



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**VALORACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS
DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca
angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS
TERAPÉUTICOS.**

Yurley Paola Monserrate Rojas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia
2015

**VALORACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS
DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca
angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS
TERAPÉUTICOS.**

Yurley Paola Monserrate Rojas

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Producción Animal

Directora:

M. Sc. Judith Figueroa Ramírez

Línea de Investigación:

Microbiología y Epidemiología

Grupo de Investigación:

AYNI, Grupo en Ciencia y Tecnología Apícola

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia

2015

A mi familia por ser mi apoyo e inspiración, en especial a mis padres, Jorge Monserrate y Teresa Rojas, mis hermanos Fredy, Rafael y Juana, mis Tíos Gustavo e Isabel y mis sobrinos Ana y Juan. A Judith Figueroa “teşekkür ederim”.

A “la cremme de la cremme”. (Jair, Lady, Cesar, Joel, Jaime, Paola, Juan, Diego, Dani), por todos los buenos momentos.

“...El Bogotá, después de haber recorrido, con paso lento y perezoso la espaciosa llanura de su nombre, vuelve de repente su curso... Aquí, dejando esa lentitud melancólica, acelera su paso, forma alas, murmullos, espumas,... Corrientes impetuosas, golpes contra las rocas, saltos, mido majestuoso, suceden al silencio y a la tranquilidad. En la orilla del precipicio todo el Bogotá se lanza en masa sobre un banco de piedra; aquí se estrella, allí da golpes horribles, aquí forma hervores, borbollones, y se arroja, en forma de plumas divergentes, más blancas que la nieve, en el abismo que lo espera... Estas plumas vistosas que forman las aguas en el aire, se convierten de repente en lluvias y en columnas de nubes que se levantan a los cielos. Parece que el Bogotá acostumbrado a recorrer las regiones elevadas de los Andes, ha descendido, a pesar suyo, a esta profundidad, y quiere orgulloso elevarse otra vez en forma de vapores...”

Francisco José de Caldas

Fragmento en memoria de Teresa Vásquez, mi abuela, quien hizo tuyas las palabras de Caldas; las hizo nuestras.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, en especial al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Al grupo de Investigación AYNI Ciencia y Tecnología Apícola, en especial a Viviana Gamboa, Carla Portillo, Divian Hernández, Andrés Sánchez, Cesar Talero y Víctor Tibatá, por su confianza en mi trabajo y sus valiosos aportes al desarrollo de esta tesis.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA de la Universidad nacional sede Medellín, en especial al Doctor Jesús Gil, por su colaboración y asesoría.

A la Doctora Magda Elvira Alvarado Mora, por su asesoría y apoyo en las pruebas antiparasitarias.

A la asociación de apicultores Asoapiboy y a los apicultores de Cundinamarca, en especial, a David Guzmán, Amadeo Fuentes y Julián Pinzón.

A Fredy Monserrate y Lady Garzón por su invaluable apoyo y colaboración.

Resumen

Productos de la colmena como la miel y el polen han mostrado tener efectos terapéuticos. Con el objetivo de establecer la base para posibles usos terapéuticos de extractos etanólicos producidos a partir del polen (EEPo) colectado por abejas. Bajo condiciones *in vitro*, se evaluaron la capacidad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y el efecto sobre el bacteriófago PhiX174 de EEPo provenientes de *Apis mellifera* del altiplano Cundiboyacense y de polen de pote de *Tetragonisca angustula* de Antioquia. La capacidad antibacteriana y antifúngica fue evaluada por medio del método de CMI con concentraciones seriadas desde 32 a 1 mg/ml de sólidos solubles totales (SST) contra las bacterias *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 31617), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 6538) y *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) y contra el hongo *Candida albicans* (ATCC 10231). La capacidad antiparasitaria fue determinada ajustando un modelo *in vitro* con concentraciones de 4 y 8 mg/ml de SST de los EEPo sobre los trofozoítos del parásito intestinal *Giardia duodenalis* cepa ATCC- 50803 WBC6. Por su parte, El efecto de los extractos a 4 y 8 mg/ml de SST sobre Phi X174 (ATCC 13706-B1) se midió usando una técnica de plaqueo sobre la célula huésped *Escherichia coli* (ATCC 700078). Finalmente, para algunas muestras de extractos etanólicos se determinaron los fenoles totales y la actividad antioxidante por TEAC-DPPH y se correlacionaron con su actividad antimicrobiana. Los resultados mostraron especialmente actividad antibacteriana con CMI que estuvieron entre 32 y 16 mg/ml de SST de acuerdo al tipo de bacteria y con una mayor acción de los EEPo provenientes de Cundinamarca. En el caso de la actividad antifúngica, el efecto fue menor y solamente algunos EEPo presentaron actividad en 32 mg/ml. Por otra parte, la actividad antiparasitaria sobre *Giardia duodenalis*, exhibió efectos similares en ambas concentraciones evaluadas sobre los trofozoítos viables, aunque se presentó una tendencia hacia mayor acción de los EEPo provenientes de polen apícola de Boyacá. Finalmente, la actividad sobre el bacteriófago Phi X174, mostró valores promedio de inhibición sobre las partículas fágicas de $32\% \pm 19.1\%$ para 4 mg/ml y $39.6\% \pm 24.1\%$ para 8 mg/ml de SST evaluados y una mayor acción de los EEPo

provenientes de Cundinamarca. Los resultados obtenidos en este estudio muestran la variabilidad de la actividad biológica de los extractos etanólicos de polen, a través de los patógenos evaluados y con relación a los SST y al origen de los EEPo. Estos resultados aportan al conocimiento del polen apícola y de pote como productos con valor agregado.

Palabras clave: Capacidad antibacteriana, Capacidad Antifúngica, Capacidad antiparasitaria, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Abstract

Bee products such as honey and pollen have been shown to have therapeutic effects. In order to establish the basis for potential therapeutic uses of ethanolic pollen extracts (in Spanish EEPo) produced from pollen collected by bees. Under *in vitro* conditions, the antibacterial, antifungal and antiparasitic capacity and the effect on the bacteriophage PhiX174 of EEPo from *Apis mellifera* from the Cundiboyacense region and pot pollen of *Tetragonisca angustula* from Antioquia department was evaluated. Additionally, the antiparasitic capacity of EEPo from bee pollen was evaluated. The antibacterial and antifungal capacity was evaluated by the method of CMI with serial concentrations from 32 to 1 mg / ml of total soluble solids (in Spanish SST) against *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 31617), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 6538) and *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) and against the fungi *Candida albicans* (ATCC 10231). The antiparasitic capacity was determined by adjusting an *in vitro* model with concentrations of 4 and 8 mg / ml of SST of the EEPo on the trophozoites of the intestinal parasite *Giardia* strain ATCC-50803 WBC6. Meanwhile, the effect of the extracts at 4 and 8 mg / ml of SST on Phi X174 (ATCC 13706-B1) was measured using a plating technique on the host cell *Escherichia coli* (ATCC 700078). Finally, for some samples of the ethanolic extracts, total concentrations of phenols and the antioxidant activity by TEAC-DPPH were determined and correlated with their antimicrobial activity. The results showed mainly antibacterial activity with CMIs between 32 and 16 mg / ml of SST varying according to the type of bacteria and with a greater effect of the EEPo from Cundinamarca. In the case of antifungal activity, the effect was lower and only for some EEPo reported activity in 32 mg / ml. regarding the antiparasitic activity on *Giardia duodenalis*, the action on the viable

trophozoites was similar at both concentrations evaluated; although a greater action of bee pollen from EEPo Boyacá was observed. Finally, the activity on the bacteriophage Phi X174 showed average inhibition values on the phage particles equal to $32\% \pm 19.1\%$ for 4 mg/ml and $39.6\% \pm 24.1\%$ for 8 mg/ml of the evaluated SST. A higher action of EEPo from Cundinamarca was seen. The results of this study show the variability of the biological activity of the pollen ethanolic extracts on the pathogens evaluated in relation to the SST and the origin of the EEPo. These results contribute to the knowledge of bee pollen and pot pollen as products with added value.

Keywords: Antibacterial capacity, antifungal capacity, antiparasitic capacity, Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVI
Introducción	1
Referencias Bibliográficas.....	3
Objetivos.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos	4
1. Actividad biológica de polen colectado por abejas (Revisión).....	5
1.1 Introducción	5
1.2 Polen apícola.....	6
1.3 Polen de pote	6
1.4 Fuentes botánicas visitadas por abejas	7
1.5 Composición química del polen	9
1.6 Actividad Biológica.....	14
1.7 Antimicrobianos	14
1.8 Usos del polen.....	16
1.9 Mecanismos de acción biológica del polen.	18
1.10 Conclusión:.....	18
1.11 Referencias bibliográficas.....	19
2. Efectos antibacterianos y antifúngicos de extractos etanólicos de polen apícola de la región Cundiboyacense y polen de pote de la región antioqueña colombiana. 23	
2.1 Resumen	23
2.2 Introducción.....	24
2.3 Materiales y métodos.....	26
2.3.1 Muestras de polen.....	26
2.3.2 Preparación de los extractos etanólicos de polen (EePo)	26
2.3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.	27
2.3.4 Fenoles totales y actividad antioxidante (TEAC-DPPH*)	28
2.3.5 Análisis de datos	29

2.4	Resultados	29
2.4.1	Análisis de inhibición.....	29
2.4.2	Análisis de la capacidad mínima inhibitoria.....	32
2.4.3	Fenoles totales y actividad antioxidante por TEAC-DPPH.	35
2.5	Discusión.....	38
2.6	Conclusiones.....	41
2.7	Referencias bibliográficas	41
3.	Estimación de la acción de extractos etanólicos de polenes de <i>Apis mellifera</i> y <i>Tetragonisca angustula</i> sobre phi x174 y <i>Giardia duodenalis</i>.....	45
3.1	Resumen.....	45
3.2	Introducción.....	46
3.3	Materiales y métodos	48
3.3.1	Muestras de polen.	48
3.3.2	Preparación de los extractos etanólicos de polen (EEPo).....	48
3.3.3	Actividad sobre Phi X174.....	49
3.3.4	Actividad antiparasitaria.....	50
3.3.5	Análisis estadístico	51
3.4	Resultados	51
3.4.1	Actividad sobre Phi X174.....	51
3.5	Actividad antiparasitaria	53
3.6	Discusión.....	55
3.7	Conclusiones.....	57
3.8	Referencias bibliográficas	57
4.	Discusión, conclusiones y recomendaciones	64
4.1	Discusión.....	64
4.2	Conclusiones.....	65
4.3	Recomendaciones.....	65

Lista de figuras

	Pág.
figura 2-1 Porcentaje de inhibición y no inhibición de 54 EEPo. SA (+): <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach, ATCC 6538. KR (+): <i>Kocuria rhizophila</i> , ATCC 9341. SE (-): <i>Salmonella enterica</i> sp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , ATCC 14028. EC (-): <i>Escherichia coli</i> , ATCC 31617. CA: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. (+): Gram positivo. (-) Gram negativo.....	30
Figura 2-2 - Porcentaje de inhibición de los EEPo de acuerdo al departamento de origen (A) y a la especie de abeja (B)	31
Figura 2-3 - Porcentaje de inhibición de acuerdo al departamento y al estado del polen. BH: Boyacá Húmedo. BS: Boyacá Seco. CH: Cundinamarca Húmedo. CS:Cundinamarca Seco.....	31
Figura 2-4 - Capacidad Mínima Inhibitoria para 4 bacterias (%). SA: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach, ATCC 6538. KR: <i>Kocuria rhizophila</i> , ATCC 9341. SE: <i>Salmonella enterica</i> sp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , ATCC 14028. EC: <i>Escherichia coli</i> , ATCC 31617.	33
Figura 2-5 - Capacidad Mínima Inhibitoria de EEPo de las dos especies de abejas, sobre las bacterias en estudio. %: Porcentaje de inhibición. Eje X: mg/ml de sólidos solubles totales. SA: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach, ATCC 6538. KR: <i>Kocuria rhizophila</i> , ATCC 9341. SE: <i>Salmonella enterica</i> sp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , ATCC 14028. EC: <i>Escherichia coli</i> , ATCC 31617.	35
Figura 3-1 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPo por Tipo de EEPo.....	52
Figura 3-2 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPo por Departamento.....	53
Figura 3-3 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPo por Especie de abeja.	53
Figura 3-4 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPo por Origen. .	53
Figura 3-5. Comportamiento de los Trofozoítos muertos por Tipo de EEPo.	54
Figura 3-6 Comportamiento de los Trofozoítos muertos por Departamento de procedencia de los EEPo.	54
Figura 3-7 Comportamiento de los Trofozoítos muertos por Origen de los EEPo.	55

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1 Análisis químico del polen apícola de Colombia y algunas especificaciones regulatorias internacionales.	10
Tabla 1.2. Contenido de minerales en el polen apícola colombiano (mg/kg) (Base seca)	11
Tabla 1.3 Principales ácidos grasos encontrados en el polen apícola colombiano (mg/100 mg lípidos) (base seca).....	11
Tabla 1.4 Comparación de la composición nutricional de polen apícola.....	12
Tabla 1.5 Compuestos bioactivos, fenoles y flavonoides totales del polen apícola de Viracachá (Boyacá).....	13
Tabla 1.6 Usos del polen de pote en Colombia.....	17
Tabla 1 - Capacidad Mínima Inhibitoria para 4 bacterias (Número de Inhibiciones y % de Inhibición)	33
Tabla 2 - Capacidad mínima inhibitoria para cuatro patógenos de acuerdo a los EEPO de dos tipos de abeja.....	34

Introducción

En el país, la producción zotécnica con abejas se ha enfocado en el uso de la especie introducida *Apis mellifera*, Sin embargo, la biodiversidad de abejas nativas de Colombia se estiman en aproximadamente 1000 especies, agrupadas en 90 géneros de los cuales Melipona y Tetragonisca son los más promisorios desde el punto de vista productivo (Guiomar Nates-Parra, 2009).

La actividad apícola se visibilizó para el país mediante el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el cual permitió la creación, legalización y consolidación de la CADENA PRODUCTIVA DE LAS ABEJAS Y LA APICULTURA (CPAA) dentro de un marco de legalidad (Ley 811 de 2003, Decreto 3800 de 2006 y Resolución 000186 de Junio de 2008).

Los productos generados por esta cadena son diversos, en importancia comercial se encuentran la miel, el polen y los propóleos; todos ellos productos de recolección y transformación por parte de las abejas, adicionalmente se generan otros productos a menor escala como cera, jalea real y apitoxina entre otros.

Para polen apícola no hay datos estadísticos en Colombia que muestren los volúmenes de producción, sin embargo, a partir de 2004 se iniciaron exportaciones que fueron en aumento hasta alcanzar 3 toneladas en el 2007. Este polen se genera en un 90% en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca donde se producen cantidades importantes todo el año, esta región debido a su posición geográfica andino tropical, presenta un enorme potencial para la obtención del producto, donde se han reportado producciones de 36 kilos de polen fresco colmena/año (Martinez, 2006; Sánchez Alarcón, 2014), esta producción en el contexto mundial es considerada como alta, teniendo en cuenta que países exportadores de miel como Argentina cuentan con niveles de entre 9 y 10 Kg/colmena/año (Coronel et al., 2004).

El aprovechamiento ancestral y en la actualidad la cría de abejas nativas, son conocidos principalmente por la obtención de miel y uso terapéutico (Cepeda Granados & Nates-Parra, 2009).

En *Apis mellifera*, productos como la miel y los propóleos, han sido ampliamente estudiados, por sus propiedades medicinales y su composición; no ocurre lo mismo en el caso del polen; esta misma tendencia se muestra en el país, donde solo en forma reciente se cuenta con estudios sobre la composición del polen para algunas regiones (Fuenmayor B et al., 2014); son aún más escasos los estudios en cuanto a la caracterización del polen de abejas nativas.

Al polen se le atribuyen usos medicinales como su empleo para el control de la prostatitis crónica, el tratamiento de úlceras gástricas y alergias; estudios formales han evidenciado la existencia de estas propiedades en el polen y su acción en humanos, al ser suministrado tanto en la forma completa como en extractos obtenidos por diferentes métodos (Basim, Basim, & Özcan, 2006; Linskens & Jorde, 1997; Mitobe, Yokomoto, & Ohashi-Doi, 2015)

El presente estudio buscó valorar las propiedades antibacterianas, antifúngica, antiparasitaria y el efecto sobre bacteriófagos, de los extractos etanólicos del polen, como instrumento diferenciador que permita generar un valor agregado para el polen apícola Colombiano y en el caso de abejas nativas aportar en el conocimiento de posibles aplicaciones de este producto.

Referencias Bibliográficas

- Basim, E., Basim, H., & Özcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77, 992–996. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027
- Cepeda Granados, M., & Nates-Parra, G. (2009). *Comercialización de los productos de la Meliponicultura en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia - Bogotá.
- Coronel, B. B., Grasso, D., Pereira, S. C., Fern, G., Del, G., Ap, P., & Argentino, C. (2004). Caracterización bromatológica del polen apícola argentino. *Ciencia, Docencia Y Tecnología*, XV, 145–181.
- Fuenmayor B, C., Zuluaga D, C. ., Díaz M, C., Quicazán de C, M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del polen apícola colombiano. *Revista MVZ Cordoba*, 19(1), 4003–4014.
- Guiomar Nates-Parra. (2009). Foro Abejas silvestres y polinización. *Manejo Integrado de Plagas Y Agroecología (Costa Rica)*, N o . 7 5(Roubik 1995), 7–20.
- Linskens, H. E., & Jorde, W. (1997). Pollen as Food and Medicine - A Review. *Economic Botany*, 51(March 1995), 78–86.
- Martinez. (2006). Diagnostico de la Actividad Apicola y de la Crianza de Abejas en Colombia. *Instituto Interamericano de Cooperacion Para La Agricultura IICA*.
- Mitobe, Y., Yokomoto, Y., & Ohashi-Doi, K. (2015). Safety evaluation of standardized allergen extract of Japanese cedar pollen for sublingual immunotherapy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(3), 529–540. doi:10.1016/j.yrtph.2015.02.009
- Sánchez Alarcón, O. A. (2014). Sistemas de Producción y Economía Apícola en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Caso de Tres Organizaciones de Productores. *Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.*, 144.

Objetivos

Objetivo General

- Valorar la actividad antimicrobiana en extractos de polen de *Apis mellifera* y polen de pote de *Tetragonisca Angustula* producidos en Colombia.

