028 ± 180	66 ± 14.2 ^c	116 ± 57 ^c	704 ± 171.8	85 ± 24.6 ^b	121 ± 53.7 ^b
4	675 ± 92.5	75 ± 18.7 ^b	132 ± 31	928 ± 277.8	161 ± 38 ^a	118 ± 48.7 ^c	602 ± 49.8	63 ± 13.2 ^c	168 ± 20 ^a
5	629 ± 50.3	81 ± 13.9 ^b	125 ± 25.4	854 ± 80.9	108 ± 39.9 ^b	202 ± 73.0 ^b	645 ± 99.7	61 ± 12.9 ^c	160 ± 42.8 ^a

Diferentes letras para la misma línea evidencian diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$. La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas $p > 0.05$. T1 Dieta basal sin aditivos, T2: Dieta basal + 55 mg de BMD/ kg alimento (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + 300 mg EEP/kg de alimento T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento.

Análisis histológico e integridad intestinal

En la tabla 12 se presentan los resultados de morfometría de las vellosidades de intestino delgado para cada uno de los tratamientos en cada sección. En el duodeno se encontró un mayor ancho en las vellosidades de los tratamientos suplementados con BMD y propóleo respecto al control negativo. En el yeyuno, el mayor ancho de las vellosidades fue observado en el T4, y el más bajo fue para el T3 ($P < 0.05$). El T2 presentó la mayor profundidad de criptas y el T3 la menor. En íleon, las vellosidades con menor altura y ancho se presentaron en el grupo experimental T1 respecto a los demás grupos experimentales y la profundidad de las criptas fue mayor en el grupo T4 frente a los demás grupos experimentales ($P < 0.05$).

En la tabla 13 se muestran los resultados de score de alteraciones histológicas del intestino e hígado, se destaca que ninguno de los tratamientos superó los valores máximos del score establecido según la tabla 9 (Kraieski et al., 2017) no obstante, este valor fue más alto para el grupo T3 cercano al valor máximo de score y el más bajo fue en el grupo control negativo.

Tabla 13. Score de integridad intestinal e hígado (“I See Inside” – ISI) de gallinas ponedoras suplementadas con diferentes niveles de propóleo

Tratamiento	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego	Hígado	ISI Total
1	7 ± 5.06	6.7 ± 3.61	6.4 ± 3.21 ^b	13.8 ± 4.44	3.3 ± 1.97	37
2	9.6 ± 2.7	7.7 ± 0.82	6.1 ± 1.83 ^b	15.5 ± 2.59	2.5 ± 1.22	41
3	13.7 ± 3.4	8.1 ± 1.17	10.1 ± 2.04 ^a	16.5 ± 1	4.3 ± 1.03	53
4	7.3 ± 1.15	8.8 ± 1.83	5 ± 2.94 ^b	14.8 ± 1.6	3.7 ± 1.75	40
5	11 ± 2.71	8.7 ± 2.58	7.5 ± 1.91 ^b	14.8 ± 1.79	3.4 ± 1.52	45

Diferentes letras para la misma línea evidencian diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$. La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas $p > 0.05$. T1: Dieta basal sin aditivos, T2: Dieta basal + 55 PPM BMD (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + 300 mg EEP/kg de alimento T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento.

En el oviducto no se evidenciaron diferencias significativas (tabla 14); sin embargo, el grupo 4 presentó valores superiores en altura del pliegue, pero no se presenta una tendencia clara en los indicadores.

Tabla 14. Parámetros morfométricos en oviducto de gallinas ponedoras suplementadas con propóleo

Parámetro	T1	T2	T3	T4	T5
Altura del pliegue (μm)	2.350 \pm 157	2.332 \pm 205	2.367 \pm 168	2.686 \pm 188	2.324 \pm 225
Ancho del pliegue (μm)	659 \pm 61	467 \pm 98	634 \pm 74	734 \pm 59	638 \pm 48
Ancho del epitelio (μm)	14 \pm 8	12.2 \pm 6	12.5 \pm 4	14.6 \pm 6	15 \pm 6
Estado de glándulas	4.5	4.2	4.5	4.7	4.7

La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas $p > 0.05$. T1 Dieta basal sin aditivos, T2: Dieta basal + 55 PPM BMD (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + 300 mg EEP/kg de alimento T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento.

Cuadro hemático

El porcentaje de eosinófilos fue superior en el grupo T3, el porcentaje de hemoglobina HB fue superior en el grupo control, el tamaño de glóbulos rojos (VCM) superior en T4 y T5 y la concentración de hemoglobina crepuscular media (HCM) fue mayor en T1 (Tabla 15).

Tabla 15. Cuadro hemático de gallinas ponedoras suplementadas con propóleo

Parámetro	T1	T2	T3	T4	T5
Hematocrito	30,7 \pm 3.93	31,7 \pm 3.78	30,8 \pm 3.03	32,6 \pm 2.58	29,8 \pm 1.72
Heterofilos (%)	66,7 \pm 15.32	77,7 \pm 5.32	72,8 \pm 9.93	73,3 \pm 9.69	80,5 \pm 5.13
Linfocitos (%)	26,5 \pm 15.41	13,5 \pm 3.78	16,6 \pm 8.29	19,1 \pm 7.73	12,8 \pm 4.17
Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	9 \pm 3.13	9,1 \pm 2.32	7,7 \pm 2.01	10,2 \pm 1.91	11,8 \pm 3.34
Eosinofilos (%)	2,3 \pm 1.51 ^{ab}	4 \pm 1.10 ^{ab}	5,8 \pm 2.05 ^a	2,9 \pm 1.17 ^{ab}	2,1 \pm 0.98 ^b
Monocitos (%)	1 \pm 1.67	0,6 \pm 1.21	0,00 \pm 0.00	1,8 \pm 1.33	0,6 \pm 1.03
Basofilos (%)	3,5 \pm 2.51	4,1 \pm 0.98	4,8 \pm 3.11	2,8 \pm 1.17	3,8 \pm 2.23
Neutrofilos ($10^3/\mu\text{l}$)	5,9 \pm 2.09	7,1 \pm 2.15	5,7 \pm 2.04	7,5 \pm 1.92	9,5 \pm 2.67
HB (g/dL)	8,2 \pm 0.94 ^b	6,7 \pm 0.29 ^a	6,8 \pm 0.63 ^{ab}	7 \pm 0.45 ^{ab}	6,7 \pm 0.27 ^a

VCM (ft)	138,5 ± 10.79 ^b	114,3 ± 16.16 ^a	126,1 ± 26.40 ^b	142 ± 19.27 ^c	140,2 ± 22.15 ^c
HCM (pg)	37,3 ± 5.30 ^a	24,3 ± 2.50 ^c	28,1 ± 6.01 ^{bc}	31 ± 6.07 ^{bc}	31,6 ± 22.15 ^b
CHCM (g/dL)	27,2 ± 5.51	21,5 ± 2.64	22,3 ± 1.13	21,7 ± 1.99	22,6 ± 1.21
ALBUMINA (gr/L)	2,4 ± 0.09	2,5 ± 0.13	2,4 ± 0.07	2,4 ± 0.11	2,5 ± 0.13

Diferentes letras para la misma línea evidencian diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$. La ausencia de letras indica que no hay evidencia de diferencias significativas $p > 0.05$. T1: Dieta basal sin aditivos, T2: Dieta basal + 55 PPM BMD (bacitracina de zinc), T3: Dieta basal + 300 mg EEP/kg de alimento T4: Dieta basal + 600 mg EEP/kg de alimento, T5: Dieta basal + 900 mg EEP/kg de alimento. HB (% de hemoglobina). VCM (Tamaño de glóbulos rojos). HCM (Promedio de hemoglobina en un solo glóbulo rojo). CHCM (Concentración de hemoglobina corpuscular media)