Objetivos Específicos

- Obtener principios activos de polen de *Apis mellifera* y de *Tetragonisca angustula* mediante extractos conteniendo etanol al 70%.
- Cuantificar la presencia de fenoles y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de polen.
- Evaluar el potencial antimicrobiano de los extractos de polen obtenidos, mediante ensayos *in vitro*, sobre 2 bacterias Gram (+), 2 bacterias Gram (-), 1 *Cándida sp.*, Trofozoítos de *Giardia duodenalis* y el bacteriófago Lambda de *E. coli*.
- Establecer las correlaciones existentes entre los parámetros fisicoquímicos y bioactivos evaluados.

1. Actividad biológica de polen colectado por abejas (Revisión)

Introducción

En Colombia, la cría racional con abejas es una actividad zootécnica promisorias; las condiciones geobotánicas, la biodiversidad, y el creciente número de criadores, hacen de esta una actividad en constante desarrollo. Esta producción genera una amplia variedad de productos para la comercialización, entre ellos, productos de secreción como apitoxina, cera, jalea real (Vit, 2005b); de recolección y transformación como, polen, miel, propóleos (Vit, 2005a). La producción en el país se realiza con abejas *Apis mellifera* principalmente, sin embargo, resulta de importancia la comercialización de productos de la colmena, derivados de la cría de abejas nativas sin aguijón, principalmente, de “miel angelita”. Una de las abejas nativas más utilizadas por su adaptación a la cría racional, es *Tetragonisca angustula*, para esta especie el polen no es comercializado de forma habitual (G. Nates-Parra & González, 2000).

El polen es el elemento fecundante de las plantas. Los granos de polen están encerrados en los sacos polínicos de los estambres, de tamaño y forma variables, son transportados sobre otras flores, bien por el viento o por los insectos (Vit & Santiago, 2008). Las abejas aseguran la fecundación del 50 al 60% de las especies vegetales: árboles frutales, melones, alhelies, salvias, etc. (Jean-Prost & Yves, 2007).

El polen colectado por abejas o polen corbicular, es un producto generado a partir de la mezcla del polen producido por las plantas, el néctar de la flor y sustancias generadas en la saliva de las abejas recolectoras del mismo (Saavedra, Rojas, & Delgado, 2013). Este polen se utiliza como alimento para todas las etapas de desarrollo de las abejas de la colmena (Almeida-Muradian, 2005).

Polen apícola

Al ser colectado y transformado por las abejas *Apis mellifera*, se denomina polen apícola, el cual es transportado hacia sus colmenas y allí el hombre por medio de prácticas de manejo apícola, cosecha este polen previa disposición de trampas caza-polen para luego someterlo a un proceso de secado, limpieza y empaçado para su comercialización (Sancho & Mal-lozano, 1993; Vit & Santiago, 2008). La cosecha de este producto natural es un desarrollo relativamente reciente, depende principalmente del raspado de polen de las corbículas de las abejas al entrar en la colmena (Feas et al., 2012).

El polen apícola en Colombia se genera en un 90% en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca donde se producen cantidades importantes todo el año, esta región debido a su posición geográfica andino tropical, presenta un enorme potencial para la obtención del producto, donde se han reportado producciones de 36 kilos de polen fresco colmena/año (Martinez, 2006). Los volúmenes de producción netos del polen apícola para Colombia, son desconocidos, sin embargo, a partir de 2004 se iniciaron exportaciones que fueron en aumento hasta alcanzar 3 toneladas en el 2007, esta producción en el contexto mundial es considerada como alta, teniendo en cuenta que países exportadores como Argentina cuentan con niveles de entre 9 y 10 Kg/colmena/año (Coronel et al., 2004).

Gracias a las características ambientales propicias para la producción de polen en la región Cundiboyacense de Colombia, han surgido asociaciones de apicultores especializados en este producto, el polen apícola en Colombia se presenta como un producto potencial que requiere ser desarrollado (Sánchez Alarcón, 2014).

Polen de pote

En el país, existe gran diversidad de especies de abejas, además de *A. mellifera*, algunas de ellas son criadas para la obtención de sus productos; tal es el caso de las abejas de los géneros Melipona (*M. favosa*, *M.gr. fasciata*, *M. interrupta*, *M. compressipes*) y especialmente Trigona (*Tetragonisca angustula*)(G. Nates-Parra & González, 2000).

El polen de las abejas nativas, es obtenido de las colonias donde se encuentra almacenado para su maduración, en estructuras llamadas pote, este proceso hace que

los nutrientes estén más biodisponibles (Gilliam, Roubik, & Lorenz, 1990). En el país, el polen proveniente de las colmenas de estas abejas, aunque en menor proporción que la miel, se obtiene para usos tradicionales (Cepeda Granados & Nates-Parra, 2009).

La abeja *Tetragonisca angustula* llamada “angelita” o “virginita” es la especie de abeja sin aguijón más conocida y utilizada para la cría en Colombia, por su buena adaptación en colmenas racionales y su potencial como polinizador, debido a su alto número es también la abeja más promisoría para la producción de polen de pote. Recientemente se han estudiado las fuentes botánicas visitadas por *Tetragonisca angustula* en busca de polen, algunas de esas especies son: *Spananthe paniculata* (Arracachuela), *Erimocephala brachiata* (Tabaquillo), *Mikania micrantha* (Guaquito), *Piptocoma discolor* (Cenizo), *Steiractinia aspera* (Chispeador), *Venonanthura patens* (Indioviejo) entre otras, todas ellas fuentes polínicas que comparten *Tetragonisca angustula* y *Apis mellifera* (G. S. Nates-Parra, 2011).

La comercialización del polen de pote, sucede en algunas localidades del país, luego de ser secado y empacado, se vende como pan de abejas nativas. Se comercializa este producto por creencias populares, en las que se asegura que las abejas nativas le han conferido propiedades especiales, se dice que favorece la recuperación en casos de enfermedades de la próstata, también es utilizado como afrodisíaco y como suplemento alimenticio (Cepeda Granados & Nates-Parra, 2009).

Fuentes botánicas visitadas por abejas

Se han estudiado las fuentes botánicas de las que proviene el polen colectado por abejas, en busca de los orígenes polínicos del polen apícola y de pote; el cual, está relacionado con las características y actividad biológica de ellos. En Colombia la amplia gama de fuentes polínicas está dada por la gran diversidad de especies vegetales que se estima en alrededor de 24000 y que corresponde entre el 10 y el 20% del total de plantas en el mundo (Nates-Parra, 2011).

Para la sabana de Bogotá, fue analizado el efecto de distintos factores sobre las preferencias de *Apis mellifera* por los recursos; la investigadora Montoya (Montoya Pfeiffer, 2011) analizó palinológicamente 63 muestras de polen, de apiarios de la sabana de Bogotá y alrededores correspondientes a los municipios de Zipaquirá (1), Tabio (1),

Chía (1), Sopó (1), Bogotá (1), Sibaté (1), Chipaque (1) y Une (3), ubicados entre 2000 y 3000 m de altura, Las muestras fueron acetolizadas siguiendo la metodología de Fonnegra (Fonnegra, 1989) y se fijaron las muestras de polen en láminas para lectura en microscopio óptico. Fueron observadas las morfologías de las flores y de los granos de polen de las especies encontradas en las muestras, medidas la cantidad de polen en las flores y la cantidad de proteínas en el polen de seis especies de gran preferencia para las abejas, finalmente fueron realizados mapas de cobertura vegetal de los apiarios para evaluar la disponibilidad de recursos. La identificación de los tipos polínicos fue realizada mediante comparaciones con muestras de polen de plantas colectadas en las visitas a los apiarios y con ayuda de claves palinológicas y la palinoteca del Laboratorio de Investigaciones en Abejas de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (LABUN). Los investigadores encontraron que las abejas obtuvieron polen de 103 especies, dentro de las cuales *Brassica rapa*, *Hypochoeris radicata*, *Trifolium pratense*, *Eucalyptus globulus*, *Teline monspessulana*, *T. repens* y *Rubus* sp. fueron las más importantes. Las abejas obtuvieron la mayor cantidad de polen a partir de pocas especies en áreas de pastizales y cultivos, aunque visitaron un gran número de especies en ecosistemas naturales. No se encontró relación entre el contenido de proteínas en el polen y las preferencias de *A. mellifera* pero sí que prefieren especies de plantas exóticas que tienen periodos largos de floración.

Con el fin de estimar el potencial polinizador de algunas especies nativas sin aguijón en Colombia, Obregón (Obregón Coredor, 2011) realizó análisis palinológicos de muestras de miel y polen de nidos de *Melipona eburnea* y *Tetragonisca angustula* en el Municipio de Fusagasugá, Cundinamarca, para conocer las especies vegetales de las cuales dependen estas abejas. En total se procesaron 31 muestras de polen de potes, las cuales fueron acetolizadas con base en el método de Erdtman (Louveaux, B.J., Maurizio, A. & Vorwohl, 1970) y montadas en una lámina con dos campos, con base en estos resultados se hicieron análisis de preferencia floral y nicho trófico. Los tipos polínicos más frecuentes en muestras de *M. eburnea* fueron: *Eucalyptus globulus* (100%), Tipo *Myrcia* (95%), *Tibouchina longifolia* (47,6%) y *Adenaria floribunda* (42,8%) Para *T. angustula*: Tipo *Myrcia* (90%), *Eucalyptus globulus* (90%), *Heliocarpus americanus* (90%), y Tipo *Citrus* (90%). Se encontró que *Melipona eburnea* utiliza como recursos florales al menos 90 especies de plantas, 16 fueron encontradas en muestras de polen únicamente y 38 en muestras tanto de miel como de polen. Se concluye en este estudio

que gracias a la composición polínica de las muestras de polen, es posible la caracterización y clasificación de la miel y el polen de *M. ebúrnea*.

Como ya se había mencionado, la producción de polen apícola en Colombia, se centra en la región andina; por lo que Chamorro y colaboradores (Chamorro-García, León-Bonilla, & Nates-Parra, 2013), realizaron un estudio, en el que la apicultura se plantea como una alternativa de uso compatible con la conservación de sus bosques; se analizó la contribución de estos bosques en la producción de miel y en especial polen apícola. El área de estudio fue la vertiente occidental de la Cordillera Oriental de Colombia, en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Santander, entre los 2500 y 3500 m de altitud. Se analizaron 25 muestras de polen apícola, mediante la metodología de la acetólisis y se utilizó un microscopio óptico para la identificación y conteo a 400 y 1000 aumentos. La identificación se llevó a nivel específico cuando fue posible. Los autores reportan 63 tipos polínicos pertenecientes a 43 familias botánicas; destacando Asteraceae y Fabaceae con nueve y seis tipos polínicos respectivamente. De los 63 tipos polínicos se destacan por su alta frecuencia de aparición *H. radicata*, tipo *Brassicaceae* que incluye a *Brassica* y *Raphanus*, *T. pratense*, *E. globulus* y *Q. humboldtii*. A pesar de existir una alta dominancia de plantas exóticas en las muestras analizadas, los autores proponen que el polen apícola en la zona estudiada puede ser promovido como producto no maderable y por tanto una alternativa de uso compatible, ya que el polen de esta región además tiene presencia destacable de elementos florísticos nativos como, *Q. humboldtii*, *Morella spp.*, *V. stipularis*, *Viburnum spp.* y *W. tomentosa*.

Composición química del polen

El polen apícola es consumido como alimento especial por su origen vegetal y la alta presencia de aminoácidos esenciales, pero también debido a que posee diferentes efectos en la salud, por ello es muy usado en apiterapia (Bogdanov, 2004).

La composición nutricional del polen apícola en Colombia ha sido reportada por algunos autores, según metodologías oficiales AOAC.

Para Colombia durante los años 2008 y 2011 se recolectaron 196 muestras de polen de abejas *Apis mellifera*, de la región Cundiboyacense, esas muestras fueron analizadas desde el punto de vista nutricional y funcional. Las características evaluadas cumplirían

con la normativa internacional para polenes a excepción del contenido de humedad, ya que resulta necesario mejorar las condiciones de secado para obtener un mejor producto (Fuenmayor B et al., 2014). Se presentan a continuación los resultados obtenidos en el estudio en contraste con algunas normativas establecidas en el ámbito internacional, Tabla 1.1, Tabla 1.1Tabla 1.2, y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

Tabla 1.1 Análisis químico del polen apícola de Colombia y algunas especificaciones regulatorias internacionales.

	<i>Resultados altiplano Cundiboyacense Colombiano (Fuenmayor B et al., 2014)</i>			<i>Especificaciones Regulatorias</i>		
	<i>Media ± DE</i>	<i>Mín.</i>	<i>Máx.</i>	<i>Argentina</i>	<i>Brasil</i>	<i>México</i>
<i>pH</i>	<i>4.6 ± 0.4</i>	<i>3.8</i>	<i>5.4</i>	<i>Mín. 4 Máx. 6</i>	<i>Mín. 4 Máx. 6</i>	<i>Mín. 4</i>
<i>Acidez (meq/Kg)*</i>	<i>256 ± 67</i>	<i>155</i>	<i>402</i>	<i>-</i>	<i>Máx. 300</i>	
<i>Humedad (g/100g)</i>	<i>7.7 ± 5.2</i>	<i>1.8</i>	<i>11.8</i>	<i>Máx. 8</i>	<i>Máx. 4</i>	<i>Mín. 4.5 Máx. 8</i>
<i>Cenizas (g/100g)</i>	<i>2.5 ± 0.4</i>	<i>1.5</i>	<i>3.2</i>	<i>Máx. 4</i>	<i>Máx. 4</i>	<i>Mín. 1.5 Máx. 2.2</i>
<i>Lípidos (g/100g)*</i>	<i>6.9 ± 3.5</i>	<i>2.8</i>	<i>9.7</i>	<i>-</i>	<i>Mín. 1.8</i>	<i>Mín. 2.5 Máx. 6.5</i>
<i>Proteína (g/100g)*</i>	<i>23.8 ± 3.2</i>	<i>16.1</i>	<i>32.1</i>	<i>Mín. 15 Máx. 28</i>	<i>Mín. 8</i>	<i>Mín. 12 Máx. 18</i>
<i>Carbohidratos (g/100g)*</i>						
<i>Fructosa</i>	<i>19.5 ± 0.9</i>	<i>18.1</i>	<i>21.3</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>
<i>Glucosa</i>	<i>13.6 ± 2.4</i>	<i>11.6</i>	<i>20.3</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>
<i>Sucrosa</i>	<i>6.7 ± 2.0</i>	<i>4.5</i>	<i>9.0</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>
<i>Fibra dietaria</i>	<i>2.7 ± 1.8</i>	<i>0.5</i>	<i>4.6</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>

VALORACIÓN in vitro DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

<i>Soluble (g/100g)*</i>						
<i>Fibra dietaria insoluble (g/100g)*</i>	11.7 ± 3.3	6.5	17.6	-	-	-
<i>Fibra dietaria total (g/100g)*</i>	14.5 ± 3.5	7.8	18.1	-	Mín. 2	-

* Base seca. Mín.: Mínimo. Máx.: Máximo.

Fuente: (Fuenmayor B et al., 2014).

Tabla 1.2. Contenido de minerales en el polen apícola colombiano (mg/kg) (Base seca)

Mineral	Media	±	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Sodio	99.3	±	79.5	8.9	206
Potasio	5.625	±	1.176	3.058	7.616
Calcio	1.717	±	310	1.099	2.409
Hierro	70.7	±	27.8	23.2	126.6
Magnesio	1.029	±	396	343	1542
Zinc	47.4	±	21.6	19.8	70.6

Fuente: (Fuenmayor B et al., 2014)

Tabla 1.3 Principales ácidos grasos encontrados en el polen apícola colombiano (mg/100 mg lípidos) (base seca)

Ácido graso	Media	±	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
[C12:0] Láurico	4.61	±	2.05	0.85	9.12
[C14:0] Mirístico	1.33	±	0.44	0.49	2.65
[C16:0] Palmítico	11.33	±	2.82	6.30	16.59
[C18:0] Esteárico	1.88	±	0.41	1.07	3.04
[C18:1n9c] Oleico	2.38	±	0.51	1.29	3.89

[C18:2n6c] Linoléico	8.19	±	1.40	5.74	12.51
[C18:3n3] α-Linoléico	25.68	±	7.85	6.83	41.99
[C20:0] Araquidónico	1.27	±	0.32	0.63	1.54
[C20:3n6c] Homo-γ-linoléico	1.62	±	1.17	0.18	5.33
[C23:0] Tricosanóico	1.17	±	0.60	0.24	2.26
Ácidos grasos saturados (%)	36.62	±	4.92	27.31	50.79
Ácidos grasos insaturados (%)	63.38	±	4.92	49.92	72.69
Ácidos grasos totales (ω-3) (%)	37.86	±	7.43	14.97	51.26
Ácidos grasos totales (ω-6) (%)	15.02	±	2.59	9.92	23.12
Ácidos grasos totales (ω-9) (%)	8.45	±	1.58	4.87	13.08
Porción Insaturados/saturados	1.78	±	0.36	0.97	2.66
Porción (ω-3)/ (ω-6)	2.64	±	0.86	0.86	4.78

Fuente: (Fuenmayor B et al., 2014)

se evaluaron las características nutricionales y bioactivas de polen sometido al proceso de hidrolisis con enzimas comerciales (Castro, Zuluaga, Quicazán, & Pastrana, 2014). Se encontraron similitudes en los resultados de los análisis para grasa, fibras crudas y cenizas, registrados en la Tabla 1.4. La columna de la derecha corresponde al estudio de Castro (2014) donde se analizaron muestras recolectadas en el municipio de Viracachá (Boyacá).

Tabla 1.4 Comparación de la composición nutricional de polen apícola.

Componente	(Fuenmayor, Quicazán, & Figueroa, 2011)	(Bonveh, 1988)	(Castro et al., 2014)
a_w		0,268	
% Humedad	5,4 ±1,7	4,93	16,87±0,27
% Proteína	22,0 ±3,4	15,3	24,42 ± 0,98
% Grasa	5,9 ± 0,8	5,91	5,67 ± 0,44

VALORACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

% Fibra Cruda	7,2		6,4 ± 0,42
% Cenizas	2,2 ± 0,5	1,93	2,26 ± 0,04
pH	4,5 ± 0,5		4,18
Acidez (meq/Kg)			282,1 ± 8,8

Nota: Los valores se reportan en %peso/peso en base seca.