Discusión

En la semana 6 a la 8 cuando se realizó la inclusión de 3% de frijol soya en las dietas, se evidenció menor pérdida de peso para los tratamientos suplementados con EEP. Estos resultados permiten sugerir que el propóleo presentó un posible efecto antiinflamatorio, frente a la actividad pro inflamatoria de los factores anti nutricionales del frijol soya crudo (Rocha et al., 2014). De acuerdo a lo reportado en la literatura, algunos componentes del propóleo como pinocembrina, quercetina y lupeol regulan la liberación de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) y aumenta la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-1) (Hossain et al., 2022). Los resultados del presente estudio, cuando las aves no fueron desafiadas, concuerdan con los reportados por Abdel-Kareem & El-Sheikh (2017) quienes tampoco encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso. En la conversión no se evidenciaron diferencias significativas, sin embargo, se presentaron mejores valores para las dosis de 600 y 900 mg/kg. Abdel-Kareem & El Sheikh (2017) reportaron una mejor tasa de conversión por efecto de la inclusión de 1000 mg de propóleo. De acuerdo con esto, algunos autores infieren que se puede presentar una mejor conversión por el aprovechamiento óptimo de proteína y otros nutrientes; de esta forma, el alto contenido de fenoles y flavonoides mejoraría el ambiente microbiano del intestino. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar estas afirmaciones.

La inclusión del propóleo en la dieta de las aves no redujo ni afectó el consumo de alimento, similar a lo reportado por Ozkok et al. (2013). Abdel-Kareem & El-Sheikh (2017) encontraron un mejor porcentaje de postura con la inclusión de 250, 500 y 1000 mg de propóleo en la dieta de las gallinas. Shreif & El-saadany (2016) también evidenciaron un aumento en el porcentaje de postura en los tratamientos suplementados con propóleo en dosis de 150, 300 y 400 mg de manera creciente. Este comportamiento se observó en el presente estudio, cuando se comparan los grupos que recibieron la dieta con inclusión de propóleo respecto al grupo BMD. Oskok & Silici (2013) no encontraron efectos en el porcentaje de postura con dosis de 100, 200 y 300 ppm de propóleo en la dieta de las gallinas.

Para el peso de huevo, los niveles más altos de propóleo permitieron mejorar este parámetro. Resultados similares encontraron Shreif & El-saadany (2016) donde los tratamientos suplementados presentaron mayores pesos de huevo. En contraste, Abdel-Kareem & El Sheikh (2017) no reportaron diferencias frente a los tratamientos suplementados.

No obstante, el desafío que se planteó en las dos últimas semanas, salvo en peso corporal, no generó respuestas diferentes frente a los tratamientos con propóleo. Posiblemente, las gallinas son más resilientes a estos desafíos cuando se comparan con el pollo de engorde, o el tiempo de exposición no fue suficiente para impactar en los indicadores productivos.

En calidad de huevo, la variable de fuerza de ruptura de la cáscara (STR) en los grupos suplementados fue mayor respecto al grupo control negativo. No se evidenciaron reportes de literatura que evaluaran esta variable. El aumento de la fuerza de resistencia de la cáscara podría estar explicado en las aves suplementadas con propóleo por un posible aumento de la disponibilidad de minerales para la formación de la cáscara de huevo. Sin embargo, no se encontró un efecto importante en el grosor de la cáscara. Marcucci (1995), Ozkok et al. (2013) y Casagrande et al. (2021) tampoco evidenciaron efectos sobre este indicador. En contraste, en codornices, Pieroni et al. (2020) reportaron un menor grosor de la cáscara por efecto de la suplementación con propóleo; no obstante, Shreif & El-saadany (2016) reportaron mayor grosor de la cáscara para los tratamientos con dosis media y alta de propóleo como en el presente estudio.

La literatura reporta diversos impactos del propóleo en la dieta de aves, no obstante, el efecto sobre la morfometría de las vellosidades intestinales, del oviducto y la integridad intestinal en gallinas ponedoras no se han reportado.

Se pudo observar un efecto sobre el ancho de la vellosidad en duodeno con el tratamiento T3 (300mg EEP) que fue mayor respecto a los otros tratamientos. En codornices, se reporta

un aumento de la altura y área de superficie de absorción en duodeno con 2000 mg de propóleo (Pieroni et al., 2020).

En yeyuno se observó el mejor efecto para el T4 (600mg EEP) sobre el ancho de vellosidad y con BMD sobre la profundidad de criptas. Abbas *et al.* (2022) reportaron con la inclusión de 1000 mg/kg de propóleo, un aumento en la altura y ancho de las vellosidades. Estos efectos podrían explicarse por la actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y en consecuencia, una reducción de la translocación bacteriana. Así mismo, las propiedades antiinflamatorias reportadas para el propóleo podrían explicar esta mejora en el epitelio intestinal (Sforcin & Bankova, 2011).

El epitelio intestinal se mantiene en constante renovación celular y estructural, por lo cual las medidas morfométricas cambian constantemente, aún más en animales adultos. Las vellosidades intestinales se ajustan rápidamente a las condiciones del lumen intestinal; en consecuencia, las vellosidades intestinales más largas se asocian con un aumento de la superficie de absorción, mientras que una cripta menos profunda se asocia con una menor necesidad de renovación celular y por ende menor gasto energético (da Silva et al., 2009; Oliveira et al., 2008).

De otra parte, a partir del análisis de las variables asociadas a integridad intestinal, los valores del ISI total para ninguno de los tratamientos superó el score máximo y no se presentaron diferencias significativas frente a los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento 3 con 300 mg de EEP/ kg de alimento, obtuvo el valor más alto. De acuerdo a Brudnicki et al. (2017) y Belote et al. (2019) los valores más altos están relacionados con afectación en la integridad intestinal en las diferentes variables evaluadas.

La evaluación del impacto del propóleo sobre el epitelio del tracto reproductivo no ha sido reportada. El tratamiento 4 (600 mg EEP/kg de alimento) presentó los mejores valores. Wang et al. (2022) afirma que los valores óptimos de estas variables y sobre el mágnum se relacionan directamente con la calidad de la albúmina del huevo. Sin embargo, no se evidencian diferencias significativas, ni relación con parámetros de calidad de huevo.

En relación con el efecto observado sobre el mayor porcentaje de heterófilos y bajo en linfocitos, estaría relacionado con estrés o inmunosupresión. Se resalta el nivel elevado de heterófilos en todos los tratamientos, lo cual podría estar más asociado a factores de estrés en el proceso del muestreo. Similares resultados reportaron Freitas *et al.* (2011) quienes lo

explicaron por el estrés de las aves cuando fueron sujetadas para la extracción de sangre y la inoculación de propóleo y antígeno en este estudio. Saadany *et al.* (2016) encontraron que la suplementación con propóleo disminuyó el recuento de heterófilos y mejoró la relación heterófilos:linfocitos en dosis de 100, 300 y 450 mg de propóleo. Galal & Zaki (2008) reportaron resultados similares con la suplementación entre 100 y 150 mg de propóleo en gallinas ponedoras, relacionando con la comodidad y el bajo estrés en las aves. El porcentaje de eosinófilos altos puede estar asociado a infecciones parasitarias o reacciones alérgicas (Gálvez *et al.*, 2009). El nivel más bajo fue presentado en el grupo 5 con la dosis más alta de propóleo, similares resultados reportaron Abdel *et al.* (2017); los valores normales en aves en general se encuentran entre 0-5% (Sheif, 2016).

La suplementación con propóleo redujo el porcentaje de hemoglobina; en contraste, Çetin *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Saadany *et al.* (2016) reportaron un aumento en el porcentaje de HB a medida que aumentaba la dosis de propóleo, obteniendo el valor más óptimo a 450 ppm. Haro *et al.* (2000) afirman que el propóleo mejora la utilización digestiva del hierro y la eficiencia de regeneración de la hemoglobina. En el caso de este estudio no se destacó ese posible efecto favorable.

La suplementación con propóleo mejoró el VCM (tamaño promedio de los glóbulos rojos). Las variables relacionadas al cuadro hemático son susceptibles, ya que son pruebas que se ven gravemente afectadas a situaciones previas o en el momento de la toma de la muestra de sangre como el estrés por el manejo del animal, que afectan drásticamente los niveles o rangos normales de éstas. En general, los resultados de cuadro hemático no permitieron visualizar unos resultados claros y contundentes del efecto de la suplementación con Propóleo sobre estos indicadores sanguíneos, de integridad intestinal y del oviducto, por lo que se sugiere la realización de estudios complementarios mediante técnicas y equipos más robustos como por ejemplo: técnicas moleculares, citometría de flujo, entre otras.

En conclusión, bajo las condiciones del presente estudio, la inclusión de propóleo presentó efecto favorable sobre el porcentaje de postura y el número de huevos ave alojada, así como sobre el peso corporal cuando las aves fueron desafiadas con la inclusión de un 3% de frijol soya crudo. La calidad del huevo no fue significativamente afectada, excepto la resistencia a la ruptura que tuvo un aumento con la suplementación con propóleo. Sobre los parámetros de histología e integridad de tracto digestivo para este estudio preliminar, el

propóleo no generó efectos negativos, ya que no se presentaron cuadros de enfermedad, intoxicación o mortalidad para los tratamientos suplementados.

Bibliografía

- Abdel-Kareem, A. A. A., & El-Sheikh, T. M. (2017). Impact of supplementing diets with propolis on productive performance, egg quality traits and some haematological variables of laying hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(3), 441–448. <https://doi.org/10.1111/jpn.12407>.
- Abbas, Ahmed O., Abdulaziz A. Alaqil, Hossam S. El-Beltagi, Hanaa K. Abd El-Atty, and Nancy N. Kamel. 2020. "Modulating Laying Hens Productivity and Immune Performance in Response to Oxidative Stress Induced by *E. coli* Challenge Using Dietary Propolis Supplementation" *Antioxidants* 9, no. 9: 893. <https://doi.org/10.3390/antiox9090893>
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55(12), 1732–1740. <https://doi.org/10.1021/np50090a003>.
- Aparecida Souza Machado, B., Pina Dantas Silva, R., de Abreu Barreto, G., Serra Costa, S., Figuerêdo da Silva, D., Neves Brandão, H., Luiz Carneiro da Rocha, J., Antônio Dellagostin, O., Antônio Pegas Henriques, J., Andres Umsza-Guez, M., & Ferreira Padilha, F. (2016). Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>,
- Arpášová, H., Haščík, P., Pistová, V., Mellen, M., Gálik, B., & Fik, M. (2016). The effect of

- propolis extract on internal quality parameters of table eggs. In *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* (Issue 2). <https://www-cabdirect-org.ezproxy.unal.edu.co/cabdirect/FullTextPDF/2017/20173012631.pdf>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
- Babaei, S., Rahimi, S., Amir, M., Torshizi, K., & Tahmasebi, G. (2016). Effects of propolis , royal jelly , honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. 7(1), 13–20.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin, M. N., I Falcão, S., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K. B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., ... Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 1–49.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1.
<https://doi.org/10.20450/mjcce.2016.864>.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: a review. *Journal of Apicultural Research*, 0(0), 1–10.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426>.
- Belote Bruna L., Soares Igor, Tujimoto-Silva Aline, Sanches Adrien W.D., Kraieski Antonio L., (2017) Applying I see inside histological methodology to evaluate gut health in broilers challenged with *Eimeria*, *Veterinary Parasitology*: X.
- Elizabeth Santin Bezerra, W. G. A., Silva, I. N. G., Teixeira, R. S. C., Lopes, E. S., Albuquerque, Á. H., & Cardoso, W. C. (2017). Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. *Archivos de Zootecnia*, 66(254), 301–307.
<https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/2335/1548>.
- Brown, K., Uwiera, R. R. E., Kalmokoff, M. L., Brooks, S. P. J., & Inglis, G. D. (2017). Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their

-
- modes of action to develop effective alternatives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>
- Cadena productiva De las abejas y apicultura., & MINAGRICULTURA. (2018). Cadena productiva de las abejas y apicultura " cifras sectoriales de 2018" <https://drive.google.com/file/d/1-Hz6b0GwziQMKzWb2FA6J8lvF1BRXw1Z/view>.
- Casagrande AC, Machado GC, Brunetto AL, Galli GM, Rosa GD, Araujo DN, Boiago MM, Souza CF, Baldissera MM, Silva ASD. The addition of green propolis to laying hens had positive effects on egg quality: lower bacteria counts in the shell and lipid peroxidation in the yolk. *An Acad Bras Cienc*. 2021 Nov 22;93(suppl 4):e20210315. doi: 10.1590/0001-3765202120210315. PMID: 34817037.
- Çelemlı, Ö. G. (2012). Pot-Honey. In P. Vit, S. R. P. M., & D. Roubik. (Eds.), *Pot-Honey* (pp. 525–528). SpringerLink (Online service).
- Cepero Briz, R. (2008). Retirada de los antibióticos promotores del crecimiento en la Unión Europea: Causas y consecuencias. XII Congreso Bienal de La Asociación Mexicana de Especialistas En Nutrición Avícola (AMENA) Facultad de Veterinaria Universidad Zaragoza, 1–46.
- Çetin, E., Silici, S., Çetin, N., & Güçlü B. K. (2010). Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. *Poultry Science* , 89(8), Pages 1703–1708,. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.2009-00546>.
- Choi, J. H., Kim, G. B., & Cha, C. J. (2014). Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science*, 93(8), 1942–1950. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03974>.
- Collignon, P. (2009). The use of antibiotics in food production animals; does this cause human health problems? *RSPCA Australia Scientific Seminar*, 1–11.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., Fernandez, M. C., Hernández, I. M., Rosado, A., & Rastrelli, L. (2007). Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7502–7509. <https://doi.org/10.1021/jf071296w>.
- Cunha, M. G., Franchin, M., Galvão, L. C. C., Ruiz, A. L. T. G. de, Carvalho, J. E. de,

- Ikegaki, M., Alencar, S. M. de, Koo, H., & Rosalen, P. L. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-23>.
- Denli, M., Cankaya, S., Silici, S., Okan, F., & Uluocak, A. N. (2005). Effect of dietary addition of turkish propolis on the growth performance , carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). 848–854.
- Dimov, V., Manolova, I. N., Bankova, V., Nikolov, N., & Popov, S. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*, 22, 160–162. https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1991/02/Apidologie_0044-8435_1991_22_2_ART0008.pdf
- Domingo, I. (2015). Influencia de la integridad intestinal sobre el rendimiento y rentabilidad aviares.
- Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L. K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G. B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., & Pillai, D. R. (2010). Cefotiofur resistance in salmonella enterica serovar heidelberg from chicken meat and humans , Canada. 16(1). <https://doi.org/10.3201/eid1601.090729>.
- Farré, Frasquet, & Sánchez. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45(1), 21–43.
- Farrell, D. (2013). Poultry Development : The nutritional benefits of chicken meat compared with other meats. In *The role of poultry in human nutrition* (FAO 2013).
- Fenavi. (2022). Avicultores.
- Freitas, J., Vanat, N., Pinheiro, J., Balarin, M., Sforcin, J., & Venanci, E. (2011). The effects of propolis on antibody production by laying hens. *Poultry Science*, 90(6), 1227–1233. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.2010-01315>
- Galal, A., & Zaki, T. G. (2008). Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. *International Journal of Poultry Science*, 7(3), 272–278.
- Gálvez, C. F., Benavides, G. F. R., & Osorio, J. (2009). El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas. *Biosalud*, 8(ISSN 1657-9550), 2–6.
- Garnica, D. S. (2005). Guía ambiental apícola. *Biocomercio Sostenible*, 91.
- Garrett, W. S., Gordon, J. I., & Glimcher, L. H. (2010). Homeostasis and inflammation in