Tomada de (Castro et al., 2014)

En el estudio de *Castro et al.* (2014), se midieron compuestos bioactivos del polen fresco y sometido a la hidrolisis por enzimas comerciales, y se compararon los resultados encontrando que bajo tratamiento enzimático, las diferencias en bioactivos frente a polen fresco son altamente significativas, se concluye que las enzimas rompen la capa externa del grano de polen para dejar expuesto el contenido nutricional; se presentan los resultados para polen apícola fresco en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5 Compuestos bioactivos, fenoles y flavonoides totales del polen apícola de Viracachá (Boyacá)

Característica	Valor
Proteína (%Nitrógeno total)	24,403 ± 0,50
FRAP (mmoltrolox/gramo)	0,096 ± 0,001
ABTS (mmoltrolox/gramo)	0,074 ± 0,007
Fenoles totales (mg Ácido gálico/gr)	13,828 ± 1,298
Flavonoides (mg Quercetina/gr)	4,363 ± 0,303

Resultados en base seca
Adaptado de Castro et al. (2014)

Actividad Biológica

Las propiedades biológicas de los productos de la colmena son atribuidas a la región de origen, las fuentes botánicas visitadas por las abejas en busca de recursos, y la especie de abeja que transforma y/o secreta los productos que se obtienen de la producción con abejas. En esta sección se hace referencia a algunos hallazgos reportados para polen colectado por abejas, especialmente como antimicrobiano.

El polen apícola es comercializado principalmente como complemento nutricional posterior a un proceso de deshidratación; no obstante, dicho producto presenta limitantes, especialmente en cuanto a la calidad microbiológica (Hernández Moreno & Figueroa Ramírez, 2010). Dichos limitantes han generado la necesidad de efectuar desarrollos de productos tomando como materia prima el polen apícola; como es el caso de los extractos de polen, los cuales para la mayoría de los casos son elaborados empleando como solvente etanol o metanol y presentan potenciales de aplicación en salud humana, animal y para tratamiento de patógenos en plantas.

Antimicrobianos

La evaluación de la capacidad antimicrobiana de los extractos de polen ha sido estudiada sobre bacterias patógenas para plantas, en la provincia de Hatay Turquía se recolectaron muestras de polen y se extrajeron por método soxhlet, en 125ml de metanol puro y 150 g de polen, entre las bacterias testadas se encuentran *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. La prueba utilizada fue la de difusión en disco, los resultados de inhibición demostraron que, de las bacterias evaluadas, *A. tumefaciens* mostró la más alta sensibilidad a los extractos de polen (Basim et al., 2006).

En la Universidad Tecnológica Federal de Paraná, existen reportes de varios estudios donde se evalúan extractos etanólicos de polen apícola de las regiones de Paraná y Alagoas; bajo las concentraciones 40, 50, 60, 70, 80, y 90% de etanol, evaluadas contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442 y *Klebsiella* sp, por la técnica de difusión en disco, usando como control Gentamicina, encontrando niveles de inhibición iguales para los extractos etanólicos de polen al 60% de etanol, contra *Bacillus subtilis*,

Pseudomonas aeruginosa y *Klebsiella sp.* Las bacterias *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* no mostraron inhibición, para los extractos de Paraná, en ninguna de las condiciones de extracción. *Bacillus cereus* fue inhibido por el extracto de polen de Alagoas a concentraciones de 50 y 60 % de etanol. *Bacillus subtilis* fue inhibida por los extractos de polen de Paraná al 40, 50, 60 y 70% de etanol y por el extracto de polen de Alagoas al 50, 70 y 90%. En este estudio se presentó *in vitro* zonas de inhibición de hasta 7.00 mm alrededor del disco con el extracto de polen de Paraná al 90%; *Klebsiella* fue también inhibida por el extracto de polen de Alagoas al 60 y 70%. *Pseudomonas aeruginosa* fue inhibida al 80 y 90% y *Staphylococcus aureus* fue inhibida por extractos al 50, 60, 70 y 80% de etanol (Carpes, Begnini, Alencar, & Masson, 2007)

Un estudio anterior realizado en 2005 por Carpes y colaboradores, publicado en el año 2009, había evaluado extractos de polen apícola al 70% de etanol; cuyo polen provenía de la región sur de Brasil, de los estados de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do sul. Se determinó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar, contra 9 microorganismos: *Bacillus subtilis* ATCC 21.332, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15.442, *Streptococcus mutans* 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas vesicatoria* pv *vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Se utilizó un segundo método de evaluación de la actividad antimicrobiana, esta vez por el método de Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida (CMI) y (CMB) respectivamente (Carpes, Ribeiro, Rosalen, de Alencar, & Masson, 2009). En esta ocasión los extractos no exhibieron efecto inhibitorio. Concluyendo, que el polen apícola de la región evaluada, en la concentración evaluada y para los microorganismos probados, no mostraron ningún efecto inhibitorio.

Otro estudio realizado en México, con polen de las regiones de centro, Frailesca, Norte y altos del estado de Chiapas, evalúan la capacidad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, de los extractos concentrados de polen apícola (etanol/agua al 50%) utilizando la técnica de difusión en pozo, seleccionaron las muestras que presentaron halos de inhibición y posteriormente se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de dichos extractos de las cuatro zonas sobre la bacteria *S. aureus*, sobre la cual los extractos fueron efectivos; la CMI varió entre 4.86 y 10.10 mg/ml (Molina Urbina, Zea Caloca, Leyra Hernández, & Flores Pérez, 2008).

En Marruecos, se evaluó la actividad antibacteriana de extractos de polen apícola fresco y seco, y pan de abejas, sobre 14 bacterias patógenas, *E. coli* (tres cepas), *Salmonella enteritidis* (una cepa), *Pseudomonas aeruginosa* (tres cepas), *Staphylococcus aureus* (tres cepas), *Streptococcus* (tres cepas), *Bacillus cereus* (tres cepa). Se utilizaron extractos 50% (v/v), diluidas en DMSO (10%) para obtener concentraciones de 6.25, 12.5, 25 y 50%. Se utilizó el método de difusión en disco. Los extractos provenientes de pan de abeja inhibieron todas las cepas evaluadas hasta la dilución 1/4, las bacterias Gram positivas fueron las más sensibles. Para los extractos de polen fresco todas las bacterias inhibieron entre las diluciones 1/2 y 1/4, pero dos cepas no exhibieron inhibición. Los extractos provenientes de polen seco no inhibieron dos cepas de *E. coli* y una de *Pseudomonas aeruginosa* (Abouda, Zerdani, Kalalou, Faid, & Ahami, 2011).

La capacidad antifúngica y antibacteriana ha sido evaluada en Eslovaquia, usando extractos etanólicos de polen a diferentes concentraciones sobre 10 cepas de hongos filamentosos y levaduras y cinco cepas de bacterias, se utilizaron extractos de polen metanólicos al 99.9 y 70% y etanólicos al 96 y 70%. Fue usado el método de difusión en agar, *E. coli* fue la cepa más sensible al extracto metanólico al 99.9% mientras que el extracto etanólico al 70% resultó ser el más efectivo sobre la cepa de *S. aureus*. Para *Aspergillus fumigatus* (2.00 ± 2.65) mm fue el hongo más sensible al extracto de polen al 99.9%. *Aspergillus Niger* resulto ser el más sensible al extracto metanólico al 70%. En referencia a las levaduras *Candida albicans* (2.17 ± 0.29) mm fue la más sensible al extracto etanólico al 76% y *Candida glabrata* fue la más sensible al extracto metanólico al 70% (Kacániová et al., 2012).

■ Usos del polen

En la actualidad el polen apícola es usado como suplemento alimenticio humano por su acción reguladora de las funciones intestinales, por su contenido en fibra y la forma como esta se organiza a manera de granos. Se genera la elevación rápida en la tasa de hemoglobina en la sangre, debido a la alta presencia de hierro en este producto. Lleva a un rápido aumento de peso y recuperación de convalecientes por su alto contenido proteico y la presencia de aminoácidos esenciales y minerales (Jean-Prost & Yves, 2007).

VALORACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

En particular los extractos de polen han sido incluidos como suplemento en dietas para pollos parrilleros para evaluar la microflora del tracto gastrointestinal *in vivo* de los animales. En ese estudio, el polen fue extraído con 70% de etanol, se secó el extracto y se administraron varias concentraciones del extracto de polen a diferentes dietas, que fueron suministradas a los animales (5, 15, 25, 35 y 45 g de polen/kg de alimento y un grupo control sin polen) suplementados por siete semanas; se realizaron recuentos microbiológicos en busca de algunos microorganismos específicos, se encontró el más alto conteo de enterococos fecales, se encontró en el grupo de 15g/kg de alimento de polen, y el número más alto de lactobacilos fue encontrado en el grupo suplementado con 35 g/kg de alimento. Adicionalmente se midieron *in vitro* la actividad antibacteriana sobre algunas cepas, y se encontró que el efecto antimicrobiano más alto fue sobre *klebsiella oxytoca*. Se concluye en este estudio que el polen apícola puede ser usado como un potencial aditivo alimenticio con actividad prebiótica en dietas para aves de producción (Kačániová et al., 2013).

Para polen de pote, se conocen menos usos con soporte científico, en Colombia se sabe de algunos usos que se listan en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6 Usos del polen de pote en Colombia

Especie	Usos
<i>Melipona melanopleura</i>	Alimento
<i>Melipona nigrescens</i>	Alimento
<i>Melipona rufiventris</i>	Alivia migrañas
<i>Nannotrigona melanocera</i>	Alivia migrañas
<i>Paratrigona eutaeniata</i>	Problemas respiratorios
<i>Scaptotrigona limae</i>	Afrodisiaco
<i>Tetragonisca angustula</i>	Alimento, alivia migrañas

Fuente (Cepeda Granados & Nates-Parra, 2009)

Mecanismos de acción biológica del polen.

Se sabe que el polen apícola ha sido recomendado como suplemento en atletas y personas que realizan ejercicio de manera habitual; debido a la acción que el polen realiza sobre el estrés oxidativo del musculo esquelético durante el ejercicio riguroso. Se realizó un estudio en India, donde los objetivos abarcan la investigación en torno a la influencia de la suplementación con polen apícola en ratas con estrés oxidativo crónico en el músculo gastrocnemio, que corresponde al musculo en estrés oxidativo en nadadores. Fueron monitoreados algunos parámetros bioquímicos por complejos enzimáticos y parámetros moleculares como la expresión del mRNA para miostatina, el cual interviene bajo ejercicio riguroso en la producción de masa muscular. Se empleó polen apícola monofloral de mostaza, seco, pulverizado y tamizado en malla de 200µm mesh, se suministró en diferentes niveles de tratamiento el polen con lípidos comestibles (carpex355:Tween80) para mejorar la disponibilidad de los nutrientes del polen. Los parámetros fisicoquímicos evaluados para este mismo estudio, comprendieron fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante. Los polifenoles representaron los antioxidantes más importantes para los sujetos en estudio, lo que había sido reportado previamente para roedores en condiciones forzadas (Haleagrahara, Radhakrishnan, Lee, & Kumar, 2009; Swamy, Naveen, & Farhath, 2011). Se reportó que el polen de mostaza resultó ser rico en los flavonoides kaempferol (65.4 ± 0.5 mg/kg) y quercetina (51.4 ± 0.4 mg/kg) que ya habían sido reportados como potentes protectores en estrés oxidativo (Chen & Chen, 2013; Haleagrahara et al., 2009).

Para este estudio la acción del Carpex355 y Tween80 parece ser la responsable de la detección de altos valores de polifenoles y flavonoides aglicones, por la esterificación que ejercen en la glicerina y ácidos grasos del polen. Los efectos del polen sobre la actividad bioquímica en el músculo gastrocnemio se demostraron entre otras razones por la acción sobre los complejos enzimáticos puesto que inhibe la reducción de niveles de la enzima superóxido dismutasa SOD y glutatión GSH, entre otras, indicando la restauración y el balance oxidativo de los músculos (Ketkar et al., 2015).

Conclusión:

A nivel mundial, se han realizado estudios detallados de la composición química y nutricional del polen, sus mecanismos bioquímicos, y su acción a nivel celular para tratar

diversas afecciones de la salud humana. En Colombia ha sido recientemente caracterizado por sus componentes nutricionales y su origen botánico, sin embargo, el polen apícola y de pote, requiere ampliar los estudios con el fin de determinar y caracterizar sus cualidades terapéuticas y dar valor agregado al producto.

Referencias bibliográficas

- Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M., & Ahami, M. T. (2011). The Antibacterial Activity of Moroccan Bee Bread and Bee-Pollen (Fresh and Dried) against Pathogenic Bacteria. *Research Journal of Microbiology*, 6(4), 376–384. doi:10.3923/jm.2011.376.384
- Almeida-Muradian, L. (2005). Controle de qualidade do pólen apícola desidratado. *Medicina*, (11), 2004–2006. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Controle+de+qualidade+do+p?len+ap?cola+desidratado#0>
- Basim, E., Basim, H., & Özcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77, 992–996. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027
- Bogdanov, S. (2004). Quality and standards of of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38, 334–341.
- Bonveh, S. (1988). Origen botanico del polen apicola producido en españa, 78, 73–78.
- Carpes, S. T., Begnini, R., Alencar, S. M. de, & Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência E Agrotecnologia*, 31(6), 1818–1825. doi:10.1590/S1413-70542007000600032
- Carpes, S. T., Ribeiro, I. S., Rosalen, P. L., de Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Caracterização Do Potencial Antimicrobiano Dos Extratos De Pólen Apícola Da Região Sul Do Brasil. *Alimentos E Nutrição Araraquara*, 20(2), 271–277. Retrieved from <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/1057>
- Castro, L., Zuluaga, C., Quicazán, M., & Pastrana, Y. (2014). Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. In *Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID* (pp. 1–7). Colombia.
- Cepeda Granados, M., & Nates-Parra, G. (2009). *Comercialización de los productos de la Meliponicultura en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia - Bogotá.
- Chamorro-García, F. J., León-Bonilla, D., & Nates-Parra, G. (2013). Bee pollen as non-wood forest product in the eastern Andean highlands of Colombia. *Colombia Forestal*, 16(1), 53–66. Retrieved from

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-07392013000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es

- Chen, A., & Chen, Y. (2013). A review of the dietary flavonoid, Kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138, 2099–10.
- Coronel, B. B., Grasso, D., Pereira, S. C., Fern, G., Del, G., Ap, P., & Argentino, C. (2004). Caracterización bromatológica del polen apícola argentino. *Ciencia, Docencia Y Tecnologia*, XV, 145–181.
- Feas, X., Vazquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., Iglesias, A., Feás, X., ... Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(7), 8359–8377. doi:10.3390/molecules17078359
- Fonnegra, R. (1989). Análisis Palinológico de la Miel de Abejas. In *Métodos de Estudio Palinológico* (pp. 44–47).
- Fuenmayor B, C., Zuluaga D, C. ., Díaz M, C., Quicazán de C, M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del polen apícola colombiano. *Revista MVZ Cordoba*, 19(1), 4003–4014.
- Fuenmayor, C. A., & Figueroa, J. (2011). Empleando Bacterias Ácido Lácticas Probióticas, 20(23), 18–40.
- Gilliam, M., Roubik, D. W., & Lorenz, B. J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21(2), 89–97. doi:10.1051/apido:19900201
- Haleagrahara, N., Radhakrishnan, A., Lee, N., & Kumar, P. (2009). Flavonoid quercetin protects against swimming stress-induced changes in oxidative biomarkers in the hypothalamus of rats. *European Journal of Pharmacology*, 621, 46–52.
- Hernández Moreno, D. I., & Figueroa Ramírez, J. (2010). Calidad microbiológica del polen apícola seco recolectado en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca. In *XV Encuentro Nacional de Apicultores*. Santiago de Tolú. Sucre. Colombia.
- Jean-Prost, P., & Yves, L. C. (2007). Apicultura, Conocimiento de la abeja.
- Kačániová, M., Rovná, K., Arpášová, H., Hleba, L., Petrová, J., Haščík, P., ... Stričík, M. (2013). The effects of bee pollen extracts on the broiler chicken's gastrointestinal microflora. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 34–37. doi:10.1016/j.rvsc.2013.02.022
- Kacániová, M., Vuković, N., Chlebo, R., Haščík, P., Rovná, K., Cubon, J., ... Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Sciences*, 64(3), 927–934. doi:10.2298/ABS1203927K

- Ketkar, S., Rathore, A., Kandhare, A., Lohidasan, S., Bodhankar, S., Paradkar, A., & Mahadik, K. (2015). Alleviating exercise induced muscular stress using neat and processed bee pollen: oxidative markers, mitochondrial enzymes and myostatin expression in rats. *Integrative Medicine Research*. doi:10.1016/j.imr.2015.02.003
- Louveaux, B.J., Maurizio, A. & Vorwohl, G. (1970). Methods of melissopalynology. *Bee World*, see 4, 139–153.
- Martinez. (2006). Diagnostico de la Actividad Apícola y de la Crianza de Abejas en Colombia. *Instituto Interamericano de Cooperacion Para La Agricultura IICA*.
- Molina Urbina, H. E., Zea Caloca, S. G., Leyra Hernández, J., & Flores Pérez, A. (2008). Memorias. 15º CONGRESO INTERNACIONAL DE ACTUALIZACIÓN APÍCOLA. In *Evaluación de las propiedades bioactivas de extractos de polen de abejas de las zonas apícolas centro, Frailesca, norte y altos del estado de Chiapas*. (pp. 17–22). Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Montoya Pfeiffer, P. M. (2011). *Uso de recursos florales poliníferos por Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) en apiarios de la Sabana de Bogotá y alrededores*. Universidad Nacional de Colombia - Bogotá. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/3993/1/190316.2011.pdf>
- Nates-Parra, G., & González, V. H. (2000). Las Abejas Silvestres De Colombia: Por Qué Y Cómo Conservarlas. *Acta Biológica Colombiana*, 5(2), 33.
- Nates-Parra, G. S. (2011). *Guía Ilustrada de Polen y Plantas Nativas Visitadas por Abejas (Cundinamarca, Boyacá, Sucre, Atlántico y Sierra Nevada de Santa Marta. Colombia)*.
- Obregón Coredor, D. (2011). *Origen botánico de la miel y el polen provenientes de nidos de Melipona eburnea Friese, 1900 y Tetragonisca angustula (Latreille, 1811), (Apidae: Meliponini) para estimar su potencial polinizador*. Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/5266/1/dianaobregoncorredor.2011.pdf>
- Saavedra, K., Rojas, C., & Delgado, G. (2013). Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque - Perú). *Revista Chilena de Nutrición*, 40(5), 71–78. doi:10.4067/S0717-75182013000100011
- Sánchez Alarcón, O. A. (2014). Sistemas de Producción y Economía Apícola en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Caso de Tres Organizaciones de Productores. *Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.*, 144.
- Sancho, M. T., & Mal-lozano, J. S. I. (1993). Composición del, 59.
- Swamy, M., Naveen, S., & Farhath, K. (2011). Antifatigue mechanism green tea polyphenols in rat subjected to forced swimming test. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Research*, 2, 133–7.