-
- the intestine. *Cell*, 140(6), 859–870. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.023>.
- Gil, J., Durango, D., Rojano, B., & Marin, J. (Eds.). (2013). Antioxidant activity and chemical composition of Colombian propolis. in natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants (CABI, pp. 95–97).
- González, N., & Barbeito, C. G. (2014). *Histología de las Aves (primera)*. Universidad nacional de la plata . www.editorial.unlp.edu.ar
- Hafez, H. M., & Attia, Y. A. (2020). Challenges to the poultry industry: current perspectives and strategic Future after the COVID-19 Outbreak. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(August). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00516>.
- Haro, A., López-Aliaga, I., Lisbona, F., Barrionuevo, M., Alférez, M. J. M., & Campos, M. S. (2000). Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5715–5722.
- Hassan, M. M., El Zowalaty, M. E., Lundkvist, Å., Järhult, J. D., Khan Nayem, M. R., Tanzin, A. Z., Badsha, M. R., Khan, S. A., & Ashour, H. M. (2021). Residual antimicrobial agents in food originating from animals. *Trends in Food Science and Technology*, 111(January), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.075>
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., Trombetta, D., Kiani, R., Kobarfard, F., Mojgani, N., Saffarian, P., Ayatollahi, S. A., Sarkar, C., Islam, M. T., Keriman, D., Uçar, A., ... Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>.
- Hughes, P., & Heritage, J. (2004). Antibiotic growth-promoters in food animals. In assessing quality and safety of animal feeds. In FAO.
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Immerseel, F. Van. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*, 187(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>.
- Jaramillo-Colorado, B., Duarte-Restrepo, E., & Jaimes, L. (2016). Bioactividad del aceite esencial de *Croton trinitatis* Millsp Colombiano. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 15(4), 249–257.
- Kačániová, M., Rovná, K., Arpášová, H., Čuboň, J., Hleba, L., Pochop, J., Kunová, S., &

- Haščík, P. (2012). In vitro and In vivo antimicrobial activity of propolis on the microbiota from gastrointestinal tract of chickens. *Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 47(11), 1665–1671. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.687248>.
- Kalpana, P., & Srinivasan, K. (2004). Digestive Stimulant action of spices.pdf (pp. 167–169).
- Klis, van der, & Jansman. (2002). Salud Intestinal.Ajuste de dietas. http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1176982877a.pdf.
- Kraieski, A.L., Hayashi, R.M., Sanches, A., Almeida, G.C., Santin, E., 2017. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poult. Sci.* 95, 1078–1087.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–17.
- Lenhardt, & Moze, . (2003). Morphological and functional changes of the small intestine in growth-stunted broilers. *ACTA VET. BRNO*, 72, 353–358. <http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83–99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>.
- Márquez Hernández, I., Campo Fernández, M., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2005). Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 68(6), 931–934. <https://doi.org/10.1021/hp0495884>
- Martínez, J., Garcia, C., Durango, D., & Gil, J. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección Characterization of propolis from municipality of Caldas obtained through two collection methods. 17(1), 2861–2869.
- Monzote, L., Cuesta-Rubio, O., Fernandez, M. C., Hernandez, I. M., Fraga, J., Pérez, K., Kerstens, M., Maes, L., & Cos, P. (2012). In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(8), 978–984. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800003>.
- Nesporova, K., Valcek, A., Papagiannitsis, C., Kutilova, I., Jamborova, I., Davidova-Gerzova, L., Bitar, I., Hrabak, J., Literak, I., & Dolejska, M. (2021). Multi-drug resistant plasmids with *esbl/ampc* and *mcr-5.1* in paraguayan poultry farms: The linkage of antibiotic resistance and hatcheries. *Microorganisms*, 9(4).

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040866>.

Orsi, R., Funari, S. R. C., Soares, A. M. V. C., Calvi, S. A., Oliviera, S. L., Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2000). Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6(2), 205–219.

<https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000200006>.

Ozkok D, Iscan KM, Silici S. Effects of dietary propolis supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2013;12(2):269-275.

Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., & Plessi, M. (2012). Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), 2852–2862.

<https://doi.org/10.1021/jf205179d>.

Pieroni, C. A., de Oliveira, M. C., dos Santos, W. L. R., Mascarenhas, L. B., & Oliveira, M. A. D. (2020). Effect of green propolis on the productivity, nutrient utilisation, and intestinal morphology of Japanese laying quail. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49.

<https://doi.org/10.37496/RBZ4920190198>.

Potten, C. S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353(1370), 821–830. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0246>

Prakatur, I., Miškulin, I., Senčić, Đ., Pavić, M., Miškulin, M., Samac, D., Galović, D., & Domaćinović, M. (2020). The influence of propolis and bee pollen on chicken meat quality. *Veterinarski Arhiv*, 90(6), 617–625. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0888>

Ramiírez, I., Cruz, A., & Martínez, P. (2015). Propóleos En Aves-Pollos De Engorde- Y Sus Perspectivas Clínicas En Salud Animal. 1–7.

Ripari, N., Sartori, A. A., da Silva Honorio, M., Conte, F. L., Tasca, K. I., Santiago, K. B., & Sforcin, J. M. (2021). Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(3), 281–299. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa067>.

Rocha, C., Durau, J. F., Barrilli, L. N. E., Dahlke, F., Maiorka, P., & Maiorka, A. (2014). The effect of raw and roasted soybeans on intestinal health, diet digestibility, and pancreas weight of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(1), 71–79.

<https://doi.org/10.3382/japr.2013-00829>.

Salomão, K., Pereira, P. R. S., Campos, L. C., Borba, C. M., Cabello, P. H., Marcucci, M. C., & De Castro, S. L. (2008). Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 317–324. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem058>

Sepulveda, E., Gooycolea, F., Hernandez, J., & Velásquez, C. (2006). Pinocembrina: Principal componente químico de propóleo sonorenses. *Invernus*, 1(2).

<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1126.0007>.

Seven, I., Seven, P. T., & Silici, S. (2011). Effects of dietary Turkish propolis as alternative to antibiotic on growth and laying performances, nutrient digestibility and egg quality in laying hens under heat stress. *Revista Medica Veterinaria*, 3, 186–191.

Sforcin, J. ., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253–260.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>.

Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>

Shehata, M. G., Ahmad, F. T., Badr, A. N., Masry, S. H., & El-Sohaimy, S. A. (2020).

Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 209–217.

<https://doi.org/10.1016/j.aosas.2020.12.001>.

Shreif, E. Y., & El-saadany, A. S. (2016). The effect of supplementing diet with propolis on bandarrah laying hens ' performance. 5623(36).

Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>

Silveira, M. A. D., De Jong, D., Berretta, A. A., Galvão, E. B. dos S., Ribeiro, J. C., Cerqueira-Silva, T., Amorim, T. C., Conceição, L. F. M. R. da, Gomes, M. M. D., Teixeira, M. B., Souza, S. P. de, Santos, M. H. C. A. dos, San Martin, R. L. A., Silva, M. de O., Lírio, M., Moreno, L., Sampaio, J. C. M., Mendonça, R., Ultchak, S. S., ... Passos, R. da H. (2021). Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 138.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111526>.

Spellberg, B., Hansen, G. R., Kar, A., Cordova, C. D., Price, L. B., & Johnson, J. R.

-
- (2016). Antibiotic Resistance in Humans and Animals.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>.
- Talero, C. A. (2014). Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellifera*) en tres áreas geográficas de Colombia. <http://bdigital.unal.edu.co/39430/1/cesaraugustotalerourrego.2014.pdf>
- Tiveron, A. P., Rosalen, P. L., Franchin, M., Cristina, R., Lacerda, C., Bueno-silva, B., Benso, B., Denny, C., Ikegaki, M., & Alencar, S. M. De. (2016). Chemical Characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian Organic propolis. 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165588>.
- Turk, D. E. (1982). The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. <http://ps.oxfordjournals.org/>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Vieira, W. C., Geraldo, A., Zangerônimo², M. G., Gonçalves, J. M., Avelar, G. S., Costa, L. M. S., Valentim, J. K., & Garcia, R. G. (2020). Replacement of performance enhancers by propolis ethanol extract in broiler diets. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 43(1807–8672), 1–10.
- Wang Xiao-cui, Wang Xiao-hong, Wang Jing, Wang Hao, Zhang, Hai-jun, Wu Shu-geng, hai Qi Guang.(2022), Dietary tea polyphenol supplementation improved egg production performance, albumen quality, and magnum morphology of Hy-Line Brown hens during the late laying period.
- Wu YB, Ravindran V, Thomas DG, Birtles MJ, Hendriks WH. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Br Poult Sci* 2004; 45:76-84. Published by Oxford University Press on behalf of American Society of Animal Science.

Yegani, M., & Korver, D. R. (2008). Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. *Poultry Science*, 87(10), 2052–2063. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00091>

Zafarnejad, K., Afzali, N., & Rajabzadeh, M. (2017). Effect of bee glue on growth performance and immune response of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 2119, 1–6. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1174130>.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Los principales metabolitos identificados en los propóleos provenientes de La Mesa y de Anolaima fueron terpenos como lupeol, lupenona y lanosterol, además del ácido cafeico, ferúlico y benzoico .
- La inclusión de propóleo en dietas para gallina ponedora presentó efectos destacables en la concentración de 600mg EEP/kg de alimento sobre el peso corporal cuando las aves fueron desafiadas con la inclusión de un 3% de frijol soya crudo, sobre la resistencia a la ruptura de cáscara de huevo así como un efecto trófico sobre las vellosidades intestinales.
- El propóleo contrarrestó los efectos antinutricionales de la inclusión de frijol soya, expresado en la pérdida de peso.

5.2 Recomendaciones

- Se requiere ampliar el estudio de propóleos en las diferentes zonas del país, con el fin de conocer datos de compuestos y actividad biológica que permitan caracterizar y estandarizar los compuestos activos.
- Para futuros estudios sería mejor aumentar el tiempo de suplementación y de monitoreo con el fin de evidenciar los efectos a largo plazo por el consumo constante y prolongado del propóleo.
- Evaluar otras variables asociadas a integridad intestinal desde la perspectiva molecular que permitan destacar mayores efectos del propóleo.

Anexo. 1 Determinacion del perfil por cromatografia de gases

	LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05
		Página 1 de 8

DETERMINACIÓN DEL PERFIL VOLÁTIL EN MATRICES LÍQUIDAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS OPERADA EN EL MODO DE *FULL SCAN* (GC/MS)

1. DATOS GENERALES

ENTIDAD SOLICITANTE: COMPAÑÍA CAMPO COLOMBIA S.A.S (AV 68 #1 A 55 TORRE 4 APTO 1403 Etapa 1, Bogotá, Cundinamarca)

CÓDIGO DE LA(S) MUESTRA(S): Véanse Tablas 1-2

DESCRIPCIÓN DE LA(S) MUESTRA(S): Véanse Tablas 1-2

FECHA DE RECIBO DE LA(S) MUESTRA(S): 2021-08-12

ANÁLISIS SOLICITADO: Determinación de la fracción volátil en líquidos por GC-MS

FECHA DE REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 2021-09-17

FECHA DE ELABORACIÓN DEL INFORME: 2021-11-03

OBSERVACIONES O DESVIACIONES (SI APLICA):

Ítem	Observación
Embalaje en buen estado (sin fisuras, perforaciones, tapas quebradas, ni suciedad)	Ninguna
Embalaje adecuado (cava de icopor)	Ninguna
Preservación adecuada de las muestras (pilas refrigerantes)	Ninguna
Frasco de vidrio ámbar o transparente (forrados con papel aluminio)	Ninguna
Estado del almacenamiento de las muestras (frascos sin quiebre, sin derrames)	Ninguna
Cantidad de muestra (mínimo aproximado 100 mL)	Ninguna

	LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05 Página 2 de 8

3. RESULTADOS

La identificación presuntiva de los compuestos registrados en las muestras se basó en sus espectros de masas (EI, 70 eV), se usaron las bases de datos de Adams, Wiley y NIST.

En las **Tablas 1-2**, aparecen la identificación presuntiva, los tiempos de retención (t_R) y la cantidad relativa (%) de los componentes presentes en las muestras, enviadas por el cliente **COMPAÑÍA CAMPO COLOMBIA S.A.S**, y analizados por GC/MS, operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*).

En el **Anexo 1**, se adjuntan las corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatograma) de las muestras abalizadas por GC/MS, operado en el modo *full scan*.

	LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05 Página 3 de 8

Tabla 1. Identificación presuntiva, tiempos de retención (t_R) y cantidad relativa (%) de los componentes presentes en las muestras enviadas por la empresa **COMPAÑÍA CAMPO COLOMBIA S.A.S** y analizadas por GC/MS (*full scan*).

t_R min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
		991952-01-AX MUESTRA A: EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO
7,8	C ₆ H ₁₄ O ₂	0,3
8,1	1,1-Dietoxietano	7,8
15,1	C ₉ H ₁₆	0,6
15,6	C ₆ H ₁₄ O ₃	0,2
16,1	α -Pino	0,3
18,0	Derivado de siloxanos	0,2
21,6	Malonato de dietilo	0,4
21,8	Acetofenona	1,0
25,9	Benzoato de etilo	1,3
26,8	Ácido benzoico	4,9
27,7	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0,6
36,2	Cadina-3,5-dieno	0,2
36,8	<i>cis</i> -Muurolo-4(15),5-dieno	0,3
37,2	<i>ar</i> -Curcumeno	0,2
37,8	Epizonareno	0,2
38,5	δ -Cadineno	0,2
38,7	<i>trans</i> -Calameneno	0,8
39,1	C ₁₅ H ₂₀	0,2
39,3	α -Calacoreno	0,2
41,5	α -Colocaleno	0,2
41,6	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	0,4
42,6	α -Cadinol	0,4
43,5	<i>cis</i> -14- <i>nor</i> -Muurolo-5-en-4-ona	0,5

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS
 LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL
 LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

 	LABORATORIO DE CROMATOGRFIA Y ESPECTROMETRIA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05 Página 4 de 8

Tabla 1. Continuación.

t_R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
		991952-01-AX MUESTRA A: EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO
46,9	M ⁺ 262 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 262 (55%), 247 (46%), 191 (54%), 179 (38%), 123 (51%), 109 (58%), 95 (41%), 69 (100%), 41 (70%)	0,2
47,1	Cafeína	0,2
49,4	Ácido palmítico	0,5
50,1	Palmitato de etilo	2,7
53,3	Linoleato de etilo	1,8
53,5	Oleato de etilo	4,9
59,4	Derivado de siloxanos	1,2
61,9	M ⁺ 366 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 366 (31%), 351 (10%), 333 (4%), 243 (8%), 224 (17%), 147 (32%), 105 (100%), 69 (30%)	1,7
63,6	M ₁ ⁺ 366 (N.I.) + M ₂ ⁺ 396 (N.I.)	1,2
63,8	M ⁺ 362 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 362 (28%), 347 (100%), 319 (4%), 269 (7%), 251 (2%), 127 (8%), 105 (12%), 77 (9%)	1,8
65,1	Tetracosanoate de etilo	0,9
65,6	M ⁺ 398 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 398 (98%), 383 (43%), 327 (31%), 275 (33%), 259 (41%), 219 (100%), 175 (31%), 105 (17%), 69 (31%)	1,0
66,1	M ⁺ 364 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 364 (46%), 349 (100%), 321 (6%), 309 (9%), 293 (79%), 215 (22%), 105 (20%), 77 (13%)	8,4
66,9	M ⁺ 366 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 366 (65%), 351 (8%), 311 (96%), 295 (91%), 255 (100%), 217 (14%), 177 (68%), 105 (41%), 77 (26%)	1,0
67,8	M ⁺ 366 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 366 (49%), 351 (9%), 311 (25%), 295 (100%), 267 (25%), 255 (31%), 217 (18%), 177 (22%), 105 (24%), 77 (17%)	24,7
70,7	M ⁺ 432 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 432 (51%), 417 (100%), 363 (7%), 309 (65%), 293 (56%), 215 (13%), 105 (32%), 77 (13%)	1,7
73,7	Derivado de siloxanos	5,1