- Vit, P. (2005a). Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 35(2), 32–39. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772004000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Vit, P. (2005b). Productos de la colmena secretados por las abejas: Cera de abejas, jalea real y veneno de abejas. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 36(1), 35–42. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772005000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Vit, P., & Santiago, B. (2008). Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58(14), 411–415.

2. Efectos antibacterianos y antifúngicos de extractos etanólicos de polen apícola de la región Cundiboyacense y polen de pote de la región antioqueña colombiana.

Resumen

El polen apícola al igual que otros productos de la colmena ha sido valorado por sus propiedades medicinales para uso terapéutico. El polen de pote proveniente de abejas nativas ha sido menos estudiado para estas propiedades. El objetivo de este estudio fue obtener principios activos de polen de *Apis mellifera* y de *Tetragonisca angustula* mediante extractos etanólicos, evaluar su capacidad antibacteriana y antifúngica, y cuantificar la presencia de fenoles totales y la capacidad antioxidante de algunos de estos extractos. Fueron evaluados 22 polenes apícolas (húmedos y después de secado para su comercio) y 10 polenes de pote de *Tetragonisca angustula*. La obtención de los extractos a partir del polen fue realizada mediante la estandarización de una técnica basada en la metodología reportada por Carpes en 2009, adicionalmente se estandarizó la medición y ajuste de la concentración de sólidos solubles totales (SST) expresados como miligramos por mililitro (mg/ml) de los extractos etanólicos de polen (EEPo). La actividad antibacteriana y antifúngica fue medida utilizando el método de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con rangos de detección entre 1 y 32 mg/ml. Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028 (SE) y *Escherichia coli*, ATCC 31617 (EC), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 (SA) y *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341 (KR). El hongo evaluado correspondió a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 (CA). Se analizó la inhibición vs la no Inhibición de los EEPo de acuerdo a cada patógeno presentándose diferencias entre el porcentaje de inhibición entre las bacterias y el hongo ($\chi^2=43.3$, $p\text{-valor}<0.001$). Se presentó inhibición en más del 60% de los extractos con

respecto a bacterias y en el 26% con respecto al hongo. La mayor capacidad inhibitoria entre las bacterias fue sobre *Staphylococcus aureus*. Hubo diferencias entre procedencia $p < 0.001$ para las tres regiones en estudio, así como, por la especie de abeja $p < 0.001$, estimadas por pruebas de Kruskal-Wallis. Las CMI en el 95% de los casos de inhibición fueron de 32 y 16 mg/ml de SST. Con base en una clasificación jerárquica de las actividades inhibitorias de los EEPO, fueron seleccionadas 10 muestras en las que se valoraron los fenoles totales y la actividad antioxidante. Los fenoles totales fueron analizados por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu a 760nm, usando ácido gálico como referencia estándar. Los fenoles totales mostraron diferencia significativa valor $p = 0.0754$ con respecto a la región de origen. La actividad antioxidante por TEAC-DPPH fue diferente y estadísticamente significativa valor $p = 0.0452$ entre las regiones de origen.

El presente estudio reporta de manera novedosa resultados de actividad biológica, expresados en SST (mg/ml), así como, el comportamiento de los EEPO teniendo en cuenta el momento de la colecta (polen apícola húmedo) y el proceso de secado al que es sometido el polen para su comercialización (polen apícola seco) y su comparación con polen de pote de *Tetragonisca angustula*. Este es el primer reporte realizado para polenes de Colombia.

Palabras clave: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), antimicrobiano, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Candida albicans*, fenoles totales, antioxidantes.

Introducción

El polen apícola en Colombia se genera en un 90% en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca donde la producción estimada es de 36 kg/colmena/año y supera por más del doble producciones de países con estaciones (Martinez, 2006; Sánchez Alarcón, 2014). Esta región debido a su ubicación y riqueza botánica, presenta un enorme potencial para la obtención del producto. El polen apícola es consumido por el humano, como suplemento alimenticio, pero se desconocen en Colombia la presencia de sus principios bioactivos. Para otros productos de la colmena como propóleos, estas propiedades biológicas se han valorado mediante extractos etanólicos debido a que el

solvente permite su comercialización, igualmente la miel se ha valorado por sus propiedades bioactivas en el país (Gamboa & Figueroa, 2009).

En el mundo, el polen apícola, al igual que otros productos de la colmena ya ha sido valorado por sus propiedades medicinales tales como: antibacterianas (Carpes et al., 2007; Kroyer & Hegedus, 2001; Morais, Moreira, Feás, & Estevinho, 2011), antifúngicas (Kacániová et al., 2012), y ha sido usado como producto terapéutico, con usos medicinales como el control de la prostatitis crónica y el tratamiento de úlceras gástricas entre otros (Linskens & Jorde, 1997). En el caso del polen de pote de *Tetragonisca angustula*, la abeja nativa de mayor uso zootécnico en Colombia, se encuentra menos estudiado, por ser un recurso que normalmente no se comercializa (Guiomar Nates-Parra, 2009). Es de esperarse que el polen de pote de abejas nativas tenga propiedades bioactivas, puesto que existen estudios que reportan la presencia de compuestos fenólicos de importancia para extractos de polen de pote de algunas abejas nativas propias de Brasil (Tania M S Silva et al., 2009; Tania Maria Sarmiento Silva et al., 2006).

Algunos estudios han valorado *in vitro* las capacidades antimicrobianas del polen colectado por las abejas. En el caso de polen proveniente de *Apis mellifera* varios autores han valorado su capacidad antibacteriana con variabilidad debida al origen geobotánico del polen, a los solventes y los niveles de solventes utilizados para obtener el extracto (Barbosa, Sandra. Silvestre, Armando. Estevinho, Simoes. Estevinho, 2006; Basim et al., 2006; Carpes et al., 2007, 2009). La capacidad antifúngica ha sido evaluada usando extractos etanólicos de polen a diferentes concentraciones sobre hongos filamentosos y levadurales, entre ellas cepas de *Candida sp.*, género que resultó ser más sensible al poder antifúngico de los extractos etanólicos de polen al 70% en Eslovaquia (Kacániová et al., 2012).

Es de importancia para los apicultores colombianos, que se conozcan las propiedades bioactivas del polen apícola y el polen de pote que se produce en el país, como sí ocurre para otros productos de la colmena de interés en el mercado como las mieles y los propóleos. Este conocimiento de las propiedades bioactivas del polen da valor agregado al producto, lo que representa mejores posibilidades de comercialización como suplemento alimenticio y como producto con principios bioactivos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antibacteriana y antifúngica, de los extractos etanólicos de polen de *Apis mellifera* y de *Tetragonisca angustula* y cuantificar la presencia de fenoles totales y la capacidad antioxidante de algunos de estos extractos.

■ Materiales y métodos

2.3.1 Muestras de polen

Para la valoración de la actividad antimicrobiana fueron analizadas 44 muestras de polen apícola en estado fresco y después del secado; 12 provenían del departamento de Cundinamarca y 10 de Boyacá. Para pólenes de *Tetragonisca angustula* fueron analizadas 10 muestras de polen de pote provenientes del departamento de Antioquia. El secado de polen de *Apis mellifera* correspondió a procesos comerciales realizados por los apicultores a temperaturas entre 35 y 45°C de acuerdo a lo reportado para Colombia (Barajas-Ortiz, Martínez, & Rodríguez-Sandoval, 2010).

2.3.2 Preparación de los extractos etanólicos de polen (EEPo)

Los EEPo se prepararon utilizando el protocolo de Carpes (Carpes et al., 2007) modificado de la siguiente manera: la preparación del polen apícola fresco, seco y de pote se realizó a razón de 2g de polen por 15ml de etanol al 70%. Para corregir la cantidad en el caso del polen apícola fresco, se tuvo en cuenta una pérdida del 18% de humedad, la cual es la más alta reportada para polen apícola durante el secado en Colombia (Grosso, Figueredo, & González, 2008). Así, las mezclas se llevaron a baño serológico a 70°C por 30 minutos con agitación cada 10 minutos. Luego, fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante, el cual corresponde a los EEPo madre utilizados en el estudio. Para este estudio se valoraron los sólidos solubles totales, los cuales se estandarizaron de la siguiente manera: un mililitro de EEPo madre fue sometido a deshidratación para determinar la concentración de Sólidos Solubles Totales (SST) para lo cual se empleó el medidor de humedad PRECISA® XM 120, el resultado fue expresado en miligramos por mililitro (mg/ml).

Los EEPo madre se ajustaron con el diluyente etanólico a una concentración de 64 mg/ml de SST, debido a que esta fue la menor cantidad de SST entre todos los extractos

evaluados. Finalmente con los EEPo ajustados se realizaron las pruebas antimicrobianas.

2.3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.

La actividad antibacteriana y antifúngica se midió utilizando el método de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se valoraron rangos de detección entre 1 y 32 mg/ml de acuerdo a 6 diluciones seriadas 1:2. Estas diluciones fueron dispensadas en microplacas de 96 pozos a volúmenes de 200 μ l. Se ajustó la densidad óptica de los microorganismos en solución salina hasta la concentración 0,5 McFarland medido con BioMerieux, Densichek Plus Abbot®. Cada microorganismo se adicionó en los pozos correspondientes en la microplaca y se incubó por 24 horas. Como soporte de la prueba se utilizaron tres controles, un control de viabilidad de cada cepa del microorganismo, un control de esterilidad del medio de dilución y un control de cada microorganismo sometido a etanol al 70% para evaluar la acción microbicida del etanol sobre los microorganismos evaluados. En cada placa, se realizaron pruebas para seis extractos en dos repeticiones y en las dos últimas filas se dispensaron los tres controles. Este montaje fue realizado dos veces por cada combinación extracto-microorganismo, para un total de cuatro repeticiones. Transcurrida la incubación se realizaron subcultivos de cada pozo en agar y luego de su incubación se determinó el crecimiento o la inhibición de los microorganismos. Las bacterias sometidas a prueba correspondieron a las Gram negativas *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028 (SE) y *Escherichia coli*, ATCC 31617 (EC), las Gram positivas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 (SA) y *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341 (KR). El hongo evaluado fue la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 (CA). Para los ensayos antibacterianos se utilizaron agar y caldo Mueller Hinton y se incubó a temperatura de 37°C durante 24 horas cultivo en placa y 48 horas subcultivo en agar. Para la valoración antifúngica se empleó caldo y agar papa dextrosa (PDA), e incubación a 26°C por 24 horas en placa y por 48 horas la incubación en subcultivo en agar. Finalmente, se determinó en los subcultivos en agar la CMI. Se registraron los datos para su posterior análisis. Para la valoración antifúngica se empleó caldo y agar papa dextrosa (PDA), e incubación a 26°C por 24 horas en placa y por 48 horas la incubación en subcultivo en agar. Finalmente, se determinó en los subcultivos en agar la CMI. Se registraron los datos para su posterior análisis.

2.3.4 Fenoles totales y actividad antioxidante (TEAC-DPPH*)

Luego de los bioensayos realizados, con base en un dendograma de las actividades inhibitorias de los EEPo, fueron seleccionadas 10 muestras representativas de los grupos en las que se valoraron los fenoles totales y la actividad antioxidante, así, se seleccionaron dos muestras de Cundinamarca en estado húmedo y dos en estado seco, 2 de Boyacá en estado húmedo y dos en estado seco, y dos de pote de Antioquia; luego se midieron en estas muestras la cantidad de fenoles totales y su actividad antioxidante. Las muestras fueron procesadas bajo los Procedimientos Operativos Estándar (POE) del Laboratorio del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Para esto, el contenido total de fenoles fue determinado por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu a 760nm (Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, 1999), usando ácido gálico como referencia estándar. Se realizaron diluciones de los extractos previas a la medición de los fenoles totales y de la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH (EEPo de *Apis mellifera* 1:10 y EEPo de *Tetragonisca angustula* 1:50). Para la medición se tomaron 100 µl del extracto y se mezclaron con 400 µl de agua destilada; se adicionaron 1250 µl de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% p/v preparado con agua destilada, se dejó reposar la solución con carbonato por 5 minutos. Se adicionaron 250 µl de reactivo de Folin diluido 1:1 recién preparado en agua destilada. La solución se preservó en oscuridad por 2 h. Seguidamente se realizó la medición en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC® EVOLUTION 60. Los resultados se expresan como mg de ácido gálico/ g extracto polen.

La actividad antioxidante se realizó preparando una solución madre del reactivo DPPH* 1:10 en MeOH; luego, se preparó una solución de trabajo que consiste en la mezcla de 10 ml de la solución madre con 50 ml de MeOH. Seguidamente, se tomaron 0.990 ml de la solución de trabajo y se adicionaron 0.01 ml de la muestra de EEPo previamente diluida, esta mezcla se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia del radical DPPH* a 517 nm en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC® EVOLUTION 60. Se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH* y a partir de una curva de calibrado se obtuvo la concentración en equivalentes de trolox. Los resultados se expresaron en mg Trolox/g de muestra (Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, 1995).

2.3.5 Análisis de datos

Fue calculada la CMI por cada combinación EEPo-cepa de patógeno, mediante el cálculo de la moda de los cuatro bioensayos realizados, asegurándose que en el caso de tener dos modas, la CMI fuera la de mayores SST o menor CMI. Luego, en el paquete estadístico R-comander (Fox, 2005) del lenguaje R (R Core Team, 2013), fueron realizados los análisis estadísticos. Para el análisis de la capacidad de inhibición contra la no inhibición de los EEPo, fueron realizadas pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con nivel de significancia del 5% y tablas de contingencia de acuerdo al patógeno a inhibir, el departamento, especie de abeja del que proviene el EEPo y el estado de humedad del polen. Para la determinación de la CMI de acuerdo al patógeno a inhibir, fueron realizadas pruebas de rangos de Wilcoxon a un nivel de significancia del 5% y tablas de contingencia. Se realizó una clasificación jerárquica mediante la distancia de Ward, realizado con el paquete FactoClass de R. Con los resultados de fenoles totales y capacidad antioxidante por TEAC-DPPH, se realizó análisis de varianza (ANOVA) del contenido de Fenoles y DPPH de acuerdo al origen (región y estado del polen), además se realizaron análisis de correlación de Pearson, simples y múltiples para analizar la semejanza entre los comportamientos de fenoles totales y antioxidantes, y las capacidades inhibitorias sobre las cepas evaluadas.

Resultados

2.4.1 Análisis de inhibición

Cuando se evaluó la inhibición vs no inhibición de los EEPo de acuerdo a cada patógeno, se encontró diferencias en el porcentaje de inhibición entre las bacterias y el hongo (chi-cuadrado= 46.3, p-valor < 0.001), presentándose alguna capacidad de inhibición en más del 60% de los EEPo con relación a las bacterias, mientras que para el hongo solamente hubo actividad en el 26% de las muestras figura 2-1 Al explorar las diferencias entre la capacidad de inhibición entre las bacterias, se encontró que la mayor capacidad inhibitoria tuvo lugar sobre la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 (SA) con más del 80% de actividad de inhibición. Cuando fue evaluada la capacidad de inhibición de los EEPo sobre el hongo *Candida albicans* ATCC 10231 (CA), para todos los factores estudiados se encontró que la

mediana representó la no inhibición ($p=0.47$), puede indicarse que 13 de los 14 casos de inhibición fueron de polenes de *Apis mellifera* a una concentración de 32 mg/ml de SST.

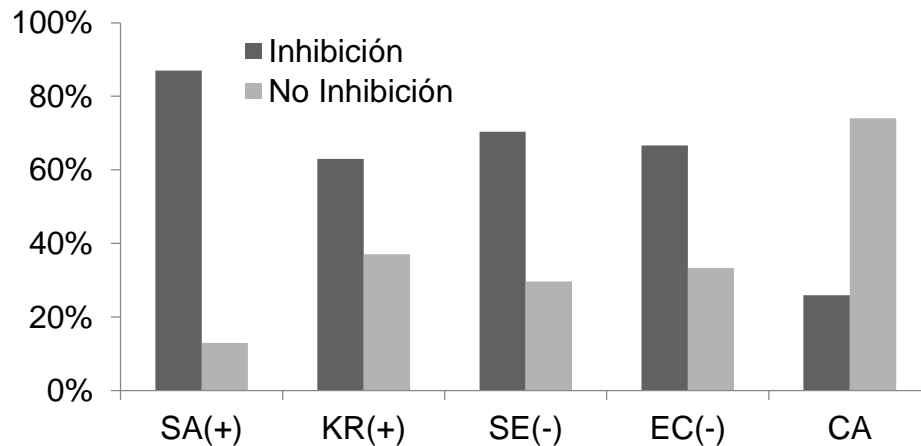


figura 2-1 Porcentaje de inhibición y no inhibición de 54 EEPo. SA (+): *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538. KR (+): *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. SE (-): *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028. EC (-): *Escherichia coli*, ATCC 31617. CA: *Candida albicans* ATCC 10231. (+): Gram positivo. (-) Gram negativo.

Se realizó el análisis de la inhibición sobre las bacterias por departamento. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A se aprecia como la inhibición fue mayor en el departamento de Antioquia con un 95% (*Tetragonisca angustula*) de inhibición, para Cundinamarca con un 77% y Boyacá con un valor de 54% (Polen de *Apis mellifera*). Siendo Boyacá y Cundinamarca estadísticamente diferente de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.001$). Por su parte, al analizar la inhibición de acuerdo a la especie de abeja (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B) se puede apreciar que la inhibición es estadísticamente diferente ($p < 0.001$) siendo más activa *Tetragonisca angustula*. El efecto inhibitorio de los polenes de *Apis mellifera*, a pesar de ser menores a los de *Tetragonisca angustula*, presentaron diferencias de acuerdo a su origen, siendo el efecto diferente y mayor en Cundinamarca con relación a los EEPo de Boyacá ($P < 0.001$) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A).

VALORACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

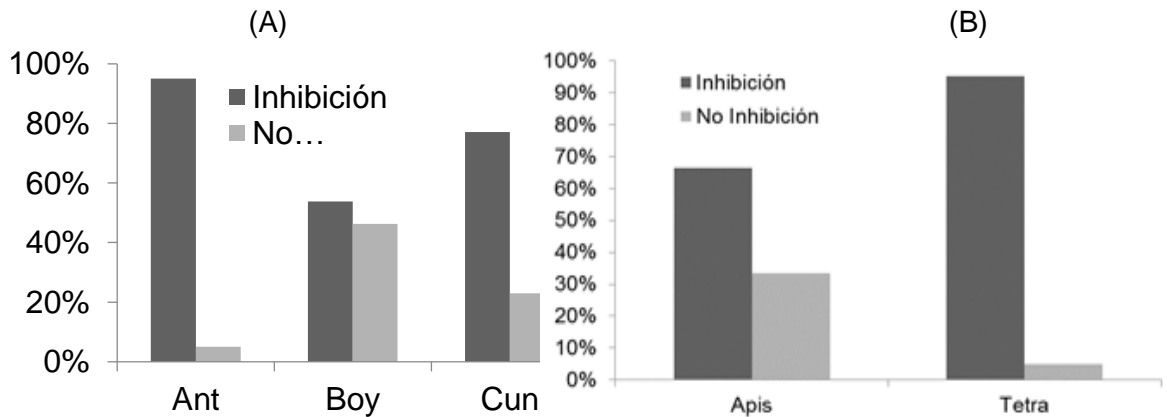


Figura 2-2 - Porcentaje de inhibición de los EEPo de acuerdo al departamento de origen (A) y a la especie de abeja (B)

Por su parte, al analizar el efecto de los polenes de *Apis mellifera* de acuerdo a su estado (húmedo y seco), en la Figura 2-3 se observa que la capacidad inhibitoria del polen de Cundinamarca es mayor especialmente en estado seco que el polen de Boyacá ($p < 0.001$). Así, aunque hay una tendencia hacia tener mayor inhibición cuando el polen está seco, estadísticamente no se pudo comprobar ($p = 0.07$) para el conjunto de polenes de *Apis mellifera* actuando en las bacterias evaluadas.

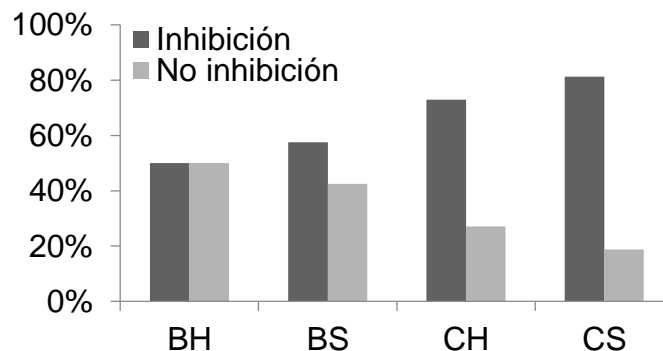


Figura 2-3 - Porcentaje de inhibición de acuerdo al departamento y al estado del polen. BH: Boyacá Húmedo. BS: Boyacá Seco. CH: Cundinamarca Húmedo. CS: Cundinamarca Seco.

2.4.2 Análisis de la capacidad mínima inhibitoria.

Un resumen del número de inhibiciones de cada bacteria y el porcentaje de inhibición de acuerdo a la concentración de EEPo se presenta en la Tabla 7, donde se puede evidenciar que en el 95% de los casos las inhibiciones se presentaron en las concentraciones de 32 y 16 mg/ml. Además, para todos los patógenos a excepción de SE, los mayores porcentajes de inhibición estuvieron en 32 mg/ml, por lo que esta es la capacidad mínima inhibitoria para los tres patógenos con un p -valor <0.001 en los tres casos. Adicionalmente, en el caso de SE al realizar una prueba de Wilcoxon se encontró con un p -valor <0.001 que los porcentajes de inhibición a las concentraciones de 32 y 16 mg/ml son distintos, como también se puede observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.4.**

Adicionalmente, cuando fueron analizadas las inhibiciones y sus porcentajes de acuerdo a la especie de donde se obtuvo el EEPo (Tabla 2), se pudo observar que de los ocho casos más activos, tuvieron CMI menor a 16 mg/ml (para todas las bacterias), solo uno de ellos corresponde a polen proveniente de *Apis mellifera* y es una muestra de Boyacá en estado seco (BS) y los restantes siete EEPo corresponden a la especie *Tetragonisca angustula*; tres de ellos tuvieron CMI de 8 mg/ml para SA, mientras que es de resaltar un EEPo proveniente de esta especie de abeja que exhibió inhibición para cuatro de las bacterias con CMI de 1 y 4 mg/ml. Por tal razón, varias de estas muestras se tuvieron en cuenta para una evaluación posterior de sus compuestos químicos mediante la valoración de los Fenoles totales y actividad antioxidante por TEAC-DPPH.

Revisando los porcentajes de inhibición de acuerdo a la especie de la que proviene el EEPo (Tabla 8), para las bacterias Gram positivas en especial para SA, el mayor porcentaje de muestras de *Apis mellifera* tuvo CMI de 32 mg/ml, mientras que para *Tetragonisca angustula* fue de 16 mg/ml, hallando que las inhibiciones de las dos especies fueron estadísticamente diferentes sobre el grupo de bacterias (p -valor <0.001).

En el caso de las bacterias Gram negativas, el comportamiento fue diferente de acuerdo a la bacteria a inhibir y a la especie de abeja de la que proviene el EEPo. Para SE los mayores porcentajes de CMI para ambas especies (*Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula*) estuvieron en 16 mg/ml y estadísticamente su nivel de inhibición es similar ($p=0.5094$), mientras que para EC los mayores porcentajes de CMI en los EEPo de

VALORACIÓN in vitro DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

ambas especies fue a 32 mg/ml, siendo las CMI también similares en ambas especies (p-valor=0.1485).

Tabla 7 - Capacidad Mínima Inhibitoria para 4 bacterias (Número de Inhibiciones y % de Inhibición)

Concentración (mg/ml)	SA		KR		SE		EC		Total	
	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
32	29	61.7%	22	64.7%	16	42.1%	29	80.6%	96	61.9%
16	13	27.7%	11	32.4%	21	55.3%	6	16.7%	51	32.9%
8	4	8.5%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	4	2.6%
4	0	0.0%	1	2.9%	0	0.0%	0	0.0%	1	0.6%
2	0	0.0%	0	0.0%	1	2.6%	1	2.8%	2	1.3%
1	1	2.1%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	1	0.6%

I = Número de inhibiciones por concentración de EEPo. SA: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538. KR: *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. SE: *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028. EC: *Escherichia coli*, ATCC 31617.

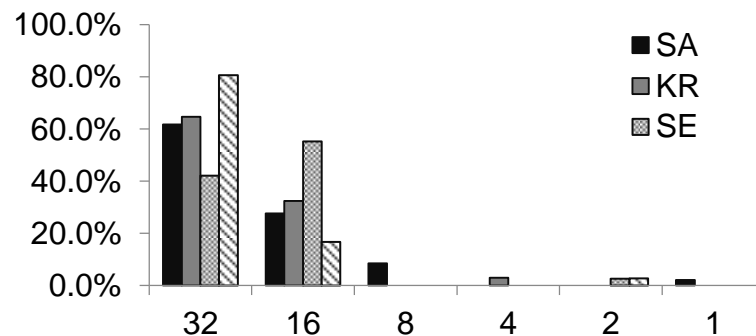
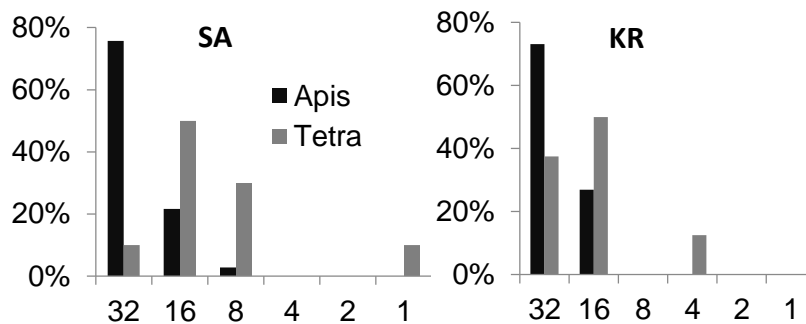


Figura 2-4 - Capacidad Mínima Inhibitoria para 4 bacterias (%). SA: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538. KR: *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. SE: *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028. EC: *Escherichia coli*, ATCC 31617.

Tabla 8- Capacidad mínima inhibitoria para cuatro patógenos de acuerdo a los EEPo de dos tipos de abeja

Concentración (mg/ml)	SA		KR		SE		EC									
	Apis		Tetra		Apis		Tetra									
	I	%	I	%	I	%	I	%								
32	28	76%	1	10%	19	73%	3	38%	13	46%	3	30%	23	88%	6	60%
16	8	22%	5	50%	7	27%	4	50%	15	54%	6	60%	3	12%	3	30%
8	1	3%	3	30%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
4	0	0%	0	0%	0	0%	1	13%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	10%	0	0%	1	10%
1	0	0%	1	10%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%

I = Número de inhibiciones por concentración de EEPo. Apis: *Apis mellifera*. Tetra: *Tetragonisca angustula*. SA: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538. KR: *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. SE: *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028. EC: *Escherichia coli*, ATCC 31617.



VALORACIÓN in vitro DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

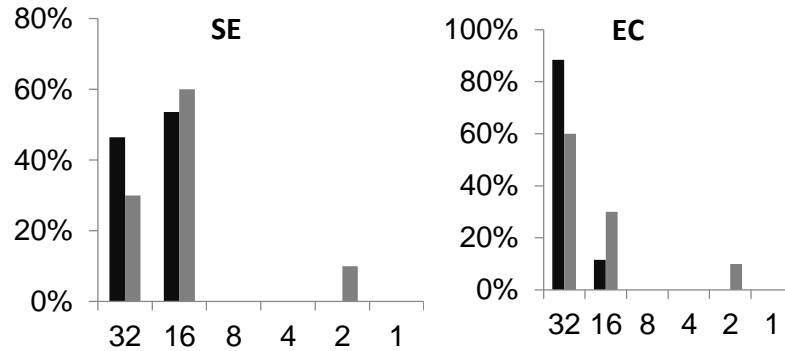


Figura 2-5 - Capacidad Mínima Inhibitoria de EEPO de las dos especies de abejas, sobre las bacterias en estudio. %: Porcentaje de inhibición. Eje X: mg/ml de sólidos solubles totales. SA: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538. KR: *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. SE: *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028. EC: *Escherichia coli*, ATCC 31617.

2.4.3 Fenoles totales y actividad antioxidante por TEAC-DPPH.

Mediante la clasificación jerárquica de distancias de Ward, se generaron asociaciones entre actividades antimicrobianas (bacterias y levadura) y los EEPO evidenciando siete jerarquías Figura 6, que correspondieron a:

Grupo 1: con actividad sobre las cuatro cepas bacterianas en especial sobre *Kocuria rhizophila* (CMI: 16 mg/ml), y sin actividad sobre *Candida albicans*. (Ocho EEPO)

Grupo 2: con actividad por lo menos sobre cuatro de los cinco microorganismos analizados sin seguir ningún patrón particular. (21 EEPO)

Grupo 3: con actividad sobre uno o dos microorganismos, e incluyen usualmente *Staphylococcus aureus*. (10 EEPO)

Grupo 4: con actividad sobre otros microorganismos pero no sobre *Staphylococcus aureus*. (Cuatro EEPO)

Grupo 5: con mayor actividad sobre *E. coli* (CMI: 16 mg/ml), e incluyen inhibición sobre otros microorganismos. (Seis EEPO)

Grupo 6: con actividad sobre *Staphylococcus aureus* a 8mg/ml de CMI y sobre las demás bacterias CMI a 16 mg/ml. (Cuatro EEPO)

Grupo 7: Atípica de *Tetragonisca angustula* con actividad sobre todos los microorganismos a altas concentraciones. CMI, entre 1 y 4 mg/ml para bacterias y 32 mg/ml para *Candida albicans*. (Un EEPo)

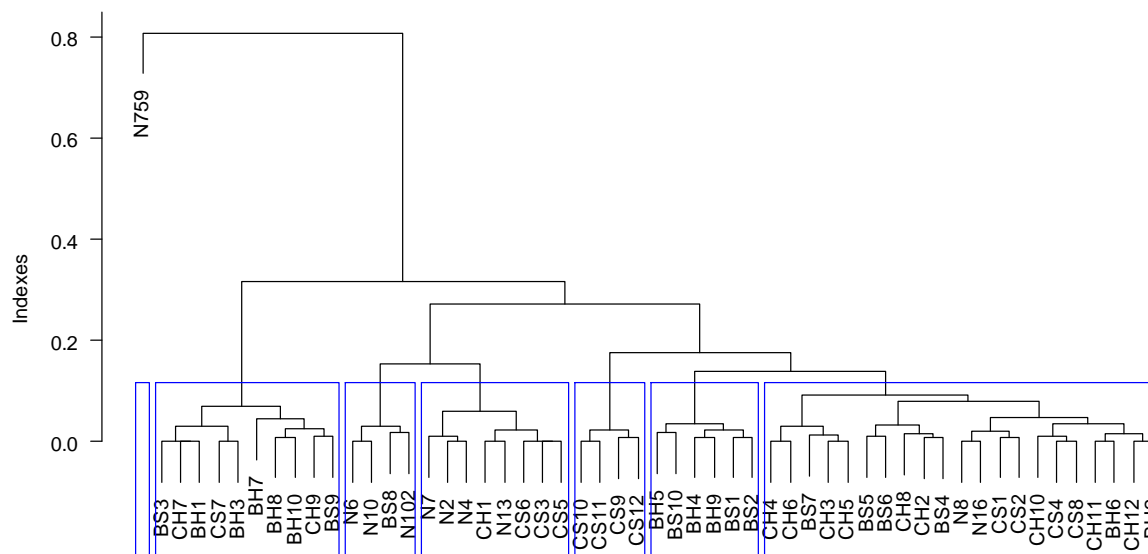


Figura 6. Clasificación jerárquica de distancias de Ward, para los EEPo.

Se analizaron 10 muestras representativas de las siete jerarquías de distancia de Ward. Se puede observar en la Figura 7 los resultados de fenoles y la actividad antioxidante. Para fenoles totales los valores oscilaron entre 20 y 33.6 mg de ácido gálico /g de extracto de polen y para TEAC-DPPH entre 0.0079 y 0.2779 /mg Trolox/g de extracto de polen.

VALORACIÓN in vitro DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

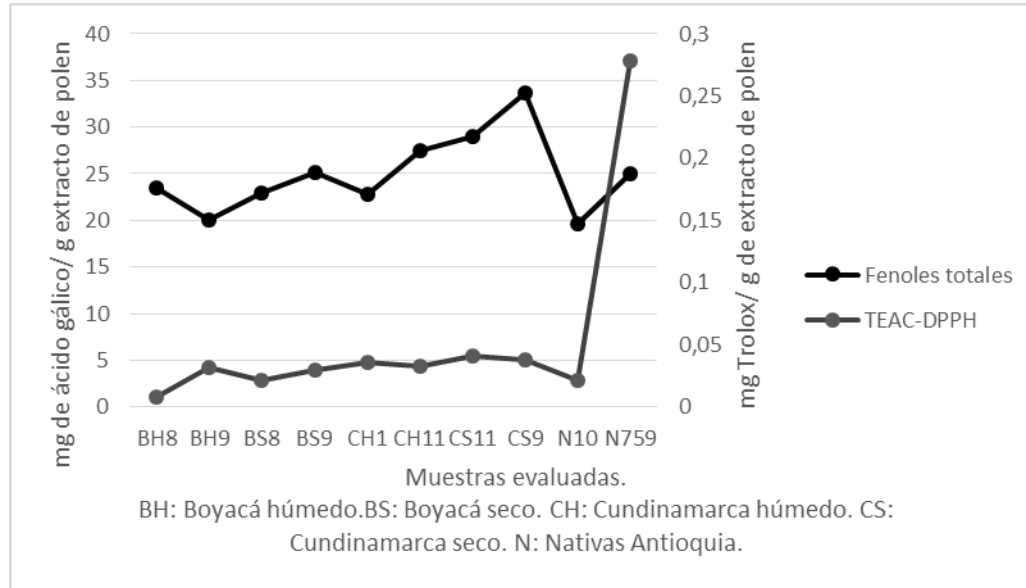


Figura 7. Fenoles totales y actividad antioxidante por TEAC-DPPH para 10 EEPo representativos.

Como se observa en la figura 8 el contenido de fenoles totales, tiene una tendencia a ser mejor en los EEPo de *Apis mellifera* en estado seco, mientras que para la capacidad antioxidante de las muestras evaluadas hay una tendencia de mejor capacidad antioxidante de los EEPo provenientes de polen de pote.

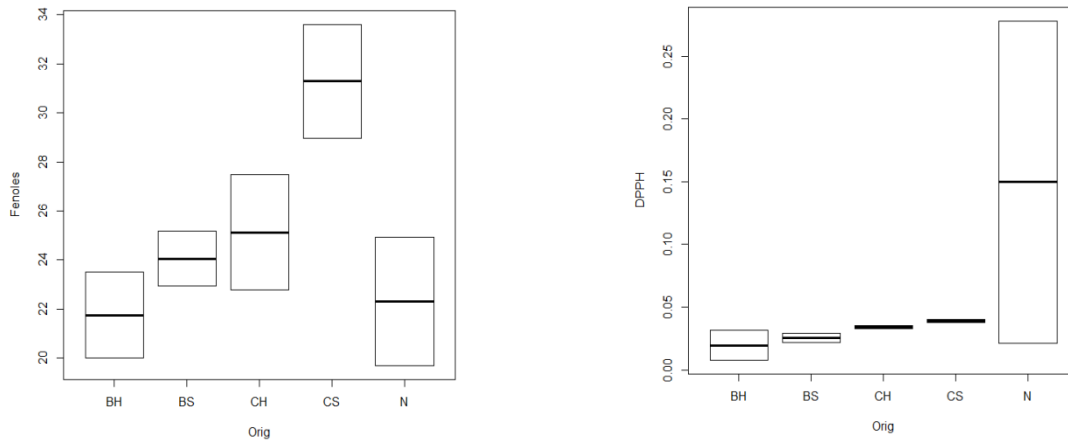


Figura 8. Boxplot del contenido de fenoles totales y antioxidantes TEAC-DPPH en los EEPo. Fenoles: fenoles totales expresados como mg de ácido gálico/ g extracto polen. DPPH: capacidad antioxidante medido como mg Trolox/g de muestra. BH: Boyacá

Húmedo. BS: Boyacá Seco. CH: Cundinamarca Húmedo. CS: Cundinamarca Seco. N: Antioquia pote, *T angusula*

Correlaciones. Se halló que existe correlación entre la capacidad antioxidante por TEAC-DPPH y la capacidad inhibitoria exhibida sobre las cuatro cepas bacterianas SA, KR, SE y EC, con valores $p= 0.0142$, $p= 0.0028$, $p= 0.0021$, $p= 0.0003$; respectivamente. Los coeficientes de correlación correspondieron a 0.7412, 0.8328, 0.8443 y 0.9074 respectivamente, siendo correlaciones moderadamente fuertes. En el caso de los fenoles totales, estadísticamente no se presentó correlación entre este parámetro y las actividades inhibitorias de las bacterias evaluadas. Finalmente, *Cándida albicans* no presentó correlación con ninguno de los parámetros fisicoquímicos evaluados.