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS
 LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL
 LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

 	LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05 Página 5 de 8

Tabla 1. Continuación.

t_R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
		991952-01-AX
		MUESTRA A: EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO
74,9	M ⁺ 434 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 434 (95%), 419 (27%), 379 (18%), 310 (35%), 295 (100%), 255 (51%), 105 (98%), 77 (23%)	2,8
75,3	Lanosterol	5,0
82,3	N.I., <i>m/z</i> (I%): 474 (17%), 459 (3%), 431 (8%), 376 (55%), 348 (6%), 309 (7%), 105 (100%), 69 (19%)	2,3
82,7	Acetato de α -aminerilo	2,7
83,5	N.I., <i>m/z</i> (I%): 474 (4%), 459 (5%), 441 (19%), 376 (23%), 280 (6%), 255 (7%), 105 (100%), 69 (15%)	3,0
83,8	N.I., <i>m/z</i> (I%): 474 (22%), 458 (14%), 431 (8%), 376 (62%), 360 (12%), 269 (9%), 105 (100%), 69 (17%)	3,8

N.I. → No identificado

Tabla 2. Identificación presuntiva, tiempos de retención (t_R) y cantidad relativa (%) de los componentes presentes en las muestras enviadas por la empresa **COMPAÑÍA CAMPO COLOMBIA S.A.S** y analizadas por GC/MS (*full scan*).

t_R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
		991952-02-BO
		MUESTRA B: EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO
8,2	1,1-Dietoxietano	1,2
8,7	Propilenglicol	1,9
10,1	2-Oxopropanoato de etilo	0,2
10,7	1,1-Dimetoxi-2-propanona	0,4
15,2	C ₉ H ₁₆	0,6
25,9	Benzoato de etilo	0,4

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS
 LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL
 LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

 	LABORATORIO DE CROMATOGRFIA Y ESPECTROMETRIA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05 Página 6 de 8

Tabla 2. Continuación.

$t_{R,}$ min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
		991952-02-BO MUESTRA B: EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO
26,0	Ácido benzoico	0,4
34,6	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	0,6
35,3	C ₉ H ₁₆ O ₂	2,7
35,3	N.I., m/z (I%): 156 (18%), 138 (14%), 128 (39%), 111 (41%), 97 (100%), 83 (90%), 70 (61%), 55 (96%), 43 (92%)	1,0
35,8	2-(4'-Etoxifenil)etanol	0,3
36,1	M ⁺ 212 (N.I.), m/z (I%): 212 (35%), 197 (16%), 184 (100%), 170 (45%), 155 (67%), 139 (18%), 129 (18%), 103 (74%), 91 (21%), 75 (64%)	0,2
38,2	N.I., m/z (I%): 142 (9%), 115 (48%), 102 (100%), 97 (99%), 83 (51%), 73 (39%), 55 (63%), 43 (29%)	0,3
39,2	Tiglato de dihidrocitronelilo	0,4
49,4	Ácido palmítico	0,9
53,4	Oleato de etilo	0,9
59,4	Derivado de siloxanos	1,7
61,3	Ftalato de bis(2-etilhexilo)	1,4
61,7	6-Pentadecil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona	1,1
61,9	M ⁺ 366 (N.I.), m/z (I%): 366 (29%), 351 (10%), 333 (4%), 243 (8%), 224 (17%), 147 (32%), 105 (100%), 69 (29%)	2,9
63,6	M ₁ ⁺ 366 (N.I.) + M ₂ ⁺ 396 (N.I.)	1,5

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS
 LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL
 LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

 	LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05 Página 7 de 8

Tabla 2. Continuación.

t_{R} , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
		991952-02-BO MUESTRA B: EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO
64,9	Tetracosanoate de etilo	0,8
65,6	M ⁺ 398 (N.I.), <i>m/z</i> (I%): 398 (97%), 383 (42%), 327 (30%), 275 (32%), 259 (41%), 219 (100%), 175 (32%), 105 (11%), 69 (29%)	1,3
73,7	Derivado de siloxanos	9,8
75,2	Derivado de siloxanos	4,6
77,8	α -Amirona	5,0
78,4	Lupenona	5,1
79,6	Lupeol	14,4
80,8	Acetato de β -aminerilo	5,4
82,3	N.I., <i>m/z</i> (I%): 474 (16%), 459 (4%), 431 (8%), 376 (48%), 348 (7%), 309 (6%), 105 (100%), 69 (19%)	3,7
82,7	Acetato de α -aminerilo	12,3
83,4	N.I., <i>m/z</i> (I%): 474 (3%), 459 (6%), 441 (22%), 376 (23%), 280 (6%), 255 (7%), 105 (100%), 69 (15%)	10,1
83,8	N.I., <i>m/z</i> (I%): 474 (26%), 458 (16%), 431 (9%), 376 (58%), 360 (12%), 269 (9%), 105 (100%), 69 (17%)	6,5

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS
 LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL
 LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

 	LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: CM-FSE-12
	INFORME DE RESULTADOS Código:991952-AX	VERSIÓN: 05 Página 8 de 8

ANEXO 1 de 1 (5 páginas del **Anexo 1**)

Cromatogramas registrados por GC/MS en modo *full scan* de las muestras.

	Nombre	Profesión	Cargo
<i>Elaboró</i>	William SALGAR RANGEL	Químico M.Sc.	Subdirector Técnico
<i>Revisó</i>	Jessica V. ARDILA ANTOLINES	Química	Subdirectora de Aseguramiento de Calidad
<i>Autorizó</i>	Elena E. STASHENKO	Química Ph.D.	Directora General Laboratorio CROM-MASS

Informe firmado digitalmente.

Firmado digitalmente por WILLIAM SALGAR RANGEL
Fecha 2021/11/05 15:25:20 COT

**WILLIAM
SALGAR
RANGEL**

Firmado digitalmente por JESSICA VIVIANA ARDILA ANTOLINES
Fecha 2021/11/05 15:27:14 COT

**JESSICA
VIVIANA
ARDILA
ANTOLINES**

Firmado digitalmente por ELENA STASHENKO
Fecha 2021/11/06 22:52:34 COT

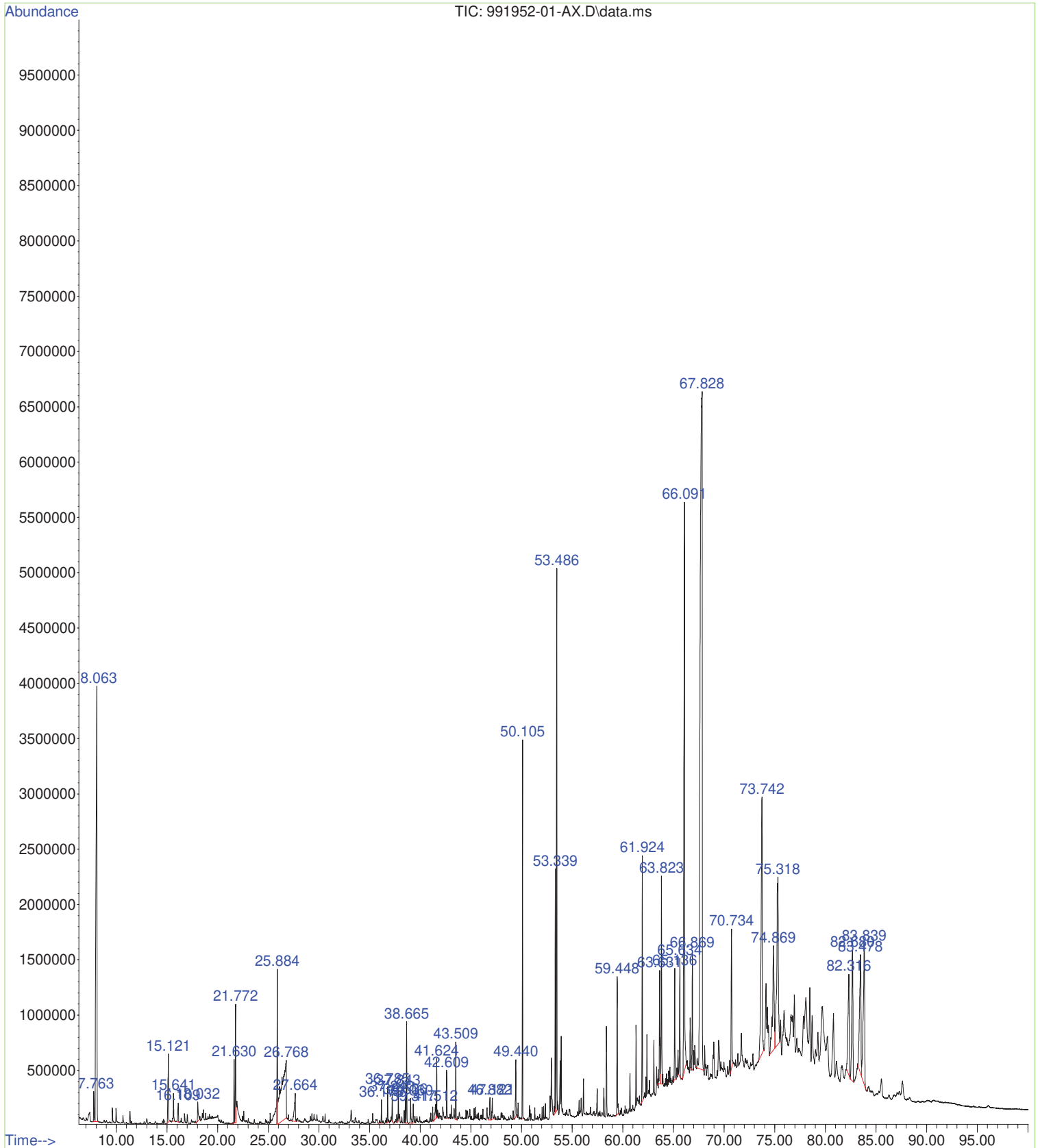
**ELENA
STASHENKO**

----- Fin del informe de resultados -----

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS
LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL
LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Carrera 27 – Calle 9, Ciudad Universitaria, Edificio 45, Bloque A Entrada 2A, Piso 2. Teléfono: +7 634 4000 Ext. 1140.
Línea directa: +7 645 6737. Fax +7 6358210. Celular (315) 879 3865. Bucaramanga, Colombia.
e-mail: elena@tucan.uis.edu.co, rene@tucan.uis.edu.co

File :E:\OPS_Crom-Mass_2020-21\13 Decimotercera entrega\991952 FE
... 2021-09-22\210923KG\991952-01-AX.D
Operator : Elena Stashenko-UIS
Instrument : GC - 05
Acquired : 23 Sep 2021 23:50 using AcqMethod AESPLITLESSSFE.M
Sample Name: 991952-01-AX
Misc Info :



Data Path : E:\OPS_Crom-Mass_2020-21\13 Decimotercera entrega\991952 FE 2021-09-22\210923KG\
 Data File : 991952-01-AX.D
 Acq On : 23 Sep 2021 23:50
 Operator : Elena Stashenko-UIS
 Sample : 991952-01-AX
 Misc :
 ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\methods\AESPLITLESSFE_991952-01-AX.M
 Title :

Signal : TIC: 991952-01-AX.D\data.ms

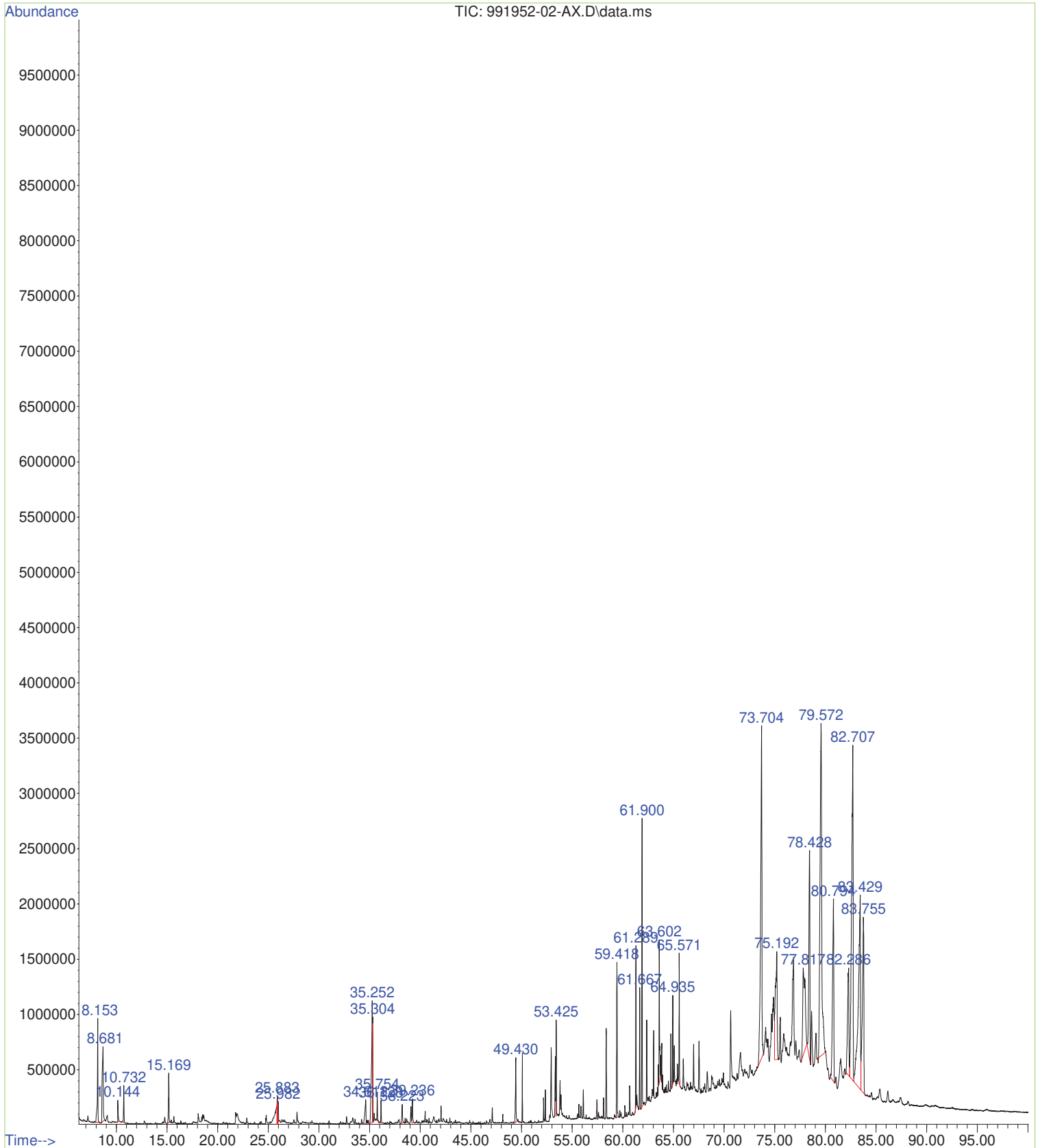
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	7.763	517	553	600	BV 2	272509	8894987	1.03%	0.256%
2	8.063	600	665	724	VB 2	3944642	271211854	31.55%	7.806%
3	15.121	3239	3302	3348	BB 2	613804	21514975	2.50%	0.619%
4	15.641	3432	3497	3542	BB 3	248975	7732082	0.90%	0.223%
5	16.109	3602	3672	3704	BB 4	169365	9293948	1.08%	0.267%
6	18.032	4328	4391	4458	BV	172002	8421345	0.98%	0.242%
7	21.630	5653	5735	5759	BV	575409	14052984	1.63%	0.404%
8	21.772	5761	5789	5810	M	1075586	34369951	4.00%	0.989%
9	25.884	7306	7325	7344	M2	1404226	44556301	5.18%	1.282%
10	26.768	7347	7656	7665	M2	520375	170897944	19.88%	4.919%
11	27.664	7797	7991	8041	BB	253774	20605254	2.40%	0.593%
12	36.173	10458	10538	10557	BB	211144	7058503	0.82%	0.203%
13	36.785	10686	10704	10719	BV	324230	8875592	1.03%	0.255%
14	37.240	10813	10827	10860	BB 2	245269	6717742	0.78%	0.193%
15	37.843	10974	10990	11003	PV 2	290558	7296131	0.85%	0.210%
16	38.536	11162	11178	11193	VV 2	235332	6043995	0.70%	0.174%
17	38.665	11193	11213	11247	PB	913202	27143655	3.16%	0.781%
18	39.060	11282	11320	11355	BB	224670	7413424	0.86%	0.213%
19	39.317	11355	11390	11419	BB 3	172193	5966754	0.69%	0.172%
20	41.512	11929	11985	12000	BV 3	130120	8046205	0.94%	0.232%
21	41.624	12000	12015	12031	VV 2	535103	13688699	1.59%	0.394%
22	42.609	12264	12282	12319	BB 2	430139	12314013	1.43%	0.354%
23	43.509	12506	12526	12559	VB 2	698482	18917606	2.20%	0.544%
24	46.882	13393	13441	13474	VB 2	200009	7255212	0.84%	0.209%
25	47.121	13474	13506	13539	BB 2	190756	7516311	0.87%	0.216%
26	49.440	14091	14134	14160	BB 2	517511	18715644	2.18%	0.539%
27	50.105	14289	14306	14325	BB	3416166	95536882	11.11%	2.750%
28	53.339	14893	14924	14933	BV	2201834	61653385	7.17%	1.774%
29	53.486	14933	14952	14960	VV 2	4898857	168654888	19.62%	4.854%
30	59.448	16065	16091	16114	BB	1212735	41878459	4.87%	1.205%
31	61.924	16535	16564	16587	BB	2233104	60134706	6.99%	1.731%
32	63.631	16854	16890	16913	BV 3	1016003	41477156	4.82%	1.194%
33	63.823	16913	16927	16945	VV	1864150	63642086	7.40%	1.832%
34	65.136	17151	17177	17201	BB 3	1006300	30579889	3.56%	0.880%
35	65.634	17250	17272	17296	BB 2	1066530	33553537	3.90%	0.966%
36	66.091	17320	17360	17394	BB 2	5141971	292567088	34.03%	8.420%
37	66.869	17480	17508	17526	BV 2	1063888	34193488	3.98%	0.984%
38	67.828	17582	17691	17719	BB 4	6116678	859708736	100.00%	24.743%