Discusión

El 100% de los EEPo mostró alguna actividad antimicrobiana. 9.3%, 42.6 %, 24.1 %, 3.7% y 20.4% de los EEPo tuvieron actividad sobre cinco, cuatro, tres, dos y un germen respectivamente. La variabilidad en los comportamientos de los EEPo sobre bacterias y el hongo evaluado, había sido reportado en EEPo provenientes de Brasil en las regiones de Alagoas y Paraná, mostraron inhibición sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.* y *Bacillus cereus* usando etanol al 70% y otros niveles del solvente (Carpes et al., 2007).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), en términos de Sólidos Solubles Totales SST, fue de 32 mg/ml, sobre tres de la bacterias evaluadas, de manera particular para *Salmonella entérica* SE fue de 16 mg/ml, los estudios previos reportados no tienen en cuenta la estandarización de los SST, por lo que este estudio sería el primer reporte con concentraciones específicas de EEPo. Se halló que la CMI de los extractos etanólicos de los polenes actúan a concentraciones de solidos solubles totales en el orden de mg/ml mientras los extractos de propóleos actúan en el orden de los $\mu\text{g/ml}$ (Schmidt et al., 2014). Cuando se comparan extractos etanólicos de polen con extractos etanólicos de propóleos se evidencia que para el caso de los propóleos existen normativas que regulan la cantidad de SST de estos extractos, tal es el caso de la norma Brasileira (Brasil, 2001), estandarización que debe ser construida para el caso de los polenes.

Se observó que 26% de las muestras presentaron actividad antifúngica, la acción sobre *Candida albicans* había sido reportada por el método de difusión en agar, donde se encontraron diámetros de inhibición de 1.67 ± 0.58 mm para EEPo al 96% y 2.50 ± 0.50 mm para EEPo al 70% en polenes provenientes de Eslovaquia (Kacániová et al., 2012). Estudios realizados con actividad antifúngica sobre la misma cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, empleando propóleos mostró actividad a CMI de 0.6 mg/ml (Quintero-Mora et al., 2008) en el presente estudio se halló actividad de los extractos etanólicos de polen a CMI de 32 mg/ml.

De acuerdo a las regiones de origen se encontraron diferencias entre la actividad de los EEPo de *Apis mellifera*, siendo mejor para Cundinamarca aun cuando geográficamente se ha considerado similar el altiplano Cundiboyacense. Reportes en el mundo soportan la diferencia encontrada de acuerdo a la región de origen del polen, en Brasil (Carpes et al., 2007, 2009; Carpes, 2008), Turquía (Basim et al., 2006) y Eslovaquia (Kacániová et al., 2012).

Los EEPo analizados por especie de abejas exhibieron comparativamente mejor comportamiento sobre las bacterias evaluadas para las abejas *Tetragonisca angustula* que para *Apis mellifera*; el 100% de los EEPo de *Tetragonisca angustula* inhibió SA, SE, EC, mientras que para KR la inhibición fue del 80%. Los EEPo de *Apis mellifera*, por su parte exhibieron actividad del 100% únicamente sobre la cepa de SA; sobre KR, EC y SA, hubo inhibición del 52.3%, 54.5% y 50%, respectivamente. Estos resultados podrían ser explicados por que existe un efecto de la abeja al recolectar y transformar el polen, además porque parte de las fuentes botánicas visitadas por las abejas nativas difieren de las fuentes visitadas por *Apis mellifera* (Nates-Parra, 2011).

Hubo mayor capacidad inhibitoria de los EEPo sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*; el 100% de los EEPo de *Tetragonisca angustula* y el 88,6% de los EEPo de *Apis mellifera* presentaron inhibición sobre esta cepa. Los efectos de los EEPo sobre las demás bacterias resultaron ser similares entre ellas. En investigaciones en Eslovaquia, los EEPo al 96% y al 70% evaluados sobre *Staphylococcus aureus*, fueron activos usando técnicas de difusión en agar, donde el de mejor comportamiento fue el EEPo al 96% de etanol (Kacániová et al., 2012), estos hallazgos son similares a los de este estudio. Existen reportes con resultados contrarios como los de Brasil, donde los EEPo evaluados al 60% de etanol para polenes de la región de Paraná, no presentaron

inhibición para una cepa de *Staphylococcus aureus* (Carpes et al., 2007), no se puede aseverar que el polen apícola de Colombia es mejor sobre esta bacteria, puesto que son diferentes los orígenes del polen, la técnica utilizada y la referencia de la cepa evaluada. En la región sur de Brasil, fueron valorados polenes mediante sus EEPO sobre varias cepas, entre ellas *Staphylococcus aureus*, en esta ocasión los EEPO evaluados no exhibieron capacidad inhibitoria sobre las cepas evaluadas (Carpes et al., 2009).

Por especie de abeja, los EEPO sobre *Candida albicans*, tuvieron mejor comportamiento los provenientes de polen de *Apis mellifera*, puesto que 13 de los 14 casos de inhibición correspondieron a polenes apícolas con 32 mg/ml de CMI. El EEPO de *Tetragonisca angustula* que inhibió *Candida albicans*, lo hizo a 1 mg/ml de CMI. Es posible que este resultado sea debido a que en forma natural las abejas nativas emplean formas levadurales para fermentar el polen (Portillo Carrascal & Figueroa, 2012).

Los polenes secos de Cundinamarca presentaron actividad del 13.6% sobre todas las bacterias, mientras que ninguna de las muestras de Boyacá mostró esta actividad. los EEPO en estado húmedo tuvieron 6.8% de inhibición sobre todas las bacterias, como se observa hubo una mayor actividad en los polenes secos de Cundinamarca, esto podría deberse al efecto que para alimentos de origen hortofrutícolas se encuentra más estudiado, y que hace referencia a que a pesar que el secado puede afectar algunas propiedades nutraceuticas de los alimentos, en el caso del contenido de antioxidantes en frutas, puede promover el efecto antioxidante, dependiendo del producto y del método de secado(Oliveira & Corte, 2014; Zapata, 2015). Los EEPO con menor actividad biológica, correspondieron a un EEPO seco de Cundinamarca con 32 mg/ml de CMI y un EEPO húmedo de Boyacá con 32 mg/ml de CMI sobre EC.

Los fenoles totales de los EEPO correspondieron a 24.91 ± 4.29 mg de ácido gálico/ g de extracto de polen; valor comparable al obtenido por Castro et al.(2014) (Castro, Zuluaga, Quicazán, & Pastrana, 2014), para polenes de Colombia, hidrolizados con diferentes enzimas comerciales con valores entre 30.79 ± 0.35 y 20.39 ± 0.27 mg de ácido gálico/ g de polen hidrolizado.

La muestra de EEPO provenientes de polen de pote de *T. angustula*, considerada como atípica por su alta capacidad antimicrobiana, mostró la mejor capacidad antioxidante

(0.2779 mg Trolox /g EEPo), pero los valores de sus fenoles totales (24.9 mg de ácido gálico/ g extracto polen) no estuvieron entre los más altos entre las muestras evaluadas.

Las correlaciones entre la actividad antioxidante por TEAC-DPPH y la actividad antibacteriana de los EEPo, fueron moderadamente fuertes, pero no se presentó correlación entre los fenoles totales y la capacidad antibacteriana; este resultado resulta congruente con el hallado en Brasil, en el que se encontró que los EEPo que exhibieron alta cantidad de fenoles totales (6.6 a 10.9 mg de ácido gálico/ g extracto polen), fueron los de más baja capacidad antibacteriana; es posible que la concentración de compuestos fenólicos no determine la actividad antibacteriana, pero si la naturaleza de los antioxidantes (Carpes et al., 2007).

Conclusiones

Todos los EEPo presentaron alguna capacidad inhibitoria sobre los patógenos evaluados, principalmente sobre bacterias.

Hay un mayor efecto sobre SA que sobre las demás bacterias.

La capacidad inhibitoria de los polenes de *Tetragonisca angustula* recolectados en Antioquia es superior a la de EEPo de *Apis mellifera*.

Dentro de los polenes de *Apis mellifera* se evidencia mayor capacidad de inhibición en los polenes de Cundinamarca independientemente de su estado (seco o Húmedo).

A nivel general la CMI fue de 32 mg/ml para SA, KR y EC, mientras que para SE fue de 16 mg/ml.

Solamente el 26% de los EEPo presentaron actividad antifúngica. Los EEPo de *Apis mellifera* fueron superiores a *T. angustula* en su actividad sobre *C. albicans*.

Referencias bibliográficas

Barajas-Ortiz, J. P., Martínez, T., & Rodríguez-Sandoval, E. (2010). Evaluación del efecto de la temperatura en el secado de polen apícola procedente de dos zonas de Cundinamarca. *DYNA*, 78(165), 48–57.

-
- Barbosa, Sandra. Silvestre, Armando. Estevinho, Simoes. Estevinho, M. (2006). Composition and antimicrobial properties of bee pollen.pdf. *International Journal of Agricultural Research*, 1(5), 471–479.
- Basim, E., Basim, H., & Özcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77, 992–996. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*, 22, 25–30.
- Brasil. (2001). Instrucao Normativa n. 3 de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade, de Apitoxina, de Cera de Abelha, de Geléia Real, de Geléia Real Liofilizada, de Pólen Apícola, de Própolis, de Extrato de Própolis. *Ministerio Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento*.
- Carpes, S. T. (2008). UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SOLANGE TERESINHA CARPES ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO PÓLEN APÍCOLA DE *Apis mellifera* L. DA REGIÃO SUL DO BRASIL SOLANGE TERESINHA CARPES ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS, 249.
- Carpes, S. T., Begnini, R., Alencar, S. M. de, & Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência E Agrotecnologia*, 31(6), 1818–1825. doi:10.1590/S1413-70542007000600032
- Carpes, S. T., Ribeiro, I. S., Rosalen, P. L., de Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Caracterização Do Potencial Antimicrobiano Dos Extratos De Pólen Apícola Da Região Sul Do Brasil. *Alimentos E Nutrição Araraquara*, 20(2), 271–277. Retrieved from <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/1057>
- Castro, L., Zuluaga, C., Quicazán, M., & Pastrana, Y. (2014). Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. In *Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID* (pp. 1–7). Colombia.
- Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*, 14(9), 1–42.
- Gamboa, M. V., & Figueroa, J. (2009). Poder antibacterial de mieles de *Tetragonisca angustula*, valorada por concentración mínima inhibitoria. *Acta Biológica Colombiana*, 14(2), 97–106.
- Grosso, G. S., Figueredo, C. R. P., & González, E. F. V. (2008). Origen botánico propiedades fisicoquimicas microbiológicas del polen colectado en algunas zonas apícolas de la Campiña de Boyacá. *V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos Barcelona*, 1–7. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Origen+botánico+pr>

- opiedades+fisicoquimicas+microbiológicas+del+polen+colectado+en+algunas+zona s+apícolas+de+la+campaña+de+boyacá#0
- Guiomar Nates-Parra. (2009). Foro Abejas silvestres y polinización. *Manejo Integrado de Plagas Y Agroecología (Costa Rica)*, N o . 7 5(Roubik 1995), 7–20.
- Kacániová, M., Vuković, N., Chlebo, R., Haščík, P., Rovná, K., Cubon, J., ... Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Sciences*, 64(3), 927–934. doi:10.2298/ABS1203927K
- Kroyer, G., & Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 171–174. doi:10.1016/S1466-8564(01)00039-X
- Martinez. (2006). Diagnostico de la Actividad Apícola y de la Crianza de Abejas en Colombia. *Instituto Interamericano de Cooperacion Para La Agricultura IICA*.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1096–1101. doi:10.1016/j.fct.2011.01.020
- Nates-Parra, G. S. (2011). *Guía Ilustrada de Polen y Plantas Nativas Visitadas por Abejas (Cundinamarca, Boyacá, Sucre, Atlántico y Sierra Nevada de Santa Marta. Colombia)*.
- Oliveira, W. P., & Corte, D. F. (2014). Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L. . doi:10.1016/j.jksues.2014.04.004
- Portillo Carrascal, C., & Figueroa, J. (2012). Comissão Científica. In *Anais do VI Seminário Paranaense de Meliponicultura*. (pp. 21–31). Maringá. doi:www.dzo.uem.br/melipo6
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayosso, P., López-Martínez, R., Soto-Zárate, C. I., ... Cruz-Sánchez, T. A. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 22–26. Retrieved from <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/022026.pdf>
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from URL <http://www.R-project.org/>.
- Sánchez Alarcón, O. A. (2014). Sistemas de Producción y Economía Apícola en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Caso de Tres Organizaciones de Productores. *Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.*, 144.

Schmidt, E. M., Stock, D., Chada, F. J. G., Finger, D., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., ... Torres, Y. R. (2014). A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *BioMed Research International*, 2014, 257617. doi:10.1155/2014/257617

Silva, T. M. S., Camara, C. A., da Silva Lins, A. C., Maria Barbosa-Filho, J., da Silva, E. M. S., Freitas, B. M., & de Assis Ribeiro dos Santos, F. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 507–511. doi:10.1016/j.jfca.2005.12.011

Silva, T. M. S., Camara, C. a., Lins, A. C. S., Agra, M. D. F., Silva, E. M. S., Reis, I. T., & Freitas, B. M. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 81, 173–178. doi:10.1590/S0001-37652009000200003

Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1), 152–178.

Zapata, K. (2015). Efecto Térmico del Secado por Aspersión sobre los Metabolitos Antioxidantes de la Curuba Larga (*Passiflora mollissima* baley)., 26, 77–84. doi:10.4067/S0718-07642015000100009

3. Estimación de la acción de extractos etanólicos de polenes de *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula* sobre phi x174 y *Giardia duodenalis*

Resumen

El polen colectado por las abejas, a partir de las plantas, contiene néctar y sustancias de las glándulas salivares. El polen apícola (colectado por *Apis mellifera*) y el polen de pote (colectado por abejas nativas sin aguijón), han sido valorados por sus composición, sus características nutricionales y en menor proporción por su acción terapéutica tanto *in vivo* como *in vitro*. El objetivo de este estudio fue estimar el efecto sobre el bacteriófago Phi X174 (ATCC 13706-B1) usando como célula huésped *Escherichia coli* (ATCC 700078) y valorar la capacidad antiparasitaria *in vitro* de los extractos etanólicos de polen apícola sobre los trofozoítos del parásito intestinal *Giardia duodenalis* cepa ATCC- 50803 WBC6. Se evaluaron 53 extractos etanólicos de polen (EEPo), 22 de muestras de polen apícola en estado seco, 22 húmedo, provenientes de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, y nueve muestras de polen de pote de *Tetragonisca angustula* proveniente del departamento de Antioquia. Se estandarizó la obtención de los extractos etanólicos de polen EEPo, y la concentración de sólidos solubles totales (SST) expresados en mg/ml para ser usado a concentraciones de 8 y 4 mg/ml, para los ensayos *in vitro*. Se valoró la actividad sobre el bacteriófago mediante el método de plaqueo, teniendo como base la metodología descrita por Sambrook, Fritsch, & Maniatis y la norma ISO 1075-2. Se estimó el Porcentaje de inhibición de los EEPo sobre las partículas fágicas por cuantificación de las unidades formadoras de placa por mililitro. Para la actividad antiparasitaria se emplearon trofozoítos viables de *Giardia duodenalis* en medio modificado Diamond's TYI-S-33 donde se midió el efecto antiparasitario de los EEPo. Se estimó la actividad antiparasitaria de los EEPo, por

mortalidad de los trofozoítos. Los EEPo evaluados a 4mg/ml y 8 mg/ml de SST, tuvieron efecto sobre los bacteriófagos y sobre los trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

Palabras clave: Bacteriófagos, *E. coli*, antiparasitario, trofozoítos, polen apícola, polen de pote.

Introducción

El polen colectado por abejas, es un producto generado a partir de la mezcla del polen producido por las plantas, el néctar de la flor y sustancias generadas en la saliva de las abejas recolectoras del mismo, este producto representa la principal fuente proteica usada por las abejas para el desarrollo de sus colmenas (Bogdanov, 2004; Vit & Santiago, 2008). Existen diferentes factores que intervienen directamente en la composición del polen, entre ellos se encuentra el origen botánico, la ubicación geográfica y las condiciones climáticas presentes durante el desarrollo de la colmena (Sá-otero, Marcial-bugarín, Armesto-baztán, & Díaz-losada, 2002).

El polen apícola y el polen de pote de abejas nativas sin aguijón, son generados en la apicultura y la meliponicultura de Colombia. Se reconocen 17 especies de abejas nativas criadas por campesinos e indígenas, entre ellas, *Tetragonisca angustula*, en especial para producción de miel (G. Nates-Parra & González, 2000). El polen de pote de *Tetragonisca angustula*, no es comercializado en el país de forma habitual, sino como producto terapéutico de uso tradicional (Cepeda Granados & Nates-Parra, 2009). El polen de pote y el polen apícola, han sido poco estudiados en el país en lo que respecta a su actividad biológica.

En el ámbito internacional, se sabe que el polen apícola presenta una amplia gama de propiedades terapéuticas, soportado por investigaciones realizadas en diferentes países y regiones, el consumo de polen ha demostrado potencial uso como hepatoprotector (Yildiz et al., 2013), como terapéutico en algunas enfermedades respiratorias (Linskens & Jorde, 1997; Yildiz et al., 2013) y ciertas alergias gracias a la acción inmunomoduladora y antiinflamatoria de los flavonoides presentes en el polen (Maruyama, Sakamoto, Araki, & Hara, 2010; Medeiros et al., 2008). Se ha evidenciado *in vitro* que posee actividad antimicrobiana sobre hongos y bacterias (Carpes, Ribeiro, Rosalen, de Alencar, & Masson, 2009; Kacániová et al., 2012).

VALORACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN DE *Apis mellifera* Y DE *Tetragonisca angustula*, EN BUSCA DE POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS.

El polen de pote, cuenta con estudios que describen algunas de sus características y comportamientos biológicos en la colonia como, el valor nutritivo y la digestibilidad aparente para algunas especies como *Scaptotrigona postica*, y los requerimientos proteicos, como parte de la función que cumple en la colonia (Do Carmo Zerbo, Lúcia, Silva de Moraes, & Brochetto-Braga, 2001; Guilherme, Da, & Errão, 2000; Marques-Souza, Absy, & Kerr, 2007). En Colombia se han estudiado las levaduras presentes en el polen de pote de algunos géneros de abejas nativas como, *Tetragonisca angustula*, *Plebeia* sp, *Scaptotrigona* sp y *Paratrigona* sp (Portillo Carrascal & Figueroa, 2012); de los posibles usos terapéuticos se ha indagado aún menos, sin embargo, se sabe que las abejas nativas comparten gran cantidad de fuentes polínicas con las abejas *Apis mellifera* (G. S. Nates-Parra, 2011), por lo que se espera que el polen de pote posea propiedades bioactivas semejantes a las del polen de *Apis mellifera*.

Los productos de la colmena como la miel cuentan con estudios para sus efectos antibacterianos (Corby-Harris, Maes, & Anderson, 2014; Kacániová et al., 2012; Vit & Pedro, Silvia R, 2013); también existen reportes en propóleos para antibacterianos, antifúngicos (Basim, Basim, & Özcan, 2006; Lotfy, 2006; Özcan, 1999; Quintero-Mora et al., 2008), antivirales (Amoros, Sauvager, Girre, & Cormier, 1992; Maskova, Albert, & Simuth, 1990) y antiparasitarios (Da Silva Cunha et al., 2004; Dantas, Salomão, Barbosa, & De Castro, 2006; Lustosa, Galindo, Nunes, Randau, & Rolim Neto, 2008; Pontin et al., 2008). En Colombia, han sido valoradas las actividades biológicas de los productos de las abejas presentes en propóleos (Bastos, Guzman, Figueroa, Tello, & Scoaris, 2011; Martínez & Galán, 2009), en mieles florales y en mielato de roble (Figueroa Ramírez et al., 2013; Gamboa & Figueroa, 2009; Gamboa-Abril, Díaz-Moreno, & Figueroa-Ramírez, 2012).

La búsqueda del valor terapéutico en polen para el país es el objeto de este estudio, el cual busca estimar la acción de los extractos etanólicos de polen, mediante un modelo de plaqueo de bacteriófagos empleando Phi X174 y valorar la capacidad antiparasitaria *in vitro* sobre los trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

Materiales y métodos

3.3.1 Muestras de polen.

Para la valoración del efecto sobre el bacteriófago, fueron analizadas 44 muestras de polen apícola en estado fresco y después del secado; 12 provenían del departamento de Cundinamarca y 10 de Boyacá. Para pólenes de *Tetragonisca angustula* fueron analizadas 9 muestras de polen de pote provenientes de colmenas del departamento de Antioquia. El secado de polen de *Apis mellifera* correspondió a procesos comerciales realizados por los apicultores a temperaturas entre 35 a 45°C de acuerdo a lo reportado para Colombia (Barajas-Ortiz, Martínez, & Rodríguez-Sandoval, 2010). En el caso de la valoración de la actividad antiparasitaria fueron analizadas 16 muestras de polen apícola en estado fresco y después del secado; ocho provenían del departamento de Cundinamarca y ocho de Boyacá, para un total de 32 análisis.

3.3.2 Preparación de los extractos etanólicos de polen (EEPo).

Los EEPo se prepararon utilizando el protocolo de Carpes (Carpes, Begnini, Alencar, & Masson, 2007) modificado de la siguiente manera: la preparación del polen apícola fresco, seco y de pote se realizó a razón de 2g de polen por 15ml de etanol al 70%. Para corregir la cantidad en el caso del polen apícola fresco, se tuvo en cuenta una pérdida del 18% de humedad, la cual es la más alta reportada para polen apícola durante el secado en Colombia (Grosso, Figueredo, & González, 2008). Así, las mezclas se llevaron a baño serológico a 70°C por 30 minutos con agitación cada 10 minutos. Luego, fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante, el cual corresponde a los EEPo madre utilizados en el estudio. Para este estudio se valoraron los sólidos solubles totales, los cuales se estandarizaron de la siguiente manera: un mililitro de EEPo madre fue sometido a deshidratación para determinar la concentración de Sólidos Solubles Totales (SST) para lo cual se empleó el medidor de humedad PRECISA® XM 120, el resultado fue expresado en miligramos por mililitro (mg/ml).

La concentración de SST utilizada para valorar el efecto sobre el bacteriófago fue de 8 y 4 mg/ml, para hallar estos valores fueron tenidos en cuenta los resultados en este mismo estudio para actividad antibacteriana, en donde se observó que los EEPo tienen CMI de 16 mg/ml de SST sobre *Escherichia coli*, por lo que su efecto sobre PhiX174 se ajustó a

rangos de valoración del 50% y 75% por debajo de la CMI ejercida sobre la bacteria huésped. Para la valoración antiparasitaria se efectuaron ensayos previos que permitieron determinar como rango adecuado para el estudio de 8 y 4 mg/ml.

3.3.3 Actividad sobre Phi X174.

Para valorar el efecto de los EEPO se emplearon cultivos del bacteriófago Phi X174 (ATCC 13706-B1) sobre la célula huésped *Escherichia coli* WG5. Se empleó la técnica descrita para plaqueo de bacteriófagos (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Los bancos de reserva del bacteriófago Phi X174 y de la bacteria hospedera *Escherichia coli* WG5 se hicieron siguiendo la metodología reportada en la norma ISO/DIS 1075-2 (*ISO/DIS 10705-2. Water Quality: Detection and enumeration of Bacteriophages*, 1999). Se utilizó caldo según Luria Bertani (LB), agar LB semisólido (0.7%) con adición de 300µl de CaCl₂ por cada 50 ml del medio y agar LB sólido preparado según la casa comercial (*Luria Bertani Agar, Scharlau*). Se obtuvieron diluciones del Bacteriófago Phi X174 en solución salina peptonada (peptona 1 g, NaCl 8.5 g. Agua destilada 1000 ml) según recomendación ISO (*ISO/DIS 10705-2. Water Quality: Detection and enumeration of Bacteriophages*, 1999). Se realizó una titulación del bacteriófago y se utilizó en concentración de 10⁷ Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml). El inóculo bacteriano de la cepa de *E. coli* WG5 fue ajustado a una concentración de 10⁸ ufc/ml en caldo LB (50 ml) con una incubación previa de 2.5 horas a 37°C.

El procedimiento para realizar el ensayo sobre el bacteriófago de los EEPO mediante el plaqueo de Phi X174, consistió en mezclar en un tubo de ensayo 500 µl de la dilución 10⁷ de Bacteriófago Phi X174, 500µl del inóculo de la cepa *E. coli* WG5 y 500µl del EEPO ajustado a la concentración de SST a evaluar; a esta mezcla se agregaron 2.5ml de agar LB semisólido, la solidificación del medio fue evitada conservando los tubos con LB semisólido en baño serológico a 50°C. Una vez agitada la mezcla total con vórtex, se dispensó sobre el agar LB, se dejó solidificar y se llevó a incubación a 37°C durante 18h; transcurrido el tiempo de incubación se contaron las placas de lisis presentes como número de UFP/ml.

Se efectuaron controles de crecimiento de la cepa *E. coli* WG5, control del título del Bacteriófago Phi X174 y control del título del Bacteriófago Phi X174 en presencia de Etanol al 70%. Tanto los controles como las pruebas por extracto se realizaron por triplicado.

3.3.4 Actividad antiparasitaria.

La actividad antiparasitaria de los extractos etanólicos de polen (EEPo) fue evaluada usando el parásito *Giardia duodenalis* cepa ATCC- 50803 WBC6 y EEPo en concentraciones de 8 y 4 mg/ml. El parásito se utilizó en estado de trofozoíto, para la obtención, mantenimiento y conteo de los trofozoítos fue usada la metodología reportada por Alvarado (Alvarado Mora, 2009), en la que inicialmente se obtuvieron trofozoítos viables de *Giardia duodenalis*, mediante la adición de 3 ml de la cepa WBC6 al medio modificado Diamond's TYI-S-33 (Keister, 1983), hasta completar el volumen total en un tubo de ensayo; esta mezcla, se incubó a 37°C durante 48 horas, observando la formación de una monocapa sobre el vidrio del tubo madre en microscopio invertido. Se estimó el número promedio de trofozoítos vivos del tubo madre, mediante el conteo en microscopio corriente a 40X sobre hemocitómetro Neubauer y el uso de la Fórmula 1, luego de haber refrigerado el tubo por 5 minutos a 4°C. Finalmente, se estimó el volumen de solución del tubo madre requerido para adicionar una población de 100.000 trofozoítos viables de *Giardia duodenalis* a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml para realizar los ensayos antiparasitarios de los EEPo.

Fórmula 1- Cálculo del número total de parásitos en el tubo madre

Total = Conteo hemocitómetro Neubauer * Volumen de solución del tubo madre * 10000.

Para valorar la acción antiparasitaria, se mezcló el volumen equivalente a los 100.000 trofozoítos viables, el volumen requerido de EEPo en cada concentración de SST evaluados, se completó con medio Diamond's TYI-S-33, hasta un volumen de 1.5 ml por tubo. Se incluyeron tres controles, el primero de crecimiento del parásito con 100.000 trofozoítos viables y medio Diamond's TYI-S-33 hasta completar 1.5 ml. El segundo control consistió en valorar el efecto del etanol al 70%, sometiendo 100.000 trofozoítos en medio Diamond's TYI-S-33 a la presencia del etanol. El tercero un control con metronidazol comercial, obtenido de Laboratorios BAXTER S.A., a concentración de 5 mg/ml (0.94 mg para el ensayo a 8 mg/ml y 0.47 mg para el ensayo a 4 mg/ml).

Todos los ensayos y los controles se realizaron por triplicado. Al cabo de 24 horas de incubación a 37°C los trofozoítos fueron desprendidos de los tubos, mezclados y se estimó el número de trofozoítos vivos por conteo en hemocitómetro Neubauer; se realizó el cálculo

final de los trofozoítos viables presentes en cada tubo y se calculó el número de trofozoítos muertos debido al efecto de los EEPo, para su posterior análisis.

3.3.5 Análisis estadístico

Para la actividad sobre Phi X174, se utilizó el Software especializado Statgraphics Centurion XV, aplicando una prueba T-student pareada para evaluar la diferencia estadística entre los controles, es decir, entre el efecto del etanol al 70% sobre el plaqueo del bacteriófago respecto al control de plaqueo del bacteriófago. Se evaluó el efecto de los EEPo sobre el Phi X174 usando un Modelo Lineal Generalizado (GLM), en donde la variable dependiente es el porcentaje de efectividad del EEPo sobre el bacteriófago Phi X174 y los factores tomados en cuenta fueron el departamento, para *Apis mellifera* Cundinamarca y Boyacá, y para *Tetragonisca angustula* de Antioquia, el Tipo de polen (apícola Seco, apícola húmedo y polen de pote), la especie *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula* y la concentración en SST de los EEPo 4 y 8 mg/ml, además se analizó la variable origen resultante del efecto combinado entre departamento y tipo CH: Cundinamarca húmedo; CS: Cundinamarca seco; BH: Boyacá húmedo; BS: Boyacá seco, N: Antioquia pote. Para el análisis de la actividad antiparasitaria se tuvieron en cuenta la variable dependiente Trofozoítos muertos, los factores tomados en cuenta fueron el departamento Cundinamarca y Boyacá; Tipo de polen apícola Seco y apícola húmedo y concentración en SST de los EEPo 4 y 8 mg/ml.

Resultados

3.4.1 Actividad sobre Phi X174

Se evaluó la diferencia estadística entre el control del plaqueo del bacteriófago Phi X174 y el control de plaqueo del bacteriófago Phi X174 en presencia de etanol al 70%; con un estadístico t calculado = -2.1447 y un valor $p=0.0331$, se demostró que los controles son estadísticamente diferentes, con Medias muestrales = 18.0 UFP/ml (Bacteriófago) y 19.0 UFP/ml (Bacteriófago + Etanol).

Las 53 muestras evaluadas para la actividad sobre el bacteriófago aplicando el modelo GLM a la variable dependiente Y=Porcentaje de inhibición, y tomando como factor de evaluación las concentraciones de SST empleadas (4 y 8 mg/ml), mostraron diferencias

significativas con un valor $p=0,1119$ entre los comportamientos de los EEPo, con valores promedio de inhibición de $32\% \pm 19.1\%$ para 4 mg/ml y $39.6\% \pm 24.1\%$ para 8 mg/ml.

Se determinó que no existen diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición de los EEPo sobre el bacteriófago, debida a los tipos de polen apícola seco, apícola húmedo y de pote, con un $p=0.0331$. Se observa en la Figura 3-1 que la tendencia favorece a los polenes secos.

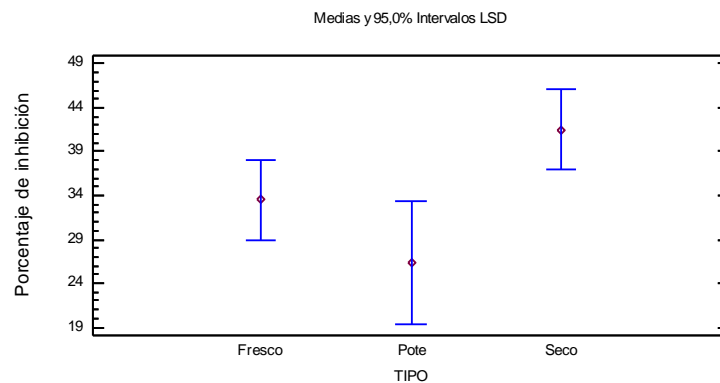


Figura 3-1 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPo por Tipo de EEPo.

El comportamiento por departamento, para *A. mellifera* Cundinamarca y Boyacá y para *T. angustula* Antioquía, fue estadísticamente diferente $p=0.0501$, con una tendencia de mayor Porcentaje de inhibición para los EEPo provenientes de polen de Boyacá como se observa en la .

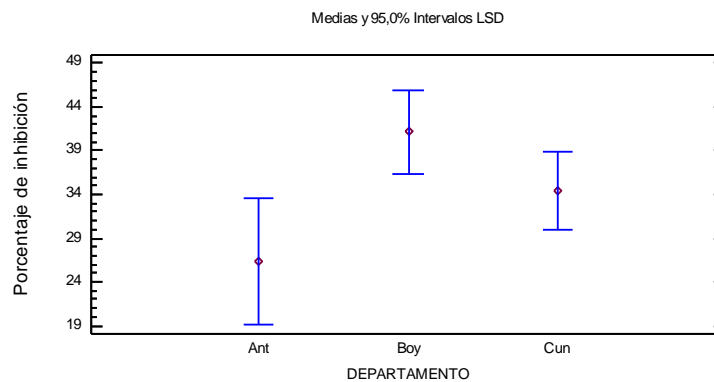


Figura 3-2 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPO por Departamento.

Al comparar los Porcentajes de inhibición por especie de abeja con un $p=0.0494$ no existen diferencias significativas, con una tendencia de mejor inhibición por parte de los EEPO de *Apis mellifera*, Figura 3-3.

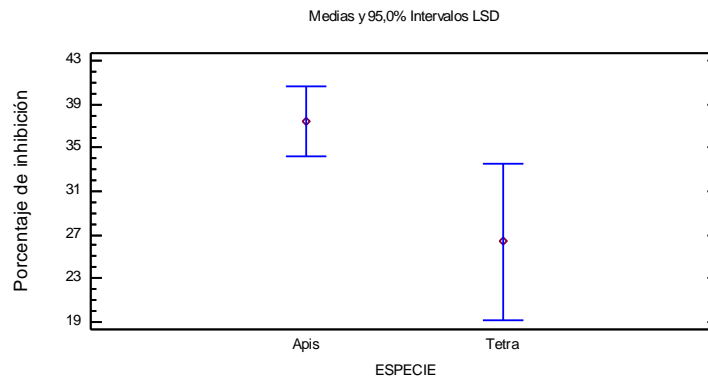


Figura 3-3 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPO por Especie de abeja.

Analizando los EEPO por la variable origen, entendida como CH: Cundinamarca húmedo, CS: Cundinamarca seco, BH: Boyacá húmedo, BS: Boyacá seco y N: Antioquia Nativas, se determinó con $p=0.0622$ que existen diferencias estadísticas significativas, se observa una tendencia a que los polenes secos de Boyacá exhiban mejor inhibición, .

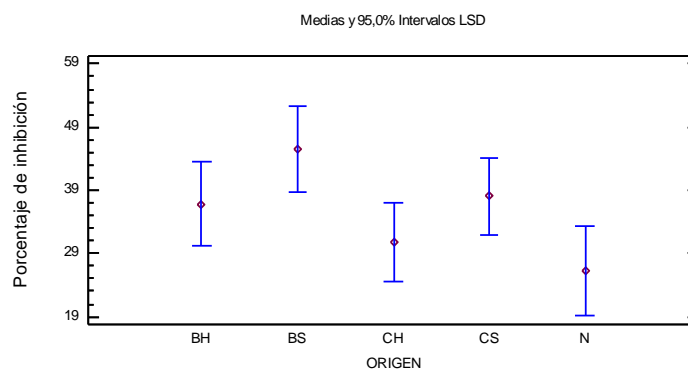


Figura 3-4 Comportamiento de los Porcentajes de inhibición de los EEPO por Origen.

Actividad antiparasitaria

Los datos de las 32 muestras de polen apícola húmedo y seco evaluadas, analizados con un modelo GLM a la variable dependiente Número de trofozoítos muertos, no mostró

diferencias entre los comportamientos de los EEPo por concentraciones de SST evaluadas ($p < 1\%$).

Se determinó que existen diferencias estadísticas entre el Número de trofozoítos muertos por tipos de polen, apícola seco y apícola húmedo, con un $p=0.6831$. Se observa en la que la tendencia favorece al polen apícola húmedo.

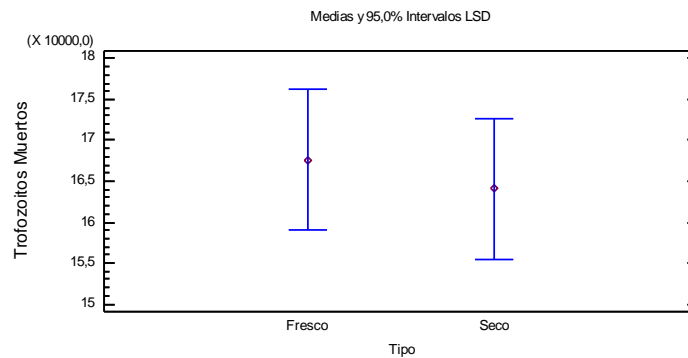


Figura 3-5. Comportamiento de los Trofozoítos muertos por Tipo de EEPo.