40	73.742	18756	18821	18853	BB	-	2312800	177350451	20.63%	5.104%
41	74.869	18960	19036	19066	BV	7	940848	98910493	11.51%	2.847%
42	75.318	19066	19122	19156	VV	3	1512012	173067953	20.13%	4.981%
43	82.316	20414	20459	20487	BB		906609	79363455	9.23%	2.284%
44	82.680	20492	20528	20552	BB	8	1164812	93734177	10.90%	2.698%
45	83.478	20627	20680	20699	BV	3	1056118	104495461	12.15%	3.007%
46	83.839	20699	20750	20784	VB	2	1272868	130975732	15.23%	3.770%

Sum of corrected areas: 3474565775

ESPLITLESS...1952-01-AX.M Thu Oct 28 14:05:48 2021

File :E:\OPS_Crom-Mass_2020-21\13 Decimotercera entrega\991952 FE
... 2021-09-22\210923KG\991952-02-AX.D
Operator : Elena Stashenko-UIS
Instrument : GC - 05
Acquired : 24 Sep 2021 2:37 using AcqMethod AESPLITLESSFE.M
Sample Name: 991952-02-AX
Misc Info :



Data Path : E:\OPS_Crom-Mass_2020-21\13 Decimotercera entrega\991952 FE 2021-09-22\210923KG\
 Data File : 991952-02-AX.D
 Acq On : 24 Sep 2021 2:37
 Operator : Elena Stashenko-UIS
 Sample : 991952-02-AX
 Misc :
 ALS Vial : 5 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\methods\AESPLITLESSFE_991952-01-AX.M
 Title :

Signal : TIC: 991952-02-AX.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	8.153	608	698	751	BB 2	942549	31951664	8.72%	1.248%
2	8.681	823	896	953	BB 2	662433	47832527	13.05%	1.869%
3	10.144	1410	1442	1496	BB 2	187228	5041583	1.38%	0.197%
4	10.732	1605	1662	1710	BB 2	330891	9926354	2.71%	0.388%
5	15.169	3255	3320	3367	BB 2	445192	14986781	4.09%	0.586%
6	25.883	7309	7325	7334	M2	259990	8996671	2.45%	0.352%
7	25.982	7334	7362	7376	M3	187401	10556749	2.88%	0.412%
8	34.612	10042	10114	10135	BV 3	212194	15088015	4.12%	0.590%
9	35.252	10203	10288	10296	BV	1101405	69873537	19.06%	2.730%
10	35.304	10296	10302	10326	VV 6	950369	25156073	6.86%	0.983%
11	35.754	10405	10424	10462	BB 2	258551	7710121	2.10%	0.301%
12	36.128	10491	10526	10556	BB 4	200489	5812810	1.59%	0.227%
13	38.223	11046	11093	11127	BB 7	165385	7683687	2.10%	0.300%
14	39.236	11345	11368	11403	VB 9	214392	9721568	2.65%	0.380%
15	49.430	14081	14132	14180	BB 3	583529	23316174	6.36%	0.911%
16	53.425	14932	14941	14965	VB	865240	21901131	5.98%	0.856%
17	59.418	16067	16085	16110	BB	1394026	44306616	12.09%	1.731%
18	61.289	16415	16443	16451	BV	1461821	36442136	9.94%	1.424%
19	61.667	16500	16515	16539	BB	1091380	28044829	7.65%	1.096%
20	61.900	16539	16559	16582	BB	2600279	72955973	19.90%	2.851%
21	63.602	16874	16884	16907	PV 2	1284780	39227221	10.70%	1.533%
22	64.935	17114	17139	17153	BV 2	807280	21729090	5.93%	0.849%
23	65.571	17238	17260	17284	BB	1178127	34368977	9.38%	1.343%
24	73.704	18741	18814	18847	BB	2992558	249605570	68.10%	9.753%
25	75.192	19055	19098	19130	VB 2	974302	118078606	32.21%	4.614%
26	77.817	19558	19599	19665	BB 2	787458	128211616	34.98%	5.010%
27	78.428	19669	19716	19736	BV 4	1864437	131584244	35.90%	5.141%
28	79.572	19864	19935	20016	BB 4	2991677	366544070	100.00%	14.322%
29	80.794	20106	20168	20190	BB	1650970	138611416	37.82%	5.416%
30	82.286	20388	20453	20473	BV 2	957934	94775548	25.86%	3.703%
31	82.707	20473	20533	20551	VV 6	3033945	314347095	85.76%	12.283%
32	83.429	20551	20671	20687	VV 2	1735595	259725094	70.86%	10.148%
33	83.755	20687	20734	20772	VB 2	1590057	165175041	45.06%	6.454%

Sum of corrected areas: 2559288586