El comportamiento por departamento (Cundinamarca y Boyacá) fue estadísticamente diferente $p=0.9011$, con mayor número de Trofozoítos muertos por efecto de los EEPo provenientes de polen de Cundinamarca, es decir una mejor acción antiparasitaria como se observa en la .

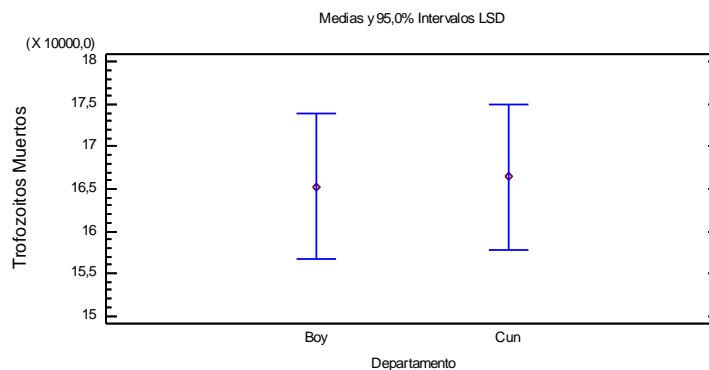


Figura 3-6 Comportamiento de los Trofozoítos muertos por Departamento de procedencia de los EEPo.

Analizando los EEPo por la variable origen, entendida como CH: Cundinamarca húmedo, CS: Cundinamarca seco, BH: Boyacá húmedo y BS: Boyacá seco, se determinó con $p=0.5622$ que existen diferencias estadísticas significativas y como se observa en la

existe una tendencia a que los EEPo provenientes de polen húmedo de Boyacá (BH), se comporten mejor, con mayor número de trofozoítos muertos.

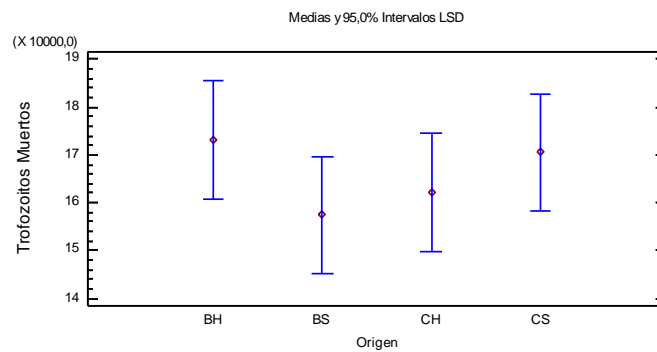


Figura 3-7 Comportamiento de los Trofozoítos muertos por Origen de los EEPo.

Discusión

La estandarización de sólidos solubles totales de los extractos de polen para ser empleados en las pruebas, son de gran importancia debido a que permite comparar resultados obtenidos por otros autores.

Todos los EEPo evaluados en este estudio tuvieron efecto sobre el bacteriófago Phi X174. No se encontraron reportes científicos previos que evalúen el polen apícola ni el polen de pote sobre bacteriófagos, ni sobre otros virus. El hallazgo de la presente investigación podría ser contrastado con algunos reportes con técnicas similares en extractos etanólicos de propóleos, puesto que ha sido el producto de la colmena más ampliamente investigado por sus propiedades bioactivas. Se ha reportado su acción sobre el ciclo lítico del bacteriófago lambda evaluado por el método de plaqueo y por la rata de síntesis del DNA,

dichos autores sugieren la estandarización del uso de bacteriófagos para evaluar la actividad antiviral de los propóleos (Maskova et al., 1990), debido a que se ha evidenciado efecto antiviral para herpes simplex tipo 1, virus de la influenza aviar (Amoros et al., 1992; Kujumgiev et al., 1999) entre otros virus. En Colombia, se reportó que los extractos etanólicos de propóleos poseen actividad sobre bacteriófago lambda a concentración de 1 mg/ml de SST (Talero Urrego, 2014).

El porcentaje de inhibición de los EEPo sobre el bacteriófago Phi X174, tomando como factor el tipo de polen, apícola seco y apícola húmedo, no resultó estadísticamente diferente, lo que muestra que posiblemente el efecto de secado no deteriora los componentes atribuibles a la actividad sobre el bacteriófago.

La diferencia hallada entre la actividad sobre Phi X174 de polenes para los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, sugiere la influencia que ejerce los elementos botánicos en las dos áreas de muestreo.

Los porcentajes de inhibición sobre Phi X174 por EEPo de las especie de abeja no mostraron diferencias significativas; el comparativo es referido a *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula*, por lo que sería de interés explorar que ocurre en el caso de otras especies de abejas.

En la actividad antiparasitaria, no se halló diferencias entre las dos concentraciones utilizadas (4 y 8 mg/ml de SST); sería de interés poder ajustar esta técnica, incluyendo un mayor número de concentraciones que permitan clasificar los EEPo por su actividad y de esta forma establecer un valor de concentración efectiva media (CE50). El uso del modelo de valoración de actividad antiparasitaria empleando trofozoítos de *Giardia duodenalis*, ya había sido utilizado para determinar actividad sobre los propóleos (Quintero & Sierra, 2011).

El polen apícola húmedo ejerció mayor efecto antiparasitario, por lo que es posible que algunos de los compuestos a los que se atribuirían el efecto, sean de carácter lábil.

Los EEPo de Cundinamarca exhiben mejor comportamiento antiparasitario que los de Boyacá, lo que puede estar asociado por el efecto del origen botánico presentes en las diferentes regiones.

Conclusiones

Es importante resaltar que este estudio es el primer ensayo que se realiza en polen colectado por las abejas, para valorar la actividad sobre el bacteriófago Phi X174 y la actividad antiparasitaria empleando el modelo de *Giardia duodenalis*. Se ajustó el método de extracción de principios activos, la valoración de los sólidos solubles totales, las concentraciones empleadas en las técnicas.

Los extractos etanólicos de polen apícola poseen actividad sobre el bacteriófago Phi X174 y sobre *Giardia duodenalis* WBC6.

Los extractos etanólicos de polen de pote de *Tetragonisca angustula* poseen actividad sobre el bacteriófago Phi X174.

Los EEPO exhiben actividad variable sobre el bacteriófago, según su departamento de origen, tipo de polen y especie de abeja de procedencia.

Los EEPO con mejor actividad sobre PhiX174 son los EEPO provenientes de polen apícola en estado seco.

Los EEPO evaluados con mejor comportamiento antiparasitario sobre *Giardia duodenalis* corresponden a los EEPO provenientes de polen apícola en estado húmedo.

Las técnicas usadas para las valoraciones de la actividad antiparasitaria y sobre el bacteriófago, exhibieron resultados útiles como punto de partida para el ajuste y la validación posterior, que permita obtener una herramienta de valoración de los bioactivos del polen.

Referencias bibliográficas

Alvarado Mora, M. E. (2009). *Estudio de la expresión de calmodulina y detección de posibles cambios en transducción de señales durante los dos procesos de diferenciación del parásito Giardia intestinalis*. Universidad Nacional de Colombia.

Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., & Cormier, M. (1992). In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 23, 231–240.

-
- Barajas-Ortiz, J. P., Martínez, T., & Rodríguez-Sandoval, E. (2010). Evaluación del efecto de la temperatura en el secado de polen apícola procedente de dos zonas de Cundinamarca. *DYNA*, 78(165), 48–57.
- Basim, E., Basim, H., & Özcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77, 992–996. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027
- Bastos, E., Guzman, D., Figueroa, J., Tello, J., & Scoaris, D. O. (2011, March 10). Caracterización Antimicrobiana Y Fisico-Quimica De Muestras De Propoleo Proveniente De La Región Andina Colombiana. *Acta Biológica Colombiana*. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/10346/28146>
- Bogdanov, S. (2004). Quality and standards of of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38, 334–341.
- Carpes, S. T., Begnini, R., Alencar, S. M. de, & Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência E Agrotecnologia*, 31(6), 1818–1825. doi:10.1590/S1413-70542007000600032
- Carpes, S. T., Ribeiro, I. S., Rosalen, P. L., de Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Caracterização Do Potencial Antimicrobiano Dos Extratos De Pólen Apícola Da Região Sul Do Brasil. *Alimentos E Nutrição Araraquara*, 20(2), 271–277. Retrieved from <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/1057>
- Cepeda Granados, M., & Nates-Parra, G. (2009). *Comercialización de los productos de la Meliponicultura en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia - Bogotá.
- Corby-Harris, V., Maes, P., & Anderson, K. E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PloS One*, 9(4), e95056. doi:10.1371/journal.pone.0095056
- Da Silva Cunha, I. B., Salomao, K., Shimizu, M., Bankova, V. S., Custodio, A. R., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2004). Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(5), 602–604. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15891772>
- Dantas, A. P., Salomão, K., Barbosa, H. S., & De Castro, S. L. (2006). The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(2), 207–211. doi:10.1590/S0074-02762006000200013

- Do Carmo Zerbo, A., Lúcia, R., Silva de Moraes, M., & Brochetto-Braga, M. R. (2001). Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae): Midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 129(1), 139–147. doi:10.1016/S1096-4959(01)00324-4
- Figuroa Ramírez, J., Gamboa, V., Sánchez Alarcón, O. A., Monserrate Rojas, Y. P., Hernández, D., Talero Urrego, C., ... Gamez. (2013). Memorias V Seminario internacional de Apicultura Africanizada y Jornada de divulgación de Resultados de Proyectos financiados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. In J. Figuroa Ramírez, O. A. Sanchez Alarcón, & Y. P. Monserrate Rojas (Eds.), *Cualificación microbiológica de productos de la colmena para generación de productos de valor agregado* (pp. 89–98). Bogotá-Colombia: Universidad Nacional de COlombia Sede Bogotá.
- Gamboa, M. V., & Figuroa, J. (2009). Poder antibacterial de mieles de *Tetragonisca angustula*, valorada por concentración mínima inhibitoria. *Acta Biológica Colombiana*, 14(2), 97–106.
- Gamboa-Abril, V., Díaz-Moreno, C., & Figuroa-Ramírez, J. (2012). TIPIFICACION DE MIELES DE MIELATO DE ROBLE (*QUERCUS HUMBOLDTTI*) DE BOYACA Y SANTANDER. *Vitae*, 19(1), S382–S384. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914120>
- Grosso, G. S., Figueredo, C. R. P., & González, E. F. V. (2008). Origen botánico propiedades fisicoquímicas microbiológicas del polen colectado en algunas zonas apícolas de la Campiña de Boyacá. *V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos Barcelona*, 1–7. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Origen+botánico+propiedades+fisicoquímicas+microbiológicas+del+polen+colectado+en+algunas+zonas+apícolas+de+la+campiña+de+boyacá#0>
- Guilherme, P., Da, F. E., & Errão, J. E. S. (2000). Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee. *Apidologie*, 31, 39–45.
- ISO/DIS 10705-2. *Water Quality: Detection and enumeration of Bacteriophages*. (1999). *International Standard Organization*.
- Kacániová, M., Vuković, N., Chlebo, R., Haščík, P., Rovná, K., Cubon, J., ... Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Sciences*, 64(3), 927–934. doi:10.2298/ABS1203927K
- Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine*

and Hygiene, 77(4), 487–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6636276>

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363838>

Linskens, H. E., & Jorde, W. (1997). Pollen as Food and Medicine - A Review. *Economic Botany*, 51(March 1995), 78–86.

Lotfy, M. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7(1), 22–31.

Lustosa, S. R., Galindo, A. B., Nunes, L. C. C., Randau, K. P., & Rolim Neto, P. J. (2008). Própolis: Atualizações sobre a química e a farmacologia. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(3), 447–454. doi:10.1590/S0102-695X2008000300020

Marques-Souza, A. C., Absy, M. L., & Kerr, W. E. (2007). Pollen harvest features of the Central Amazonian bee *Scaptotrigona fulvicutis* Moure 1964 (Apidae: Meliponinae), in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 21(1), 11–20. doi:10.1590/S0102-33062007000100002

Martínez, J. P., & Galán. (2009). Caracterización fisico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. *Universidad Nacional De Colombia Sede Medellín Facultad De Ciencias Agropecuarias*.

Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., & Hara, H. (2010). Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 30. doi:10.1186/1472-6882-10-30

Maskova, L., Albert, S., & Simuth, J. (1990). An inhibition of lytic development of lambda prophage in the lysogenic bacteria *E. coli* by an aqueous extract of propolis. *Farmaceuticky Obzor*, 59, 491–495.

Medeiros, K. C. P., Figueiredo, C. a V, Figueiredo, T. B., Freire, K. R. L., Santos, F. a R., Alcantara-Neves, N. M., ... Piuvezam, M. R. (2008). Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 41–46. doi:10.1016/j.jep.2008.05.036

Nates-Parra, G., & González, V. H. (2000). Las Abejas Silvestres De Colombia: Por Qué Y Cómo Conservarlas. *Acta Biológica Colombiana*, 5(2), 33.

- Nates-Parra, G. S. (2011). *Guía Ilustrada de Polen y Plantas Nativas Visitadas por Abejas (Cundinamarca, Boyacá, Sucre, Atlántico y Sierra Nevada de Santa Marta. Colombia)*.
- Özcan, M. (1999). Antifungal properties of propolis. *Grasas Y Aceites*, 50, 395–398. doi:10.3989/gya.1999.v50.i5.685
- Pontin, K., Da Silva Filho, A. A., Santos, F. F., Silva, M. L. A. E., Cunha, W. R., Nanayakkara, N. P. D., ... de Albuquerque, S. (2008). In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research*, 103(3), 487–92. doi:10.1007/s00436-008-0970-z
- Portillo Carrascal, C., & Figueroa, J. (2012). Comissão Científica. In *Anais do VI Seminário Paranaense de Meliponicultura*. (pp. 21–31). Maringá. doi:www.dzo.uem.br/melipo6
- Quintero, D., & Sierra, C. (2011). VALORACION DE LOS EFECTOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO DE *Apis mellifera* y ABEJAS NATIVAS FRENTE A G. intestinalis. .
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayosso, P., López-Martínez, R., Soto-Zárate, C. I., ... Cruz-Sánchez, T. A. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 22–26. Retrieved from <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/022026.pdf>
- Sambrook, J., Fritsch, E. ., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (C. S. L. Harbor, Ed.). N.Y: Cold Spring Harbor.
- Sá-otero, M. P. De, Marcial-bugarín, S., Armesto-baztán, S., & Díaz-losada, E. (2002). Método de determinación del origen geográfico del polen apícola comercial. *Lazaroa*, 23, 25–34.
- Talero Urrego, C. A. (2014). *Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (Apis mellifera) en tres áreas geográficas de Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional de COlombia Sede Bogotá. doi:http://www.bdigital.unal.edu.co/39430/1/cesaraugustotalerourrego.2014.pdf
- Vit, P., & Pedro, Silvia R, M. (2013). *Pot-Honey: A legacy of stingless bee*. (P. Vit & U. de L. Andes, Eds.) (1st ed.). Mérida, Venezuela. doi:10.1007/978-1-4614-4960-7
- Vit, P., & Santiago, B. (2008). Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintí de los andes venezolanos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58(14), 411–415.

Yildiz, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazicioğlu, R., ... Kolayli, S. (2013). Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi:10.1155/2013/461478

4. Discusión, conclusiones y recomendaciones.

Discusión

Los resultados obtenidos en el estudio de los EEPO de abejas *A. mellifera* y de *T. angustula*, muestran variabilidad de la actividad biológica, para el conjunto de los gérmenes evaluados. Sobre las bacterias, los EEPO dan cuenta de una mejor actividad por parte de aquellos polenes que provenían de *T. angustula*; entre los EEPO de *A. mellifera* la mayor inhibición fue mostrada por los extractos de Cundinamarca en estado seco. De los EEPO activos sobre *Candida albicans*, resultaron ser mejores los extractos que provenían de polen de *A. mellifera* de Cundinamarca en estado húmedo. El efecto sobre el bacteriófago Phi X174 fue mayor entre los EEPO de *A. mellifera* proveniente de Boyacá en estado seco. Finalmente, los EEPO de *A. mellifera* que se comportaron mejor sobre los trofozoítos de *Giardia duodenalis*, provenían de polen de Cundinamarca en estado fresco. Esta variabilidad en los efectos a través de los gérmenes, puede deberse a que los compuestos activos sean diferentes para cada uno de ellos.

La técnica de extracción y el ajuste de las concentraciones de SST logradas para cada valoración, resultan novedosos porque permiten reportar en una unidad cuantificable para ser comparado en estudios posteriores.

Los EEPO de pote, poseen actividad antibacteriana y antiviral. En general, los resultados hallados para los EEPO de pote de *T. angustula*, no pudieron ser contrastados con reportes para polen de esta especie ni de otras especies de abejas nativas por la falta de investigaciones halladas al respecto a nivel mundial.

Conclusiones

Este estudio desarrolló una técnica de extracción, cuantificación y ajuste de los extractos etanólicos de polen colectado por abejas *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula* en Colombia y valoró *in vitro* su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria y su efecto sobre un bacteriófago.

La capacidad antioxidante por TEAC-DPPH, explicó parte de la acción antibacteriana de los EEPo.

Se Logró establecer las CMI de los EEPo sobre las cuatro especies de bacterias y una levadura.

Se ajustó una técnica simple y económica para evaluar la actividad sobre el bacteriófago, que permite hacer alguna inferencia indirecta de la actividad de los EEPo sobre virus.

Se estableció un rango de concentración de SST activos de los EEPo, como referente en la determinación *in vitro* del potencial antiparasitario sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

Se reporta por primera vez para Colombia la presencia de estos compuestos bioactivos en extractos etanólicos de polen.

Recomendaciones

Basados en los hallazgos del presente estudio, se recomienda ampliar la valoración de los compuestos activos del polen apícola en lo referente a:

1. Ampliación del muestreo de polenes de pote tanto de *T. angustula*, como de otras especies de abejas nativas sin aguijón de uso productivo en Colombia.
2. Estudios puntuales de la composición química del polen colectado por abejas, haciendo énfasis en los compuestos activos.
3. Continuar con la valoración de los EEPo, a fin de establecer a futuro indicadores puntuales de actividad antiparasitaria *in vitro*, como la concentración efectiva EC50.
4. Efectuar estudios comparativos entre la actividad sobre los bacteriófagos y su relación con ensayos que empleen virus de interés humano y animal.

